

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



La infección por *Helicobacter pylori* induce la interacción de HIF-1 α y β -catenina en un complejo relacionado con la expresión del gen CA9 en células AGS de cáncer gástrico

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

HÉCTOR ALEJANDRO TAPIA GARCÍA

**Directores de Tesis: Dr. Vicente Torres Gómez
Dra. Denisse Bravo Rodríguez**

z

Santiago-CHILE

Noviembre 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

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

HÉCTOR ALEJANDRO TAPIA GARCÍA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica y Título de Bioquímica, en el examen público rendido

Director de Tesis:

Dr. Vicente Torres Gómez

Co-director de Tesis:

Dra. Denisse Bravo Rodríguez

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Sergio Álvarez Armijo

Dr. Mario Chiong Lay

Dr. Alejandro Corvalán Rodríguez

Agradecimientos

Es muy complejo para mí poder siquiera comenzar a agradecer a quienes voy a mencionar en esta sección, ya que su presencia ha hecho que luego de años de esfuerzo, haya logrado llegar a este punto. Sin su ayuda, alegría, amor y cariño no habría sido posible, por lo que estoy profundamente agradecido de que me hayan hecho parte de sus vidas y por formar parte de la mía.

A mis tutores, Vicente y Denisse, gracias por hacerme parte de sus investigaciones, por aceptarme como su estudiante y guiarme en este proceso. Diversas instancias han podido acercarnos, siempre con un trato ameno y cariñoso, preocupado y consciente de mis necesidades como estudiante. Ambos han sido excelentes tutores, profesores, compañeros de investigación y me han hecho parte de sus grupos como si fuera un integrante de una gran familia, por lo que estoy profundamente agradecido. No podría haber logrado avanzar de esta forma si no hubiese sido por sus enseñanzas, consejos y dedicación como mis profesores. El hecho de poder trabajar en conjunto a ustedes me hace sentir mucho orgullo como científico y espero a través de mi trabajo retribuir la confianza que desde un principio depositaron en mí.

Agradezco también a las personas que componen los laboratorios en los cuales desarrollé este trabajo, el Laboratorio de Microbiología Oral y Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Universidad de Chile y al Laboratorio de Interacciones Microbianas de la Universidad Andrés Bello. En especial, agradecer a quienes día a día formaron lazos conmigo y se volvieron amigos más que compañeros. A Dani Herrera, Tania, Lucas, Carlitos, Patricio, Darna, Jessica, Safka y Mysan, gracias por aguantar mi mal humor y chistes, por su ayuda, consejos, conversaciones y risas. Gracias también por hacer de las largas, agotadoras, a veces tristes jornadas de trabajo, ya que su presencia le daba alegría a esos difíciles momentos y hacer que fuesen más llevaderos. Gracias por sus palabras en los momentos en que dudé de mis conocimientos y mis capacidades, ya que eran un empujón que me hacía seguir adelante y aprender nuevas cosas para continuar mis labores. A Daniel, del laboratorio de Autofagia, gracias, espero que puedas leer estas palabras y sepas que, sin tu ayuda, tu consejo, sin esas conversaciones con un café en mano, este trabajo difícilmente hubiese sido posible. A Dani Salinas, has sido un pilar fundamental en mi tiempo de trabajo, siendo no solo compañera, sino que una amiga y tu apoyo ha sido de gran importancia para seguir adelante en este proceso. A Cris, te considero un mentor, pero por sobre todo un amigo, gracias por aguantar día a día mis chistes y humor deprimente, por tus consejos, por todo, muchas gracias.

A mis amigos del colegio, Mario, María Paz, nos conocemos hace ya 12 años donde ha pasado de todo y me encuentro profundamente agradecido que podamos decir que seguimos siendo amigos, gracias por considerarme como tal. Gracias a mis amigos de la carrera, con quienes forjé un círculo de hierro, a Julio, Max, Claudio, Domi, Valeria, haber cursado esta carrera con ustedes ha sido un gusto, su presencia fue fundamental en cada etapa y su amistad ha sido algo precioso que he tenido la oportunidad de conocer. Todos ustedes son personas maravillosas y me siento agradecido y afortunado de ser su amigo. Espero que, a pesar de que los caminos de cada uno nos conduzcan hacia diferentes proyectos, todos sean para mejor y que no aminoren ese sentimiento fraterno y de amistad que se ha forjado entre nosotros. A Camila y Joaquín, mis amigos queridos, juntos hemos

afrontado esta etapa, conversando, sufriendo y riendo, han sido las personas más cercanas a mí en estos momentos y agradezco profundamente el permitirme ser su amigo, les deseo éxito y fortuna en sus nuevas etapas, de las que estoy completamente seguro de que serán siempre victoriosos, siendo las grandes personas que son.

A la gente que ha sido parte importante de mi vida y que hoy nos hemos distanciado, Felipe, Francisco, María Pilar, Lucas y su familia, Ignacio, Camila. Son muchas las vivencias que nos seguirán uniendo de una u otra forma y por ello, agradezco el haberlos conocido. A Valentina y Malva, quienes fueron mis profesoras en el liceo y que me impulsaron a la ciencia. A Rodrigo, quien fue mi profesor y amigo, a todos ustedes, les recuerdo con cariño y espero que nos volvamos a encontrar en algún momento, para mostrarles, que, sin ustedes, esto no hubiese sido posible también.

A mi familia, le agradezco el haberme apoyado en mi decisión de dedicarme a la ciencia y nunca presionarme a estudiar lo que pudiese ser una carrera que no me gustase. Agradezco su cariño todos estos años, sé que las cosas han sido especialmente difíciles para nosotros, por lo que les agradezco el haberme apoyado todos estos años. A mi abuela Dominga, me viste nacer y crecer, me inculcaste valores y la importancia del esfuerzo, el estudio y respeto, me enseñaste a vivir y me acogiste como tu hijo cuando quienes debían cuidarme fallaron. Me enseñaste todo lo que debía enseñarme un padre y una madre, me diste todo lo que necesité, con humildad y dedicación. Aún si eso significaba que te privaras de cosas, gracias a ti y a que hiciste lo imposible por mí, jamás me faltó un techo, comida o abrigo. Me diste todo tu amor, y perderte ha sido lo más difícil que he tenido que soportar, me viste llegar a este mundo y yo aún me encuentro entendiendo el hecho de que te tuve que ver partir de este mundo. Gracias por todo lo que hiciste, por tu entrega y dedicación, gracias por tu amor.

A la persona más importante de mi vida, a ti Macarena. Mi vida ha cambiado gracias a ti, desde que te conozco, desde nuestras primeras conversaciones, ocupaste un lugar en mi corazón y pensamiento. Hoy la vida es contigo, apoyándonos y alentándonos a continuar día a día. Mi presente y futuro es contigo, quien me ha brindado un amor sincero, puro, inmenso, preocupado, cándido, tierno e incondicional. Tus palabras, tus abrazos, tu sonrisa han sido una luz en los días más oscuros (que no han sido pocos), llevándose lejos todo lo malo que hay en el mundo, llenando mi vida con tu luminosidad y alegría. Tú y tu familia me han acogido como uno más, me han hecho parte de su día y a día, de sus vidas, y se han vuelto mi familia, haciéndome sentir que jamás estoy solo. Las palabras no son suficientes para expresar lo mucho que agradezco el haberte conocido y permitirme ser tu compañero, solo espero que esta vida alcance para retribuir el amor y cariño que me has dado y para mostrarte el amor y cariño que por ti siento.

Para finalizar, el baterista Neil Peart de Rush, escribió las siguientes palabras: ***“If you choose not to decide you still have made a choice”***. Esta frase retrata que todo lo que hacemos se da en base a decisiones, y creo que, de una u otra forma, cada decisión que he tomado me ha traído a este momento, y ustedes, a quienes agradezco en estas palabras, han sido parte de cada una de ellas.

Por todo, hoy y siempre les estaré agradecido.

Índice general

Índice general	5
Índice de tablas	7
Índice de figuras	8
Abreviaturas	10
Resumen	11
Abstract	12
1. Introducción	13
1.1 Cáncer gástrico y su relación con <i>Helicobacter pylori</i>	13
1.2 HIF-1 α	19
1.3 Estabilización de HIF-1 α por <i>Helicobacter pylori</i>	23
1.4 β -catenina y su relación con <i>Helicobacter pylori</i>	26
1.5 HIF-1 α y β -catenina, relación en hipoxia tumoral.....	28
1.6 Resumen de antecedentes	30
2. Hipótesis	32
3. Objetivos	32
4. Materiales y métodos	33
4.1 Cultivo celular:.....	33
4.2 Cultivo bacteriano:.....	33
4.3 Infección de células AGS:	33
4.4 Obtención de extractos totales de proteína y Western blot:.....	33
4.5 Co-inmunoprecipitación de complejos de β -catenina:.....	34
4.6 Inmunofluorescencia indirecta:.....	35
4.7 Determinación de la expresión de genes mediante RT-qPCR:	36
4.8 Análisis estadístico:.....	37
5. Resultados	38
5.1 <i>Helicobacter pylori</i> modifica los niveles totales de HIF-1 α y β -catenina de forma transitoria en células AGS.....	38
5.2 HIF-1 α y β -catenina se acumulan en el núcleo celular durante la infección de células AGS con <i>Helicobacter pylori</i>	39
5.3 <i>Helicobacter pylori</i> induce la asociación nuclear entre HIF-1 α y β -catenina tras 8 horas de infección en células AGS.....	41

5.4	Estandarización de la co-inmunoprecipitación de complejos HIF-1 α / β -catenina en células AGS.....	43
5.5	<i>Helicobacter pylori</i> induce la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina en células AGS.	46
5.6	<i>Helicobacter pylori</i> induce la expresión génica dependiente de HIF-1 α	50
6.	Discusión	53
6.1	Estabilización de HIF-1 α y β -catenina por <i>Helicobacter pylori</i> y su rol en la carcinogénesis gástrica	53
6.2	Rol de <i>Helicobacter</i> en la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina y posibles implicaciones en la carcinogénesis gástrica	57
6.3	Rol de <i>Helicobacter pylori</i> sobre la expresión de CA9 como blanco transcripcional de HIF-1 α y rol del complejo HIF-1 α / β -catenina.....	62
7.	Conclusiones.....	66
8.	Bibliografía.....	68
9.	Material suplementario.....	77
9.1	Estandarización de protocolos de qPCR	77
9.2	Transfección de células AGS con el plasmidio pcDNA TCF-4/Myc-tag	77
9.3	Ensayo de Ligación por Proximidad.....	78
9.4	Determinación del efecto de <i>Helicobacter pylori</i> sobre la viabilidad celular	80
9.5	Estandarización y ensayos preliminares con siRNA contra β -catenina.....	82

Índice de tablas

Tabla 1. Partidores de qPCR.

33

Índice de figuras

Figura 1: Estadísticas asociadas a cáncer gástrico.....	12
Figura 2: <i>Helicobacter pylori</i> y prevalencia de su infección.....	14
Figura 3: La colonización y adhesión de <i>H. pylori</i> al epitelio gástrico es mediada por factores de virulencia.....	15
Figura 4: La infección por <i>H. pylori</i> induce daño celular alterando distintas vías de señalización.....	18
Figura 5: HIF-1 α es regulado en base al estado de oxígeno celular.....	20
Figura 6: HIF-1 α como regulador maestro del cáncer gástrico.....	22
Figura 7: Rol de <i>H. pylori</i> en la estabilización de HIF-1 α	24
Figura 8: Regulación canónica de β -catenina.....	25
Figura 9: Alteraciones en la señalización de la vía Wnt/ β -catenina producidas por la infección de <i>H. pylori</i>	27
Figura 10: β -catenina tiene un rol dinámico en la formación de complejos proteicos.....	28
Figura 11: Efecto de la infección de células AGS con <i>H. pylori</i> sobre los niveles totales de HIF-1 α y β -catenina.....	36
Figura 12: Efecto de la infección de células AGS con <i>H. pylori</i> sobre la localización celular de HIF-1 α y β -catenina.....	38
Figura 13: Evaluación de la co-localización entre HIF-1 α y β -catenina inducida por la infección con <i>H. pylori</i> en células AGS.....	40
Figura 14: Inmunoprecipitación preliminar de HIF-1 α y β -catenina.....	42
Figura 15: Estandarización de obtención de extractos proteicos para co-inmunoprecipitación.....	43
Figura 16: Estandarización de la co-inmunoprecipitación de complejos de β -catenina en células AGS.....	45
Figura 17: Efecto de <i>H. pylori</i> sobre la formación de complejos de β -catenina en células AGS.....	46
Figura 18: <i>H. pylori</i> no altera la localización nuclear de TCF-4 en células AGS.....	47
Figura 19: Efecto de <i>H. pylori</i> sobre la expresión de CA9 en células AGS.....	49
Figura 20: Efecto de <i>H. pylori</i> sobre la expresión de <i>c-Myc</i> en células AGS.....	49
Figura 21: Modelo propuesto.....	66
Figura S1: Estandarización de partidores de qPCR.....	74

Figura S2: Estandarización de la transfección de células AGS con el plasmidio pcDNA TCF4/Myc-tag.....	75
Figura S3: Determinación de la interacción entre HIF-1 α y β -catenina mediante PLA.....	76
Figura S4: Evaluación de la viabilidad de células AGS durante la infección con <i>H. pylori</i> ...	78
Figura S5: Estandarización del uso y efectividad del siRNA contra β -catenina.....	80

Abreviaturas

°C: Grados Celsius.

µg: Microgramo.

µl: Microlitro.

µm: Micrómetro.

µM: Micromolar.

Akt: Proteína quinasa B.

ANOVA: Análisis de Varianza.

BCA: Ácido bicinconínico.

BSA: Albúmina de suero bovino.

cagPAI: Isla de patogenicidad *cag*.

co-Ip: Co-inmunoprecipitación.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

GFP: Proteína fluorescente verde.

GGT: gamma-glutamil transpeptidasa.

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico.

HIF: Factor inducible por hipoxia.

HIF-1α: Factor inducible por hipoxia 1-alpha.

IARC: Agencia Internacional para la investigación del cáncer.

IgG: Inmunoglobulina G.

LPR5/6: Receptor de lipoproteína 5/6.

LPS: Lipopolisacárido.

Min: Minutos.

M-MLV: Transcriptasa inversa del virus Moloney de leucemia murina.

mM: Milimolar.

MOI: Multiplicidad de infección.

mRNA: RNA mensajero.

mTOR: Blanco mamífero de rapamicina.

NF-κB: Factor nuclear kappa B.

nm: nanómetro.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PBS: Tampón de fosfato salino.

pcDNA: DNA de clonamiento de plasmidio.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PLA: Ensayo de ligación por proximidad.

qPCR: Reacción de polimerasa en cadena cuantitativa.

RNA: Ácido ribonucleico.

RPM: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Reacción de polimerasa en cadena con retrotranscripción.

SDS: Sodio dodecil sulfato.

SEM: Error estándar medio.

shRNA: RNA de horquilla corta.

siRNA: RNA pequeño de interferencia.

TBS: Tampón Tris Salino.

TLR: Receptor tipo toll.

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa.

VacA: Citotoxina vacuolante A.

Resumen

Helicobacter pylori es un cocobacilo Gram negativo de forma helicoidal que coloniza el nicho gástrico humano, promoviendo la activación de diferentes vías de señalización relacionadas a la carcinogénesis gástrica.

Estudios de nuestro grupo han demostrado que la infección con *H. pylori* promueve la estabilización de HIF-1 α a través del factor de virulencia Ureasa. HIF-1 α es conocido por jugar un rol crucial en la progresión del cáncer mediante el control de la expresión de una amplia variedad de genes, induciendo la migración, invasión y metástasis de células tumorales.

Es conocido además que HIF-1 α interactúa con β -catenina en un complejo proteico como parte de la respuesta a la hipoxia tumoral, observado en distintos modelos de cáncer, promoviendo así la expresión de genes dependientes de HIF-1 α , como anhidrasa carbónica 9, un marcador clásico de la progresión tumoral. Sin embargo, actualmente no existen reportes que describan una posible relación entre *H. pylori* y la formación de este complejo proteico.

En la presente investigación, se buscó explorar el posible rol de la infección de *H. pylori* como un inductor de la interacción HIF-1 α / β -catenina y si es que este evento juega un papel transcripcional en el cáncer gástrico.

Nuestros hallazgos demostraron por primera vez que la infección con *H. pylori* induce la estabilización, acumulación y co-localización de HIF-1 α y β -catenina en el núcleo celular de manera dependiente del tiempo, como mostraron los análisis de Western blot e Inmunofluorescencia. Más aún, ensayos de co-inmunoprecipitación mostraron la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina inducida por la infección con *H. pylori*. De manera interesante, encontramos que *H. pylori* interfiere con la asociación de β -catenina a otro factor de transcripción, TCF-4, sin modificar su localización nuclear, como se observó por Inmunofluorescencia. Finalmente, análisis de qPCR de células infectadas mostraron que en el momento en que el complejo HIF-1 α / β -catenina se encuentra incrementado, los niveles de mRNA de CA9 se incrementaron cerca de 8 veces en comparación al control no infectado.

En resumen, nuestros hallazgos muestran que la infección con *H. pylori* es responsable de la formación del complejo nuclear HIF-1 α / β -catenina y sugieren que, a su vez, dicho complejo podría tener una responsabilidad transcripcional en la expresión de genes dependientes de HIF-1 α en células de cáncer gástrico. Sin embargo, mucho queda por dilucidar sobre el rol preciso de este complejo en el contexto de la carcinogénesis gástrica.

Abstract

Helicobacter pylori is a Gram-negative helical-shaped coccobacillus that colonizes the human gastric niche, promoting the activation of different signaling pathways related to gastric carcinogenesis.

Studies from our group demonstrated that *H. pylori* infection promotes the stabilization of HIF-1 α through its virulence factor Urease. HIF-1 α is known to play a key role in cancer progression, by controlling the expression of a several genes involved in tumor cell migration, invasion, and metastasis.

HIF-1 α is also known to interact with β -Catenin in a protein complex induced by hypoxia in different cancer models, thereby promoting HIF-1 α -dependent expression of genes, such as carbonic anhydrase 9 (CA9), a classic marker of tumor progression. However, there are no reports describing a possible relationship between *H. pylori* and the formation of this protein complex.

In this investigation, we aimed to explore the role of *H. pylori* infection as an inducer of HIF-1 α / β -Catenin complex formation and whether this event plays a transcriptional role in gastric cancer.

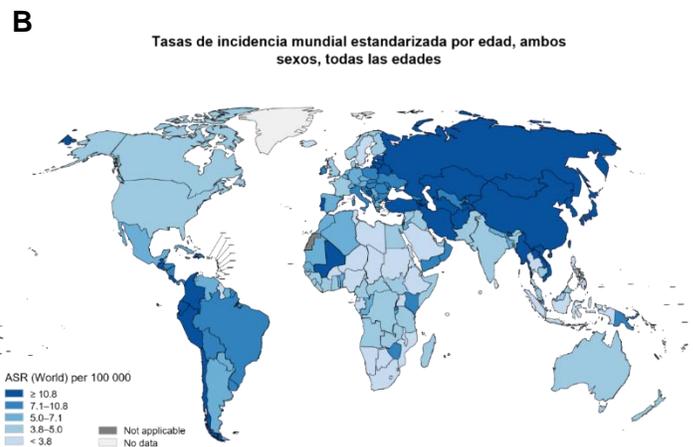
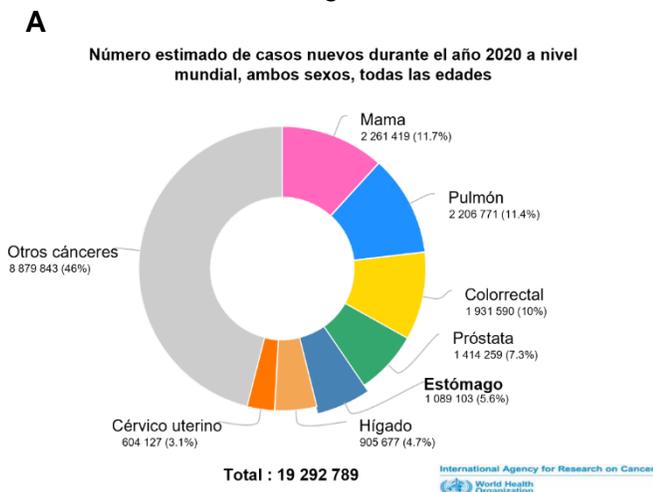
Our findings demonstrated for the first time that *H. pylori* infection induces the stabilization, accumulation and co-localization of HIF-1 α and β -catenin at the cell nucleus, in a time-dependent manner, as shown by Western blot and Immunofluorescence analyses. Moreover, Co-immunoprecipitation assays showed the formation of HIF-1 α / β -catenin complex induced by *H. pylori* infection. Interestingly, we found that *H. pylori* interfered with β -catenin association with another transcription factor, TCF-4 without modifying its nuclear localization as seen by Immunofluorescence. Finally, qPCR analyses of infected cells showed that at the time in which HIF-1 α / β -catenin complex is augmented, CA9 mRNA levels rise ten-fold when compared with non-infected control.

In summary, our findings showed that *H. pylori* infection is responsible for HIF-1 α / β -catenin nuclear complex formation and, in turn, this protein complex is responsible for HIF-1 α -dependent gene expression in gastric cancer cells. However, there is still much left to elucidate around the precise role of this complex at gastric carcinogenesis context.

1. Introducción

1.1 Cáncer gástrico y su relación con *Helicobacter pylori*

El cáncer gástrico (GC) es una de las neoplasias de mayor prevalencia y mortalidad a nivel mundial. Según datos recopilados por el Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN) hasta el año 2020 se reportaron anualmente alrededor de un millón de casos nuevos a nivel mundial, posicionando a esta patología como el quinto cáncer de mayor incidencia (Figura 1A). A su vez, los datos estadísticos arrojan que esta patología es responsable de más de setecientos mil muertes anualmente en todo el mundo, ubicándolo en el cuarto lugar de los cánceres de mayor mortalidad¹. Esto se fundamenta en su avance de carácter silencioso y de gran rapidez, diagnosticándose en etapas avanzadas en la mayoría de los casos. Se ha observado que su incidencia es altamente variable entre distintas poblaciones², presentándose con niveles entre 40 y 60% en el Este de Asia y Europa del Este. En regiones como Latinoamérica, su incidencia también es variable, encontrándose valores entre 20 a 30% en sectores cercanos a la Cordillera de Los Andes, la cual disminuye de forma progresiva al acercarse hacia la costa del océano Atlántico (Figura 1B)³. En este contexto, Chile ocupa el séptimo lugar entre los países con mayor incidencia para esta enfermedad a nivel mundial, mientras que, dentro de la población chilena, la tasa de mortalidad es cercana a 20 muertes por cada cien mil habitantes, observándose, además, casi el doble de casos en hombres respecto a mujeres (Figura 1C)⁴. Aun cuando la disminución tanto de casos como de la mortalidad asociadas a esta patología ha sido significativa en comparación con el panorama observado hace un par de décadas, el GC sigue siendo una de las neoplasias de mayor interés clínico en el mundo.



C

Sexo	Incidencia cruda (por cada 100.000 habitantes)
Hombres	29,7
Mujeres	14,3

Figura 1: Estadísticas asociadas al cáncer gástrico. **A)** Número estimado de casos nuevos por año a nivel mundial. El GC corresponde a la quinta patología maligna con mayor número de casos nuevos por año a nivel mundial. **B)** Distribución geográfica de la incidencia del GC a nivel mundial. Se presenta la distribución del GC en el mundo, se observa en azul oscuro incidencias iguales o mayores a 10 casos por cada 100.000 habitantes, donde Chile se encuentra dentro de los países de mayor incidencia en el mundo. **C)** Incidencia cruda por cada 100.000 habitantes separado por sexo en Chile. Datos entregados por el ministerio de Salud de Chile actualizados el año 2016, donde se observa la tasa de incidencia cruda por cada 100.000 habitantes en Chile agrupada por sexo⁴.

El cáncer gástrico se caracteriza por una alta complejidad celular, gran capacidad de avance y una compleja red de factores de riesgo que se involucra en su desarrollo y progresión, haciendo que su diagnóstico y manejo sea muchas veces tardío y poco efectivo⁵. La carcinogénesis gástrica se considera de tipo multifactorial y está dado por la interacción entre diversos factores de riesgo catalogados en cuatro grupos: **factores dependientes de paciente; factores ambientales; factores dependientes de la microbiota gástrica y factores infecciosos**⁶.

Dentro los factores dependientes del paciente, se encuentran principalmente la presencia de alteraciones genéticas, entre las cuales destacan mutaciones o polimorfismos en genes asociados principalmente a la respuesta inmune e inflamación crónica, como los genes que codifican para los factores IL1, IL1RN, IL10 y TNF- α ⁷⁻¹⁰. Existe evidencia de que el historial familiar juega un rol menor en el aumento del riesgo para el desarrollo de GC^{2,11}. Por otra parte, se ha observado que existe una importante relación entre el consumo de tabaco y la exposición a su humo con un mayor riesgo de desarrollo de esta patología¹².

Por otra parte, se ha reportado un importante rol en GC de agentes infecciosos, entre los que destaca la participación del virus Epstein Barr como uno de los más importantes, adjudicándosele un rol en 9% de casos de GC⁶. Pese a que los factores mencionados juegan un rol importante en la carcinogénesis gástrica, el principal factor de riesgo para el desarrollo de GC en la actualidad es la infección crónica con la bacteria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)^{3,6,13,14}. La infección con esta bacteria se relaciona con el desarrollo del 80% de los casos de GC a nivel mundial, destacándose como el factor de

riesgo de mayor importancia y resaltando la importancia de la investigación y vigilancia asociada a su infección¹³.

Helicobacter pylori es un patógeno bacteriano de carácter microaerófilico y Gram negativo de forma helicoidal, que puede exhibir de 5 a 7 flagelos unipolares como se muestra en la figura 2A, capaz de colonizar la mucosa gástrica humana^{13,15}. Su infección es altamente prevalente a nivel mundial, afectando a un 50% de la población aproximadamente¹⁶. Sin embargo, esta cifra puede variar dependiendo de la región, como se muestra en la figura 3B, alcanzando valores sobre el 80% en algunos países en vías de desarrollo de Asia, porcentajes que caen en países desarrollados donde se observan valores entre el 20 a 50%¹⁶. Se ha observado que aproximadamente un 74% de la población chilena se encuentra infectada con *H. pylori*¹⁶.

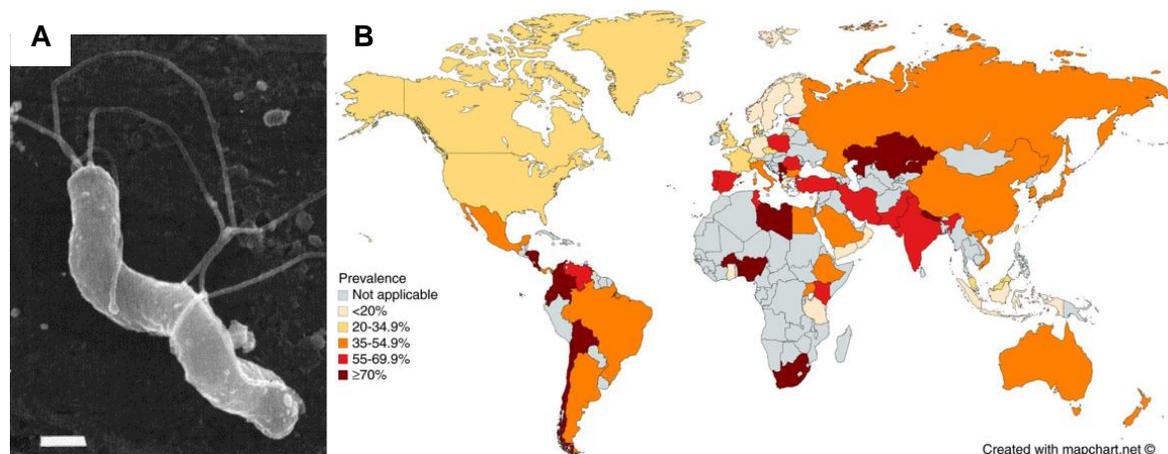


Figura 2: *Helicobacter pylori* y prevalencia de su infección. A) Microfotografía electrónica de barrido que presenta la morfología de *H. pylori*. Barra de escala = 0,5 μ m. **B)** Distribución de *H. pylori* en el mundo, se observa en colores más oscuros las regiones de mayor prevalencia, donde Chile presenta sobre un 70% de positividad a la infección con *H. pylori*. (Si la sacaste de alguna referencia debes ponerla aca).

La infección con *H. pylori* se adquiere generalmente en etapas tempranas de la niñez en forma oral-oral u oral-fecal, comúnmente asociada a malos hábitos de higiene o en la relación progenitor-hijo¹⁷. Esta bacteria es capaz entonces, de generar una infección crónica que puede persistir de forma asintomática durante décadas debido a diversas estrategias que ha desarrollado y que le permiten evadir la respuesta inmune del hospedero^{18,19}.

La colonización del epitelio gástrico por *H. pylori* requiere del uso de sus 5 a 7 flagelos unipolares que le otorgan motilidad, así como también del factor de virulencia

ureasa, una enzima dodecamérica dependiente de Níquel que le permite sobrevivir al pH ácido gástrico mediante la hidrólisis de urea en dióxido de carbono y amoníaco²⁰ (Figura 3). Esta reacción química le permite amortiguar la acidez del microambiente gástrico y, en combinación con la motilidad que posee, este patógeno puede movilizarse a través de la barrera bactericida del contenido luminal gástrico y de esta forma ingresar a la capa mucosa^{20,21}. Posteriormente se establece una infección que en la mayoría de los casos produce un cuadro de gastritis crónica, persistiendo por décadas sin alterar un equilibrio creado entre patógeno y hospedero¹³. Sin embargo, una pequeña fracción de la población afectada (menor al 10%) puede desarrollar progresivamente una serie de alteraciones histológicas conocidas como la cascada de Pelayo Correa, de forma tal que la gastritis no atrófica progresa a una gastritis atrófica, pudiendo generar úlceras gástricas y duodenales, linfomas y adenocarcinomas gástricos²². A pesar de que sólo un 1% de los pacientes infectados con esta bacteria llegan a padecer cáncer gástrico, la relación entre esta infección y el desarrollo de dicha patología maligna se encuentra bien descrita, siendo declarada un carcinógeno de tipo I por la Organización Mundial de la Salud en el año 1994²³.

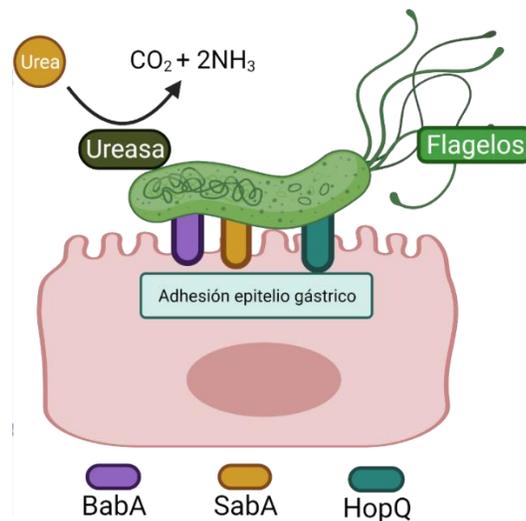


Figura 3: La colonización y adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico es mediada por factores de virulencia. Representación esquemática de los mecanismos que la bacteria *H. pylori* ha desarrollado para colonizar y adherirse al epitelio gástrico. La colonización se encuentra mediada principalmente por el factor de virulencia ureasa, capaz de catalizar la conversión de urea en dióxido de carbono y amoníaco, amortiguando el pH ácido del medio y generando un ambiente óptimo para el establecimiento de las colonias bacterianas²⁴. La persistencia y adhesión de la bacteria al epitelio se debe principalmente a sus adhesinas, mientras que los flagelos bacterianos le confieren motilidad para colonizar distintos sitios del nicho gástrico. Imagen creada en *BioRender*.

La infección por *H. pylori* produce en primera instancia un estado permanente de inflamación en la mucosa gástrica, la cual dependiendo de otros factores propios del hospedero o del ambiente al que se encuentra expuesto es capaz de progresar hacia carcinogénesis gástrica²⁵. Si bien existe evidencia que explica de forma general como la inflamación crónica producida por esta infección induce susceptibilidad al desarrollo de GC en los hospederos en múltiples estudios clínicos, es necesario tener en cuenta diversos efectos directos que la bacteria produce sobre el epitelio gástrico y las células que lo componen para establecer el panorama completo de la contribución de esta bacteria a la alteración del tejido y transformación celular.

En general, la infección por *H. pylori* produce diversos efectos que conllevan a la pérdida de la integridad de la barrera mucosa gástrica, la cual es compensada con un aumento exacerbado de respuestas de carácter carcinogénico²⁶. En este sentido, se ha observado en distintos estudios que muestras de pacientes que presentan infección por esta bacteria poseen un aumento de la apoptosis y proliferación celular, en comparación con pacientes sanos²⁷. Existe amplia evidencia de la acción de factores de virulencia, como VacA y GGT bacterianos son capaces de inducir la muerte apoptótica de las células epiteliales gástricas²⁸. Sin embargo, la infección gatillada por *H. pylori* también ha sido asociada a la proliferación y supervivencia de células epiteliales gástricas²⁹. Este hecho que puede parecer contradictorio es, en parte, debido a la respuesta compensatoria y opuesta a la muerte inducida por la infección, y, una de las características que explican la estrecha relación entre *H. pylori* y el desarrollo de la patología maligna.

H. pylori dispone de diversos factores de virulencia que contribuyen a la proliferación y apoptosis de células gástricas, siendo el factor más influyente la citotoxina CagA^{6,30}. CagA corresponde, sin lugar a duda, al factor de virulencia más ampliamente estudiado de *H. pylori*, debido a la gran cantidad y variedad de efectos que posee, entre los cuales destaca su capacidad de actuar como carcinógeno por sí solo, observándose en estudios *in vivo* que ratones inoculados con este factor de virulencia han desarrollado tumores²⁵. Se ha documentado a través de estudios epidemiológicos que, las cepas de *H. pylori* que poseen este factor de virulencia aumentan el riesgo de desarrollar GC y, por tanto, se consideran de mayor peligrosidad¹⁶. El estudio ENIGMA determinó que existen variaciones de cepas presentes en nuestro país, habiendo una gran prevalencia de cepas CagA⁺, al mismo tiempo se determinó una mayor relación entre estas cepas y el desarrollo de patologías gástricas³¹. A nivel molecular, este factor de virulencia se encuentra codificado en una isla

de patogenicidad llamada *cagPAI* de *H. pylori*, en la cual también se encuentra codificado un sistema de secreción tipo 4 (T4SS), el cual actúa como maquinaria para la secreción de esta proteína en el citoplasma de las células hospedadoras^{32,33}. Se ha reportado que CagA promueve la carcinogénesis gástrica mediante la degradación del supresor tumoral p53, promoviendo la proliferación celular e interfiriendo en la reparación del DNA³⁴. Las respuestas celulares de sobrevivencia y proliferación inducidas por este y otros factores de virulencia se relacionan a la activación de importantes vías de señalización como PI3K/Akt, MAPK, NF- κ B y β -catenina^{6,14,35,36}. Por otra parte, el factor de virulencia VacA constituye otra herramienta para la producción de daño por parte de la infección causada por *H. pylori*. Este factor de virulencia ha sido documentado con la capacidad de producir poros en la membrana celular e inducir la formación de vacuolas al interior de las células infectadas, causando altos niveles de estrés oxidativo y mitocondrial¹⁴. Se ha observado que, debido a la alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la infección por *H. pylori* se produce la estabilización de la proteína HIF-1 α ³⁷, de la cual se hablará en la siguiente sección. La figura 4 muestra un resumen de algunas de las vías de señalización y eventos celulares causados por la infección de *H. pylori*, en el que se pueden dar procesos proliferativos y apoptóticos^{14,38}. La evidencia al respecto puede ser controversial, por una parte, se ha observado que *H. pylori* promueve muerte celular por apoptosis en modelos *in vitro* e *in vivo*^{39,40}. Por otro lado, se ha documentado que en pacientes infectados cepas CagA⁺ y VacA⁺ hay un incremento en la proliferación de células de mucosa gástrica⁴¹. Al respecto, se ha planteado que estos efectos dependen del estado temporal de la infección, donde la muerte celular (evento temprano) podría verse compensada por una hiperproliferación de las células gástricas (evento tardío)²⁷.

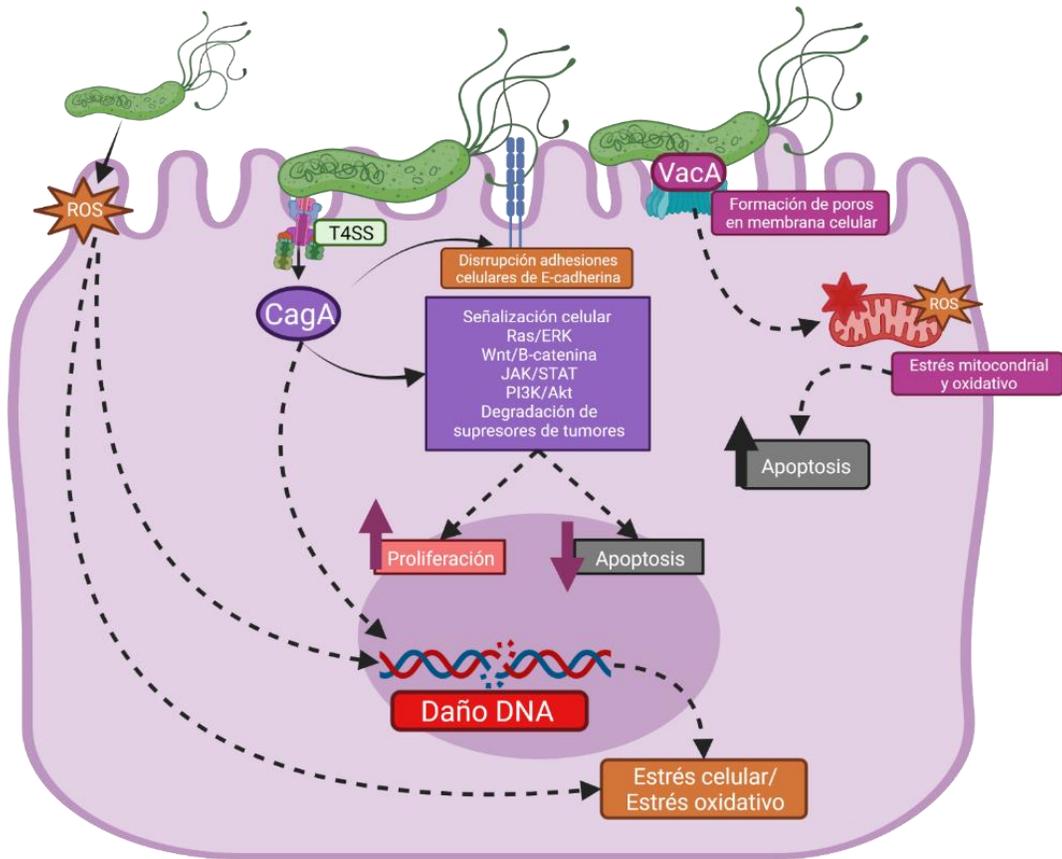


Figura 4: La infección por *H. pylori* induce daño celular alterando distintas vías de señalización. Representación esquemática de los diversos efectos de la infección causada por *H. pylori* en las células gástricas; a través de una amplia gama de factores de virulencia, la bacteria induce variados efectos celulares. De manera contradictoria, eventos como proliferación y apoptosis pueden promoverse o verse inhibidos dependiendo de factores como la temporalidad de la infección, cepa de *H. pylori* y modelo de estudio. Por otra parte, factores de virulencia y ROS producidas por la bacteria inducen daño genómico, favoreciendo la producción de estrés oxidativo en las células infectadas. Imagen creada en *BioRender*.

1.2 HIF-1 α

La hipoxia (concentraciones de oxígeno menores a 5%) es considerada como uno de los marcadores clásicos de la formación de tumores sólidos en varios tipos de cáncer, y es asociada clínicamente con un mal pronóstico en muchos carcinomas⁴². Su presencia en tumores es asociada estrechamente con procesos, como proliferación, angiogénesis, transición epitelio mesénquima (EMT), invasión local, metástasis y resistencia a terapias⁴³.

La adaptación celular a las condiciones de hipoxia es regulada de forma precisa por los factores inducibles por hipoxia (HIFs), los cuales corresponden a una familia de proteínas que regulan la transcripción de genes y permitiendo la adaptación celular a estas condiciones⁴⁴. Dentro de las proteínas que componen esta familia, destaca el factor HIF-1, siendo el más estudiado y reconocido por su rol en la respuesta a hipoxia. HIF-1 está compuesto por dos subunidades, alfa y beta, mientras que la subunidad beta es una proteína expresada de forma constitutiva en condiciones normales de oxígeno (normoxia), la subunidad alfa es blanco de degradación proteosomal⁴⁵. En normoxia la subunidad alfa se encuentra constantemente siendo marcada por un grupo de enzimas llamadas prolil-hidroxilasas, que catalizan la hidroxilación de los residuos de prolina 402 y 564 de HIF-1 α , permitiendo la acción del factor von Hippel-Lindau que actúa como componente de reconocimiento del complejo ubiquitina ligasa 3 para conducir a la degradación proteosomal de HIF-1 α ⁴⁶. Sin embargo, cuando la célula se encuentra bajo hipoxia, el oxígeno necesario para la acción de las enzimas prolil-hidroxilasas ya no se encuentra disponible y, por ende, estas enzimas pierden actividad, conllevando que HIF-1 α no sea sustrato de degradación proteosomal y se estabilice⁴⁶ (Figura 5).

Como se acaba de mencionar, la hipoxia actúa como principal estímulo para la estabilización y acción de HIF-1 α como factor transcripcional, sin embargo, otros estímulos han sido reconocidos con esta capacidad. En primer lugar, p53 es reconocida con la capacidad de reducir los niveles proteicos de HIF-1 α induciendo su degradación proteosomal⁴⁷. Ha sido demostrado de igual forma, que la pérdida de p53 estimula la acumulación de HIF-1 α y conlleva a un incremento de la transcripción de genes blanco como VEGF⁴⁸. Otro supresor tumoral, PTEN, el cual actúa como antagonista de PI3K, bloquea la cascada de señalización que culmina en la transcripción del mRNA de HIF-1 α ⁴⁹.

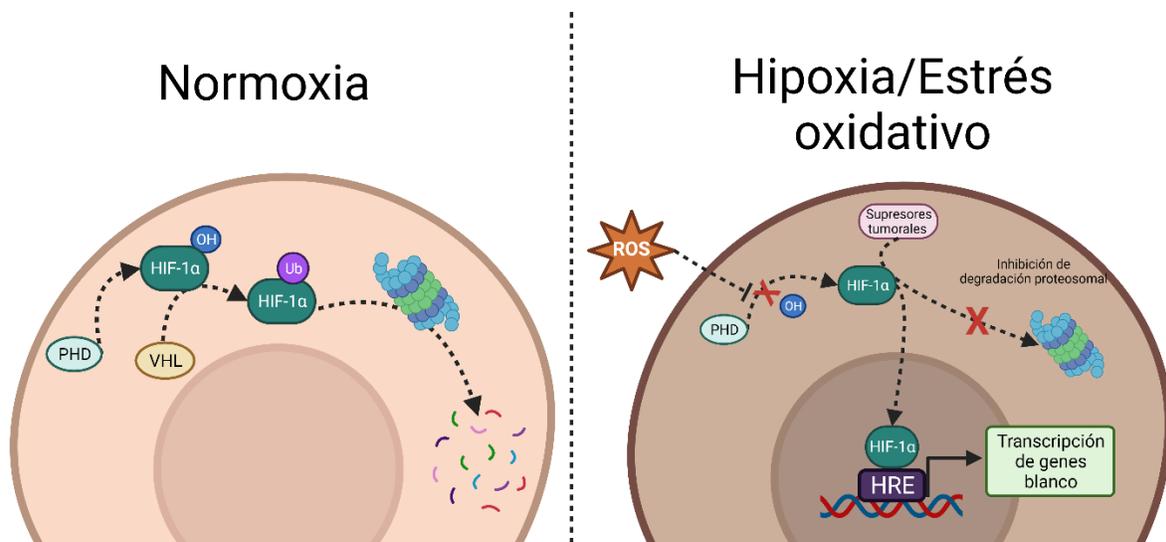


Figura 5: HIF-1 α es regulada en base al estado de oxígeno celular. Representación esquemática del sistema de regulación de la proteína de HIF-1 α . Este factor transcripcional es regulado durante normoxia mediante la constante hidroxilación de residuos de prolina presentes en su secuencia, que sirven como una señal molecular para su posterior ubiquitinación y degradación vía proteasoma. Este sistema de regulación es perdido cuando las células se encuentran en hipoxia. En un estado de hipoxia, la célula pierde esta regulación debido a la baja disponibilidad de oxígeno para su hidroxilación, la producción de especies reactivas de oxígeno y la pérdida de función de supresores tumorales permiten que el sistema de regulación se pierda, inhibiendo la degradación proteosómica y permitiendo la estabilización de este factor transcripcional, lo que conlleva la transcripción de genes blanco. Imagen creada en *BioRender*.

Existe amplia evidencia que destaca a HIF-1 α como un regulador maestro de la transcripción de genes de importancia para el desarrollo y progresión de diversos tipos de carcinomas, incluyendo al carcinoma gástrico⁵⁰. Su rol como factor de transcripción tiene un impacto crucial en diversos procesos celulares que contribuyen al crecimiento de la masa maligna. Para comprender la extensión del impacto de este factor es importante reconocer que el crecimiento tumoral está dado en primer lugar por un aumento de la proliferación celular que resulta de un exceso en la expresión y secreción de factores de crecimiento y de supervivencia, perdiéndose el equilibrio entre proliferación y muerte. Proteínas como el factor de crecimiento transformante A (TGFA), el factor de crecimiento similar a insulina 2 (IGF2), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), entre otros, se encuentran incrementados en distintos tipos de cáncer, incluyendo GC, como consecuencia de la transcripción mediada por HIF-1 α ⁵⁰.

Uno de los factores regulados por HIF-1 α más ampliamente descritos es VEGF, asociado estrechamente con el proceso de angiogénesis. La angiogénesis es un proceso

fundamental para el crecimiento tumoral y que se encuentra relacionado a las condiciones de hipoxia⁵¹. Esto se debe a que, durante el crecimiento de la masa tumoral, existen células que progresivamente pierden el adecuado suministro de nutrientes para su metabolismo, entre ellos, oxígeno. Es así como se produce la activación de HIF-1 α en respuesta a la hipoxia tumoral, permitiendo gracias a su rol transcripcional, la vascularización de estos tejidos y el sostenimiento del crecimiento tumoral y su diseminación⁴³. La sobreexpresión de VEGF e incremento de angiogénesis inducido por HIF-1 α se ha observado en modelos *in vitro* y muestras clinicopatológicas, mientras que la inhibición de HIF-1 α ha mostrado una importante reducción en la expresión de VEGF y de la vascularización tumoral en distintos modelos⁵².

El grado de invasividad y la producción de metástasis es uno de los mayores problemas causados por el cáncer, y una de las principales causas de mortalidad de esta patología. En este aspecto, la expresión de HIF-1 α es una pieza central de estos procesos, promoviendo la motilidad celular, capacidades invasivas y metástasis tumoral⁵³. Varios trabajos han mostrado que HIF-1 α controla el proceso de EMT a través de la expresión de genes blanco, permitiendo a las células la adquisición de un fenotipo mesenquimal y con ello, de características móviles e invasivas^{54,55}.

En consecuencia de los efectos que ejerce HIF-1 α en la progresión tumoral, es importante destacar estudios de perfiles clínicos en los cuales se ha analizado el rol de este factor de transcripción. En 2014, el grupo de Tafreshi determinó que la expresión de anhidrasa carbónica 9 (CA9), un blanco clásico de HIF-1 α , se encuentra incrementada, relacionándose directamente con un incremento en la proliferación del frente invasivo de tumores gástricos⁵⁶. Perfiles de expresión de HIF-1 α fueron evaluados en muestras clínicas de pacientes con GC, determinando que la expresión de HIF-1 α puede utilizarse como un marcador para el pronóstico de la progresión de esta enfermedad⁵². Otros estudios han logrado demostrar que la sobreexpresión de HIF-1 α se encuentra correlacionada con una pobre supervivencia promedio y con una menor expectativa de vida libre de enfermedad en pacientes de GC que han sido sometidos a gastrectomía^{49,57}. HIF-1 α induce la quiescencia en células tumorales como respuesta adaptativa a hipoxia, contexto en el cual se ha observado su capacidad para asociarse con otra proteína de gran importancia para el desarrollo y progresión del cáncer, β -catenina⁵⁸. En este contexto, se ha observado que esta asociación permite que las células experimenten una detención en su ciclo proliferativo

y, a su vez, adquieran características mesenquimales, lo que favorecería su motilidad y capacidad invasiva⁵⁴.

En su conjunto, estos antecedentes sitúan a HIF-1 α como un factor transcripcional fundamental para la progresión de la patología maligna, promoviendo la expresión de una lista de genes tan amplia como la gama de procesos que controla (Figura 6).

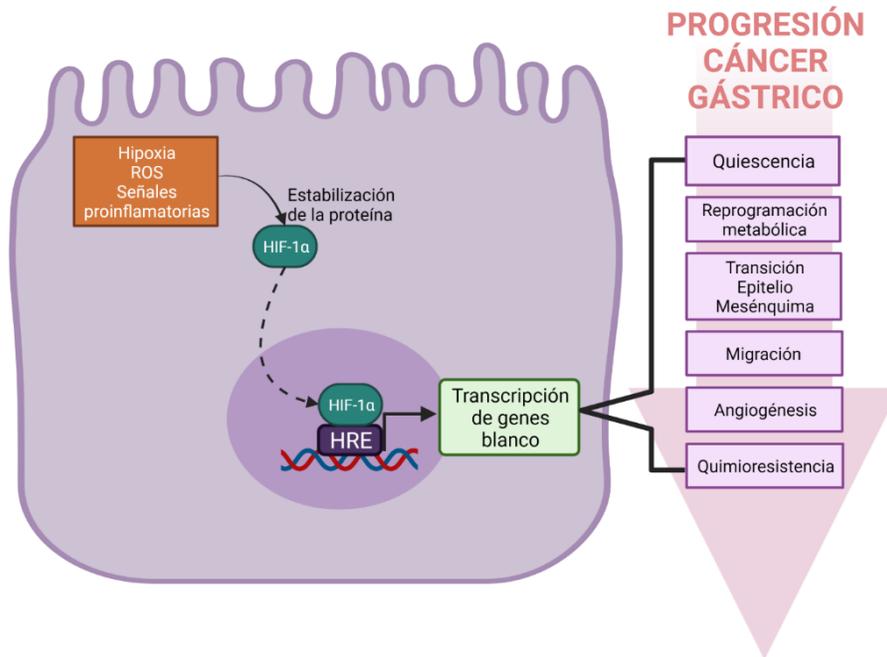


Figura 6: HIF-1 α como regulador maestro del cáncer gástrico. Mediante su rol transcripcional, HIF-1 α desempeña un rol fundamental en la progresión tumoral gástrica, promoviendo procesos relacionados con quiescencia, reprogramación metabólica, EMT, migración, angiogénesis y quimioresistencia. De esta forma, se ha considerado que esta proteína es un regulador maestro del GC. Imagen creada en *BioRender*.

1.3 Estabilización de HIF-1 α por *Helicobacter pylori*

Dentro de los múltiples efectos conducidos y gatillados por la infección de la bacteria *H. pylori* en el epitelio gástrico, la estabilización de HIF-1 α ha sido estudiada con detención, esto sin lugar a duda, debido al importante rol que tiene este factor transcripcional en la carcinogénesis y progresión del GC, como se discutió previamente. La estabilización de HIF-1 α dependiente de *H. pylori* ha sido documentada, tanto en modelos *in vitro*, como en muestras clínicas^{37,57,59,60}. En primer lugar, el año 2003 se publicó un estudio que por

primera vez relacionaba directamente la infección con este patógeno con la estabilización de HIF-1 α , encontrando que la producción de ROS mediada por *H. pylori* incrementaba los niveles de proteína de HIF-1 α , mostrando además que al tratar las células con distintos inhibidores de la producción de ROS, este efecto se perdía³⁷. En un trabajo posterior, se demostró que *H. pylori* inducía un aumento en la expresión de VEGF en células de GC de manera dependiente e independiente del T4SS bacteriano, siendo la vía independiente la de mayor influencia⁵⁹. En dicha publicación, además, se muestra que si bien hay una participación de CagA y T4SS bacteriano, su presencia no es indispensable para inducir la estabilización de HIF-1 α ⁵⁹. Por otra parte, y, en concordancia con estos antecedentes, existe evidencia que el factor de virulencia CagA puede contribuir a la estabilización de HIF-1 α al interferir con la acción de la proteína mitocondrial SIRT3, un inhibidor de la producción de ROS⁶¹.

Aunque la producción de ROS juega un importante rol en la estabilización de HIF-1 α durante la infección causada por *H. pylori* independiente de la oxigenación de la célula, no es la única manera descrita que tiene esta bacteria para inducir la estabilización de este factor transcripcional. La investigación de nuestro grupo demostró que la infección por *H. pylori* cepa 26695 promovía el aumento de los niveles de proteína de HIF-1 α mediante la señalización de PI3K/mTOR tras 8 horas de infección⁶⁰. En este trabajo la estabilización de HIF-1 α indujo un efecto no transcripcional mediante la promoción del arresto en el ciclo celular en fase G₀/G₁ a través de la degradación de la proteína Ciclina D1⁶⁰. Este efecto, considerado no canónico, ha sido observado previamente en el contexto de hipoxia⁶². En línea con este importante hallazgo, un trabajo posterior de nuestro grupo demostró además que el componente bacteriano responsable de la estabilización de HIF-1 α es el factor de virulencia Ureasa²¹. Ureasa, como fue mencionado en secciones previas, es una proteína parcialmente secretada por *H. pylori* y que se encuentra relacionada con la colonización del epitelio gástrico mediante su efecto de amortiguador de pH⁶³. Sin embargo, en esta publicación, se mostró que este factor de virulencia es capaz de interactuar con receptores TLR2 para inducir la señalización mediada por PI3K/mTOR para posteriormente producir la inducción de HIF-1 α en células de GC²¹. Si bien la manera precisa en que mTOR es capaz de aumentar los niveles proteicos de HIF-1 α no ha sido descrita, los autores postulan que podría darse una acción a nivel de la estabilización de HIF-1 α más que a nivel de su transcripción y traducción, dado que a 8 horas de infección con la cepa de *H. pylori* 26695 no se observaron cambios en los niveles de mRNA de HIF-1 α ⁶⁰.

La extensión de los efectos provocados por la inducción de HIF-1 α durante la infección con *H. pylori* aún no son del todo descritos, quedando muchas preguntas por resolverse y por plantear. Es importante tener en cuenta la importancia de los efectos previamente descritos y como estos se relacionan para fomentar la progresión de la patología maligna, pero es importante destacar el efecto descrito por nuestro grupo, el arresto en el ciclo celular dependiente de la inducción de HIF-1 α en células de GC durante la infección con *H. pylori* (Figura 7). La importancia de esta característica para el presente trabajo radica en la relación que tiene el arresto en la fase G₀/G₁ con el fenómeno de EMT, ambos unidos por un factor común, la estabilización y activación de HIF-1 α . A continuación, se describirá este importante nexo y como adquiere relevancia en el presente trabajo.

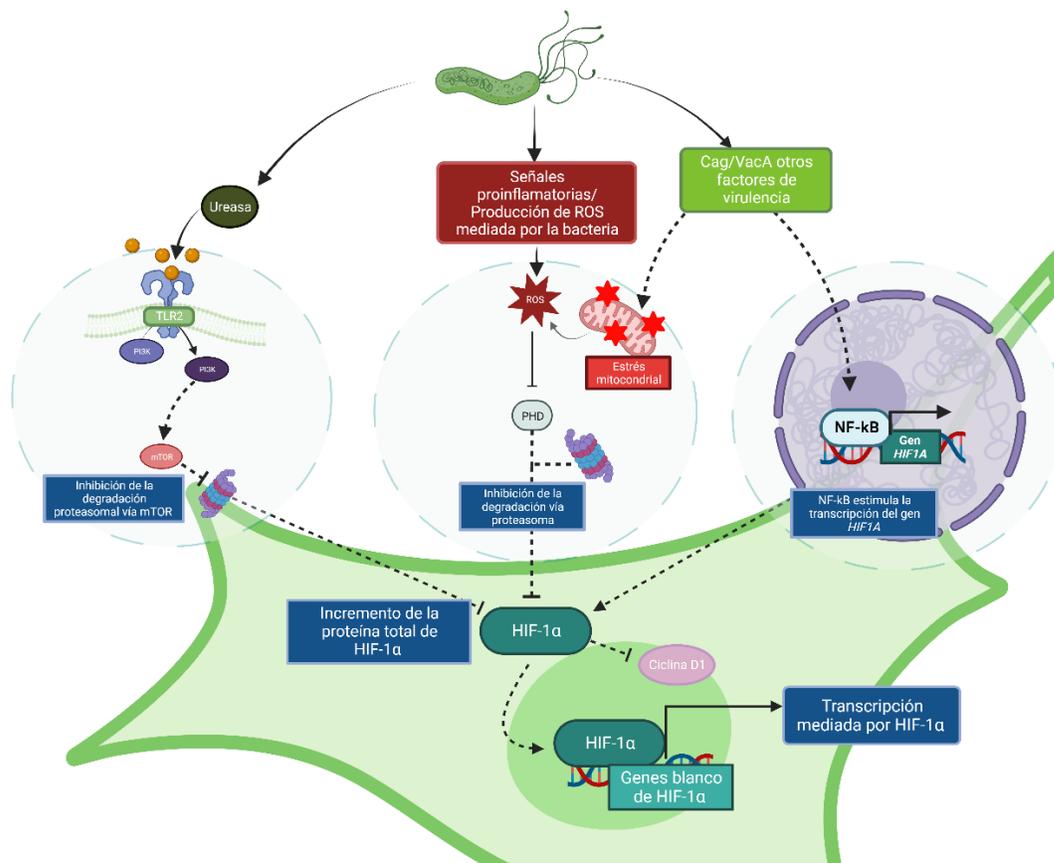


Figura 7: Rol de *H. pylori* en la estabilización de HIF-1 α . Representación esquemática de lo que hasta la actualidad se conoce con relación a las vías de señalización gatilladas por la infección causada por *H. pylori* y que convergen en el incremento de los niveles totales del factor de transcripción HIF-1 α . La estabilización de HIF-1 α dependiente del eje Ureasa/TLR2/PI3K/mTOR conlleva a la degradación de Ciclina D1 induciendo el arresto del ciclo celular. Por otra parte, ROS liberadas por la bacteria y producidas por la célula hospedadora son capaces de inhibir la degradación vía proteasoma de HIF-1 α . Finalmente, la acción de factores de virulencia

como CagA provoca la activación de NF- κ B, promoviendo la transcripción de gen *HIF1A*. Imagen creada en BioRender.

1.4 β -catenina y su relación con *Helicobacter pylori*

β -catenina es una proteína de andamiaje que posee múltiples interacciones y funciones en las células hospederas. La vía de señalización Wnt/ β -catenina se considera de gran importancia para la regulación de múltiples procesos fisiológicos asociados, por ejemplo, con el desarrollo embrionario, diferenciación y proliferación celular⁶⁴. En condiciones normales β -catenina se encuentra constantemente siendo fosforilada debido a la acción de las proteínas CK1a y GSK3 β , las que forman parte del complejo de destrucción de β -catenina, formado además por la proteína Axina y el supresor tumoral APC⁶⁵. La finalidad de este proceso es marcar mediante ubiquitinación por el complejo SCF ubiquitina ligasa E3 a β -catenina para inducir su degradación vía proteosomal⁶⁵. La activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina canónica, se produce cuando el ligando Wnt se une a receptores Frizzled y su correceptor LPR5/6, lo que, tras una serie de eventos intracelulares, culmina con el reclutamiento del complejo de destrucción, inhibiendo de esta forma la degradación de β -catenina y, por consiguiente, estabilizando a esta proteína⁶⁶. Al estabilizarse, β -catenina es capaz de translocarse al núcleo celular, dentro del cual se unirá principalmente a proteínas de la familia de factores de transcripción TCF/LEF, activando la transcripción de múltiples genes blanco⁶⁶ (Figura 8).

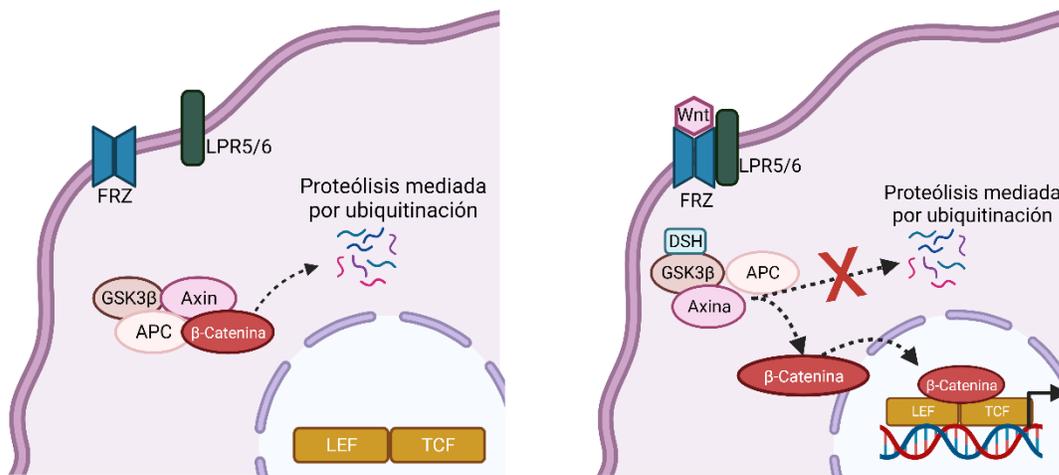


Figura 8: Regulación canónica de β -catenina. Representación esquemática donde se puede apreciar el funcionamiento de la regulación de β -catenina mediante su complejo de destrucción, el cual media su

ubiquitinación y degradación proteolítica. La señalización vía ligando Wnt inhibe la degradación de β -catenina, permitiendo que se estabilice y migre al núcleo para actuar como cofactor transcripcional de los factores de la familia TCF/LEF. Imagen creada en *BioRender*.

La desregulación de la señalización de la vía Wnt/ β -catenina ha sido asociada estrechamente al desarrollo de diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer colorrectal y GC, debido a la gran cantidad de procesos carcinogénicos regulados y promovidos por la transcripción de genes asociada a esta vía⁶⁷.

La infección causada por *H. pylori* ha sido ampliamente relacionada con la activación de la vía de señalización de β -catenina. Una de las primeras relaciones estudiadas entre la infección causada por *H. pylori* y β -catenina fue el trabajo de Franco *et al*⁶⁶. En dicho trabajo, células de adenocarcinoma gástrico infectadas con una cepa de *H. pylori* CagA⁺ indujeron la estabilización y translocación nuclear de β -catenina; por el contrario, al infectar con *H. pylori* deficiente de CagA fueron incapaces de inducir la estabilización y translocación nuclear de β -catenina. Mecánicamente, se ha observado que el factor de virulencia CagA al ingresar a la célula hospedera es capaz de intervenir las uniones célula-célula formadas por E-cadherina y β -catenina, produciendo la acumulación nuclear de esta última³⁶. En paralelo, se ha observado que el factor de virulencia VacA es capaz de inducir la estabilización de β -catenina mediante la activación del eje PI3K/Akt, que conduce a la inhibición de GSK3 β , evitando la degradación proteosomal de β -catenina⁶⁸. En este mismo estudio, se sugiere que el rol de VacA en la inhibición de GSK3 β es probablemente dependiente de su conformación tridimensional, debido a que la incubación con VacA purificado e inactivado por calor fue incapaz de inducir la estabilización y translocación nuclear de β -catenina dependiente de la inhibición de GSK3 β .

Finalmente, CagA es capaz de interactuar con la proteína Runx3, un represor de la interacción entre β -catenina y TCF-4⁶⁹. La interacción CagA-Runx3 expone el sitio de unión de TCF4, permitiendo su interacción con β -catenina y por consiguiente la expresión de genes blanco, entre los que se destacan los que codifican las proteínas COX-2 y VEGF, las que juegan un rol crucial en la progresión tumoral y especialmente en GC, promoviendo procesos como proliferación, migración, invasión, angiogénesis, entre otros, dando cuenta de su comportamiento versátil e importante rol en el desarrollo y progresión de la patología maligna⁷⁰. El conocimiento actual relacionado a la vía de señalización asociada a β -catenina por la infección de *H. pylori* se presenta en la figura 9, donde si bien, existe relativamente

un amplio conocimiento del rol de algunos componentes bacterianos que promueven la activación de esta vía de señalización, aún queda mucho por determinar en el contexto de eventos río abajo de dicha activación de β -catenina dependiente de *H. pylori*.

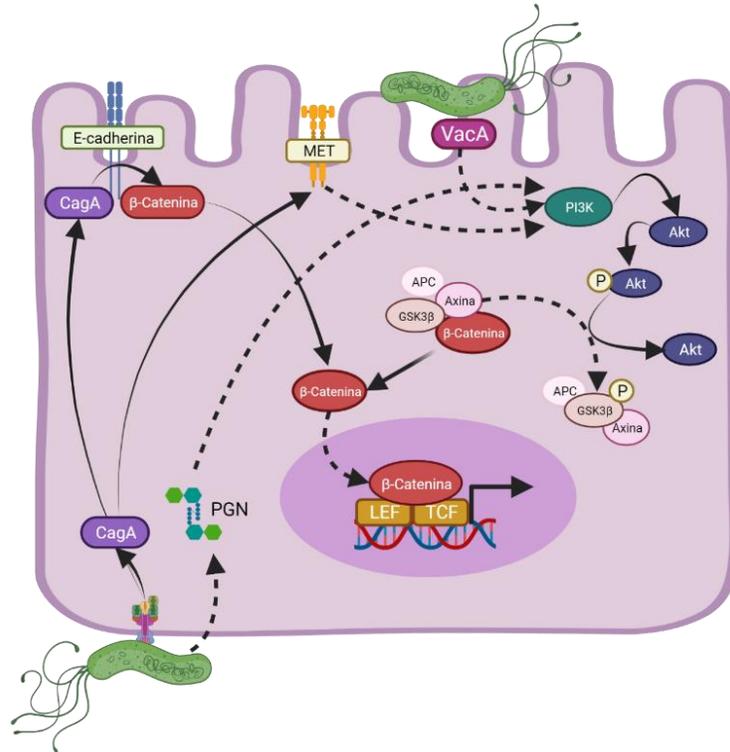


Figura 9: Alteraciones en la señalización de la vía Wnt/ β -catenina producidas por la infección de *H. pylori*. Representación esquemática de como la infección causada por *H. pylori* altera la señalización de Wnt/ β -catenina gracias a la acción de diversos factores de virulencia. CagA es inyectado a la célula hospedera, provocando la disrupción de los complejos E-cadherina/ β -catenina. Por otra parte, CagA y VacA, así como también el péptidoglicano son capaces de producir la activación de la cascada de señalización compuesta por PI3K/Akt que conlleva a la inhibición del complejo de destrucción de β -catenina. En su conjunto, estas acciones permiten la estabilización de β -catenina en el citoplasma de la célula hospedera para su posterior asociación con factores de transcripción de la familia TCF/LEF. Imagen creada en *BioRender*.

1.5 HIF-1 α y β -catenina, relación en hipoxia tumoral

La condición de hipoxia ha sido descrita, como ya fue mencionado previamente, como el estímulo clásico de la estabilización del factor transcripcional HIF-1 α . A través de la estabilización de HIF-1 α , las células pueden adaptarse a hipoxia activando una serie de mecanismos asociados a supervivencia y migración⁴⁷. Mientras los efectos de adaptación

a hipoxia son considerados como los de tipo canónico, efectos como la degradación de Ciclina D1 y arresto de ciclo celular son considerados como no canónicos^{60,62}. En este sentido, se ha documentado que durante hipoxia HIF-1 α puede inducir el arresto del ciclo celular mediante su unión a la proteína Cdc6, necesaria para la progresión del ciclo celular⁷¹. Por otra parte, se ha reportado que HIF-1 α incrementa la expresión de las proteínas inhibidoras de kinasas dependientes de ciclinas p21 y p27, produciendo el arresto del ciclo celular⁷². Estos efectos se condicen con lo observado por nuestro grupo respecto a la degradación de Ciclina D1 y arresto de ciclo celular dependiente de HIF-1 α durante la infección con *H. pylori* cepa 26695^{21,60}. Previamente, el trabajo publicado por Kaidi *et al*⁶⁸, estableció una novedosa interacción entre HIF-1 α y β -catenina en un modelo *in vitro* de cáncer colorrectal durante hipoxia. Este trabajo logró determinar que, al estabilizarse, **HIF-1 α es capaz de interactuar y desplazar de forma competitiva al factor de transcripción TCF4 de su unión a β -catenina, produciéndose la asociación en un complejo entre HIF-1 α y β -catenina. La formación de dicho complejo se observó como parte de la respuesta adaptativa al ambiente hipóxico** (Figura 10). Investigaciones posteriores han demostrado que la formación de este complejo constituye parte de la respuesta celular a hipoxia en distintos modelos de cáncer, observándose que el arresto en el ciclo celular constituye parte de los eventos río abajo de la formación de este complejo. Sin embargo, el rol de este complejo ha mostrado ser más diverso, hallándose una directa relación entre su formación y la expresión de marcadores asociados a EMT, proceso fundamental en la progresión tumoral y asociado comúnmente a la adquisición de capacidades migratorias e invasivas^{54,73,74}.

Estos hallazgos son de gran importancia, ya que demuestran una novedosa interacción entre dos proteínas que tienen gran relevancia en la biología del cáncer y su progresión.

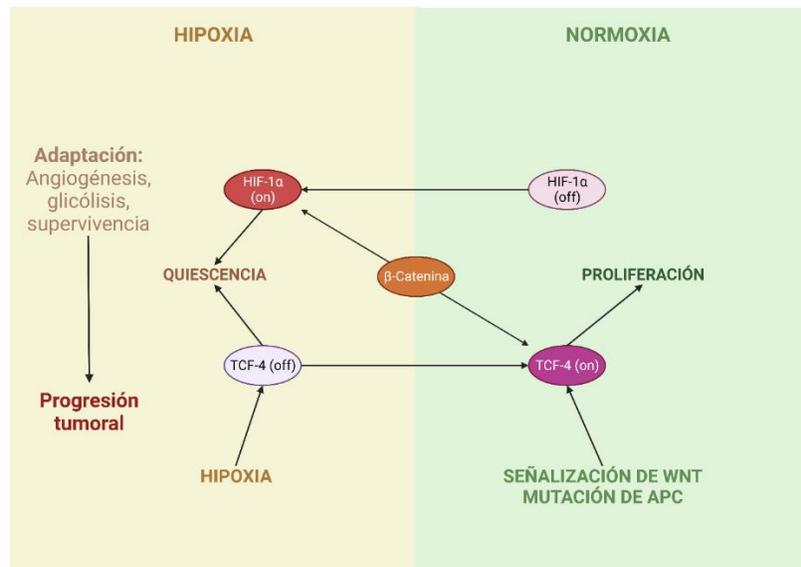


Figura 10: β-catenina tiene un rol dinámico en la formación de complejos proteicos. β-catenina a través de su rol como cofactor transcripcional, es capaz de asociarse con HIF-1α (en hipoxia) o TCF-4 (en normoxia) para fomentar procesos diferenciales en células tumorales (Imagen adaptada de Kaidi *et al.*⁵⁸).

Si bien, el rol del complejo HIF-1α/β-catenina ha sido explorado en diversos modelos tumorales en el contexto de hipoxia, el conocimiento en el contexto de carcinogénesis gástrica es relativamente nuevo y la posibilidad de que la infección causada por *H. pylori* juegue un papel en la interacción entre estas proteínas se mantiene desconocida.

1.6 Resumen de antecedentes

Los antecedentes expuestos en este trabajo se pueden resumir de la siguiente forma:

1. El cáncer gástrico es una patología de gran relevancia clínica a nivel mundial y nacional y su aparición se relaciona directamente con la infección por *H. pylori*.
2. La infección con *H. pylori* se caracteriza por su capacidad de activar múltiples vías de señalización celular, entre las que destacan la activación de HIF-1α y β-catenina.
3. HIF-1α y β-catenina son proteínas fundamentales en la progresión tumoral gástrica, controlando procesos como arresto en ciclo celular, migración, invasión y metástasis.

4. La interacción entre HIF-1 α y β -catenina ha sido caracterizada por su capacidad de promover, a través de la expresión génica dependiente de HIF-1 α , la adquisición de características malignas.

2. Hipótesis

En base a lo anteriormente expuesto, es posible preguntar si la infección por *H. pylori* es capaz de inducir la interacción entre HIF-1 α y β -catenina y, de ser así, qué impacto podría tener en el cáncer gástrico.

Para responder a esta interrogante, se ha propuesto la siguiente hipótesis:

“La infección de células AGS de cáncer gástrico con *Helicobacter pylori* incrementa los niveles de HIF-1 α y β -catenina, su translocación nuclear y asociación en un complejo relacionado con la expresión de CA9”.

3. Objetivos

Objetivo general: Determinar el rol de la infección con *H. pylori* sobre los niveles, localización celular y asociación de las proteínas HIF-1 α y β -catenina en un complejo y la expresión de *anhidrasa carbónica 9*, gen blanco de HIF-1 α en células AGS de cáncer gástrico.

O.E.1: Determinar el efecto de la infección con *H. pylori* sobre los niveles proteicos y localización celular de HIF-1 α y β -catenina.

OE.2: Determinar la asociación nuclear y formación de un complejo entre las proteínas HIF-1 α y β -catenina.

OE.3: Determinar el efecto de la infección con *H. pylori* sobre la expresión del blanco transcripcional de HIF-1 α , *anhidrasa carbónica 9*.

4. Materiales y métodos

4.1 Cultivo celular:

Se utilizó la línea celular epitelial de cáncer gástrico AGS (ATCC-1793). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Cytiva) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos (Penicilina 10.000 U/mL/Estreptomina 10 µg/mL) según corresponda. Las células se incubaron en un ambiente humidificado a 37°C y 5% CO₂.

4.2 Cultivo bacteriano:

Se utilizó la bacteria *Helicobacter pylori* cepa 26695 (ATCC-700392), cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado. Su cultivo se llevó a cabo en agar tripticasa-soya (TSA) suplementado con suero equino al 5%, suplemento nutritivo Vitox (Oxoid) y suplemento de selección Dent (Oxoid). Las bacterias se incubaron en un ambiente humidificado a 37°C y 5% CO₂.

4.3 Infección de células AGS:

Las células AGS se sembraron según correspondiese a cada ensayo en medio completo, 24 horas previo a infectar. Al menos 4 horas previo a realizar la infección, el medio fue reemplazado por medio RPMI 10% SFB sin antibióticos. Las bacterias cultivadas entre 16-24 horas previo infección se recolectaron y resuspendieron en amortiguador fosfato salino (PBS) 1X pH 7,2 y se midió su densidad óptica a 560 nm considerando que un valor igual a 0,4 equivale a 3,0x10⁸ Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) según lo establecido en literatura⁶⁰. Alícuotas de la suspensión de bacterias se agregaron a los cultivos celulares para obtener la multiplicidad de infección (MOI) 100 en cada experimento.

4.4 Obtención de extractos totales de proteína y Western blot:

Para obtener extractos totales de proteínas destinados a Western blot, 4,0x10⁶ células se sembraron en placas de 100 mm, al menos 4 horas previo a infectar, se procedió a cambiar el medio por medio completo fresco sin antibióticos y se expusieron a los estímulos correspondientes. Al cumplirse los períodos de incubación las células fueron homogeneizadas con un amortiguador de lisis (HEPES 20 mM pH 7,4, leupeptina 12,5 µg/mL, antipaína 10 µg/mL, benzamidina 100 µg/mL, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y fluoruro de sodio 10 mM, SDS 0,1%, NP-40 (IGEPAL) 0,05%). Los extractos fueron sonicados y

centrifugados a 13.500 rpm por 10 minutos, tras lo cual se rescataron los sobrenadantes. Una porción de los extractos obtenidos fue utilizada para la cuantificación de estos mediante ensayo de BCA, mientras que el resto fue mezclado con amortiguador de carga (Tris-HCl pH 6,8 278 mM, SDS 4,2%, glicerol 44,4%, azul de bromofenol 0,02%, β -catenina-mercaptoetanol 10%). Posteriormente, 50 a 75 μ g de proteínas por cada condición fueron cargadas y separadas por SDS-PAGE en geles al 10%. Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa durante toda la noche. Las membranas se bloquearon con leche descremada o gelatina al 5% en TBS-Tween 0,1%. Posteriormente las membranas se incubaron a 4°C toda la noche con anticuerpos primarios anti HIF-1 α (1:2000, ratón, BD-Biosciences #H72304), anti β -catenina (1:2000, ratón, Santa Cruz #sc-7963), anti TCF-4 (1:2000, ratón #sc-166699) o anti β -catenina-actina (1:10000, ratón, Santa Cruz, #sc-47778). Posteriormente, las membranas se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o ratón conjugados a peroxidasa de rabanita (1:5000) por 1 hora a temperatura ambiente. La presencia de peroxidasa de rabanita se detectó utilizando sustrato quimioluminiscente EZ-ECL. La cuantificación de los niveles proteicos se realizó utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

4.5 Co-inmunoprecipitación de complejos de β -catenina:

Se sembraron 6×10^6 células en placas de 100mm, al menos 4 horas previo a infectar, el medio se reemplazó por medio completo sin antibióticos. Las células se expusieron a los estímulos indicados en cada experimento. Una vez cumplidos los tiempos de estímulo, las células se lavaron con PBS frío pH 7,2 y homogenizaron con un amortiguador de lisis suave (NP-40 1%, Tritón X-100 0,5%, leupeptina 12,5 μ g/mL, antipaína 10 μ g/mL, benzamidina 100 μ g/ml, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, MG132 20 μ M, HEPES 20 mM en PBS pH 7,2). Los extractos se incubaron en amortiguador por 5 minutos para completar la lisis y se centrifugaron a 13.200 rpm por 1 minuto. Se reservó el 10% de sobrenadante para el input y el resto se incubó con esferas de proteína A precubiertas con 2 μ g de anticuerpo monoclonal contra β -catenina (ratón, Santa Cruz, #sc-7963)) o con la IgG control monoclonal de ratón contra Rab21 (Santa Cruz, #sc-81917). Los extractos se inmunoprecipitaron en agitación por rotación durante 1 hora, tras lo cual se centrifugaron a 3.000 rpm por 30 segundos, y lavados con amortiguador de lisis 3 veces, repitiendo la centrifugación entre cada lavado. Al terminar los lavados, se

agregó amortiguador de carga 4X (descrito en el punto 4.4) a los extractos para luego calentarlos a 90°C por 5 minutos. Las muestras de co-inmunoprecipitación y sus respectivos inputs (10% del extracto total) se separaron y analizaron mediante Western blot en geles SDS-PAGE al 8%, para la detección de las proteínas de interés fue realizada utilizando los anticuerpos primarios y secundarios descritos en el punto 4.4. La detección de peroxidasa de rabanito se realizó con el sustrato EZ-ECL y el análisis de las bandas detectadas fue ejecutado por medio del programa ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA).

4.6 Inmunofluorescencia indirecta:

Se sembraron 5×10^5 células en placas de 60 mm con cubreobjetos de 12 mm. Al menos 4 horas previo a infectar, el medio se reemplazó por medio completo sin antibióticos e infectadas según lo indicado en el punto 4.3 por los tiempos indicados en cada experimento. Al cumplirse los tiempos de estímulo, las células se lavaron con PBS frío pH 7,2 y fijadas por 20 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7,2. Posteriormente las células se lavaron y permeabilizaron con Tritón X-100 0,5% en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células se bloquearon con BSA al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron a 4°C con anticuerpos primarios anti-HIF-1 α (1:500, conejo, Abcam, #ab51608) y anti- β -catenina (1:500, ratón, Santa Cruz, #sc-7963), seguido de una incubación por 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios anti-conejo o ratón acoplados a Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 564, respectivamente (1:200, cabra Sigma Aldrich) preparados en BSA al 5%. Los núcleos celulares se marcaron con tinción Hoescht (2 μ M) por 10 minutos. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con solución Dako. 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 se analizaron con el programa Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Utilizando la imagen correspondiente a la tinción nuclear, se definieron 3 regiones de interés (ROI) de un tamaño estándar de 42x42 píxeles por foto y se analizaron 3 fotos por cada condición. Posteriormente se cuantificó el promedio de fluorescencia para HIF-1 α y β -catenina, siendo expresado como Intensidad de Fluorescencia en unidades arbitrarias.

4.7 Determinación de la expresión de genes mediante RT-qPCR:

La extracción de RNA se realizó a partir de la siembra de $8,0 \times 10^5$ células en placas de 60 mm. Al menos 4 horas previo a infectar, el medio fue reemplazado por medio completo fresco sin antibióticos. Tras cumplirse el período de estímulos las células se lavaron dos veces con PBS frío, y se recolectaron con Trizol (800 μ L por placa). Proteínas y DNA se extrajeron con cloroformo (200 μ L), el contenido se traspasó a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, se centrifugaron a 13.500 rpm por 20 minutos a 4°C, se tomó la fase acuosa y se precipitó el RNA con isopropanol a -20°C por toda la noche. El precipitado se recolectó al centrifugar a 13.500 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó dos veces con etanol al 80%, centrifugando a 13.500 rpm por 5 minutos a 4°C cada vez. El pellet obtenido se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en agua libre de nucleasas. Finalmente, el RNA se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop a 260 nm y su integridad se verificó en geles de agarosa al 2% + paraformaldehído con Gel Red. Posteriormente, 1 μ g de mRNA fue transformado a cDNA por medio de una reacción de retrotranscripción (RT) empleando la enzima M-MLV (Promega, EEUU). La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador (Axygen, EEUU) con el siguiente programa de temperaturas: 37°C por 60 minutos, 70°C por 15 minutos y 4°C por 5 minutos. El cDNA obtenido se utilizó posteriormente para evaluar la expresión de genes mediante qPCR, para lo cual se empleó el kit PoweUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Los genes evaluados se encuentran disponibles en la tabla 1. La cuantificación y análisis de la expresión génica relativa de cada uno de los genes se realizó a través del método de delta-delta CT ($\Delta\Delta$ CT). Para esto, se calculó la diferencia (delta) entre el CT de los genes de interés y β -catenina-actina (gen utilizado como control interno), el valor obtenido se restó al valor de CT de cada gen analizado posteriormente, obteniendo así el valor de $\Delta\Delta$ CT. El cálculo final se realizó elevando 2 a menos el valor de $\Delta\Delta$ CT y presentado como niveles relativos de mRNA respecto al control sin infección.

Nombre Primer	Secuencia Forward	Secuencia Reverse	Amplicón esperado	Tm esperada
CA-IX	GTGCTATGAGCAGTTGCTGTC	AAGTAGCGGCTGAAGTCAGAGG	115pb	61/62
C-MYC	TGAGGAGACACCGCCAC	CAACATCGATTTCTTCCTCATCTTC	71pb	61/59
B-Actina	AAATCGTGC GTGACATTAAGC	CCGATCCACACGGAGTACTT	406pb	58/59

Tabla 1: Partidores para qPCR: se muestran las secuencias *Forward* y *Reverse*, amplicones esperados y Temperatura de *melting* (Tm) esperada de los partidores diseñados para los genes a analizar mediante qPCR.

4.8 Análisis estadístico:

Los resultados de Western blot de extractos de proteína total se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el post-test de Dunn. Los resultados asociados a la intensidad de fluorescencia nuclear y colocalización se analizaron mediante el test paramétrico ANOVA de una vía y post-test de Dunnett. Los resultados asociados a los experimentos de co-inmunoprecipitación se analizaron mediante el test t-student de una muestra. Finalmente, el análisis de los resultados de qPCR se realizó utilizando un test t-student pareado de dos vías. El número de replicados biológicos (N) fue de 3, a menos que fuese especificado un número distinto. Las condiciones experimentales se comparadas contra la condición control no infectada (N/I), las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si el valor fue $p < 0,05$.

5. Resultados

5.1 *Helicobacter pylori* modifica los niveles totales de HIF-1 α y β -catenina de forma transitoria en células AGS

Investigaciones previas de nuestro grupo determinaron que la infección con la bacteria *H. pylori* cepa 26695 induce la estabilización de HIF-1 α en células AGS de GC de forma transitoria^{21,60}. En el presente trabajo se realizaron experimentos para verificar la reproducibilidad de este modelo. Para esto, se sembraron 4×10^6 células en placas de 100 mm, las cuales se infectaron con *H. pylori* 26695 a MOI 100 por los tiempos indicados en los experimentos (Figura 11).

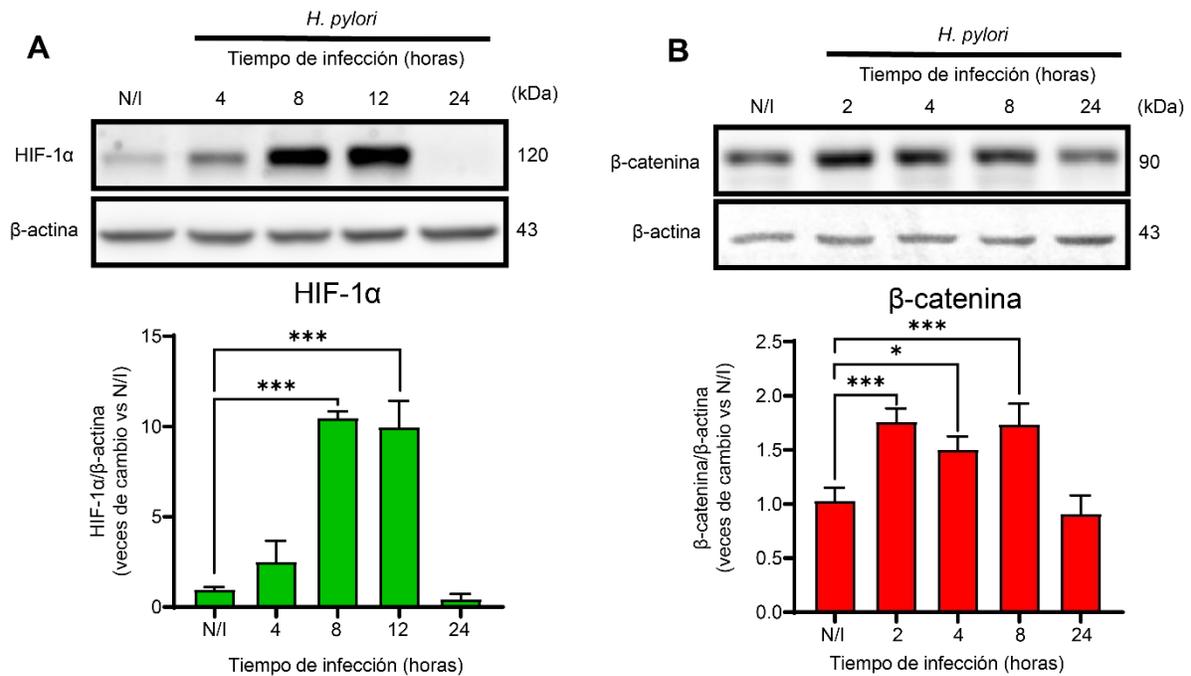


Figura 11: Efecto de *H. pylori* sobre los niveles totales de HIF-1 α y β -Catenina. Células AGS (4×10^6) se sembraron en placas de 10 cm e infectadas con *H. pylori* por los tiempos indicados, tras cumplirse los tiempos de infección, las células fueron homogeneizadas como se describe en el apartado 4.4 de la sección de métodos para la preparación de extractos totales de proteína. Luego las muestras fueron separadas por geles SDS-PAGE al 10% y las proteínas de interés fueron analizadas mediante Western blot. Imágenes representativas de los Western blot de extractos totales de células AGS infectadas con *H. pylori* para **A)** HIF-1 α y **B)** β -Catenina y sus respectivas cuantificaciones, los niveles de cada proteína fueron normalizados en base a los niveles β -actina y comparados con el control no infectado (N/I) (N=3. Promedio \pm SEM, Test no paramétrico Kruskal-Wallis, post-test Dunn. * $p < 0,05$).

En la figura 11A se puede observar que la infección con *H. pylori* produjo un incremento estadísticamente significativo en los niveles de HIF-1 α , alcanzando un máximo entre las 8 y 12 horas de infección, mientras que, por otro lado, se puede observar que los niveles de esta proteína decaen notoriamente a las 24 horas de infección con *H. pylori*. Estos resultados concuerdan con lo observado previamente en literatura, describiendo la inducción de HIF-1 α dependiente de *H. pylori* como un fenómeno de carácter transitorio⁶⁰. Las células AGS de GC se caracteriza por tener a β -catenina en altos niveles basales, debido a una mutación en la secuencia de esta proteína que la hace insensible a la degradación vía proteasoma que sufre normalmente³⁶. Con este antecedente en consideración, se determinaron los niveles de esta proteína durante la infección de células AGS con *H. pylori*. Se observó que los niveles fluctuaron a tiempos cortos de infección (2 a 8 horas) y que disminuyeron a 24 horas de infección (Figura 11B). Entre las 2 y 8 horas de infección con *H. pylori* se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles totales de β -catenina, tiempos en los que se observó también, un incremento en los niveles de HIF-1 α . Estos resultados sugieren que los niveles de ambas proteínas son influenciados por la acción de la bacteria.

5.2 HIF-1 α y β -catenina se acumulan en el núcleo celular durante la infección de células AGS con *Helicobacter pylori*.

En línea con los hallazgos previos, se determinó si además de un cambio en los niveles totales de estas proteínas, la infección producía modificaciones en la localización subcelular de HIF-1 α y β -catenina durante las temporalidades observadas. Para explorar esta posibilidad se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia indirecta en formato de cinética con la infección por *H. pylori*. Para esto, se sembraron 2×10^6 células sobre cubreobjetos en placas de 60 mm, como se describe en el apartado de metodología 4.6, infectadas con *H. pylori* y analizadas tras 2, 4, 8 y 24 horas post-infección. En la figura 12A se puede apreciar fotografías representativas de 4 experimentos independientes, donde se observó que la señal correspondiente a HIF-1 α aumentó progresivamente. Se observa una mayor señal tras 4 horas de infección y alcanzando un máximo a las 8 horas de infección hallándose mayoritariamente en el núcleo celular, seguido de una clara disminución tras 24 horas de infección. Por otra parte, se observó que β -catenina si bien, siempre se localizó en el núcleo celular, también experimentó una mayor acumulación

cuando las células se infectaron por 8 horas con *H. pylori*, la cual disminuyó tras 24 horas de infección. Los paneles B y C muestran la cuantificación de los niveles de fluorescencia nuclear de HIF-1 α y β -catenina. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia se llevó a cabo según lo descrito en el apartado 4.6 de métodos. Se observó que tras 8 horas de infección con *H. pylori*, tanto HIF-1 α como β -catenina incrementaron sus niveles nucleares de manera estadísticamente significativa. Estos resultados muestran que ambas proteínas experimentan un comportamiento cinético similar.

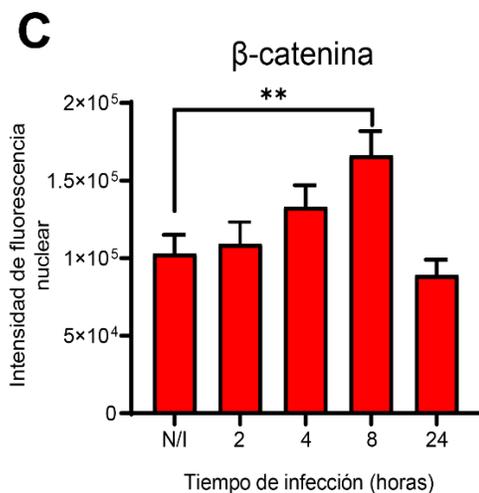
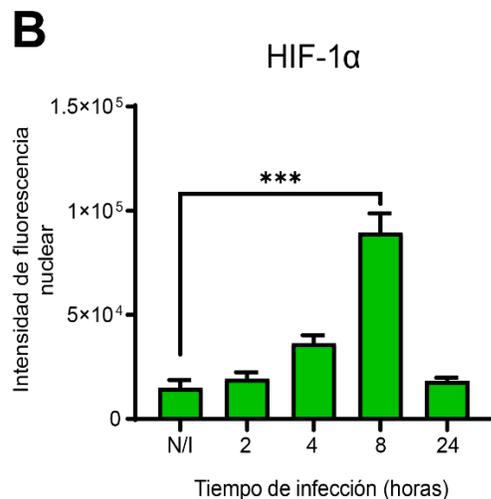
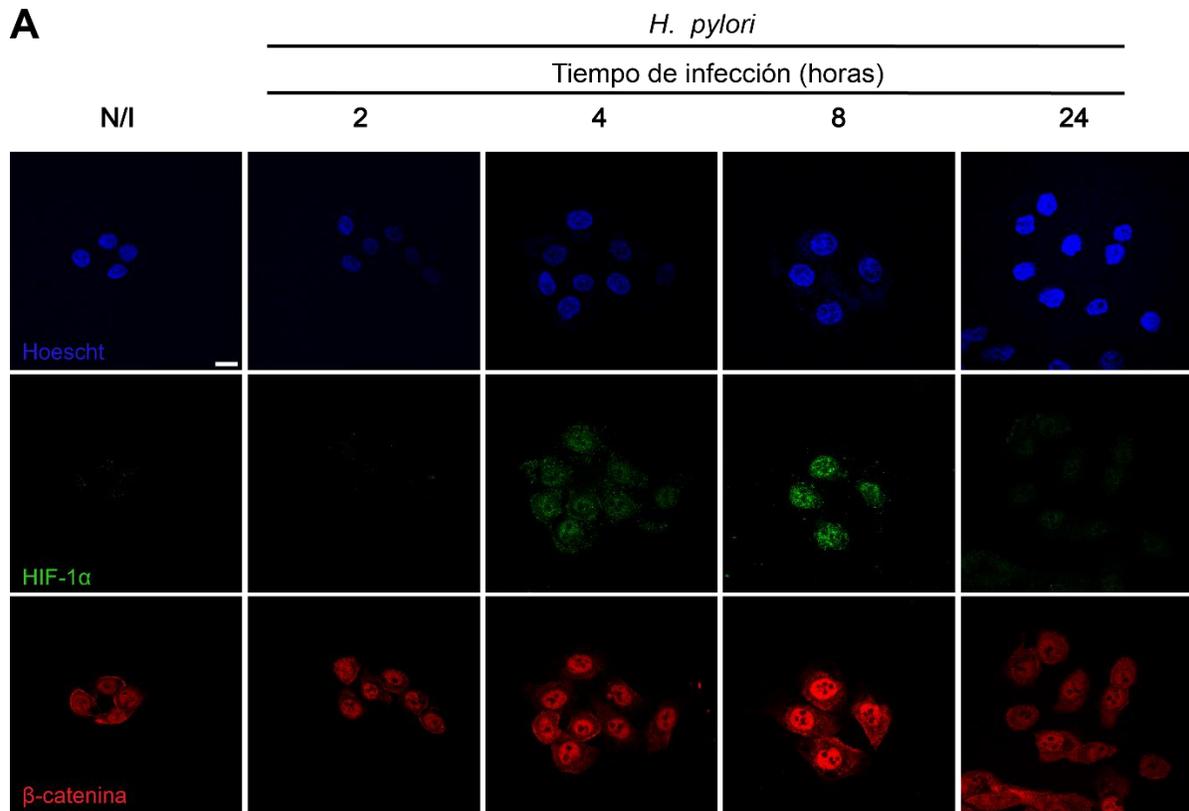
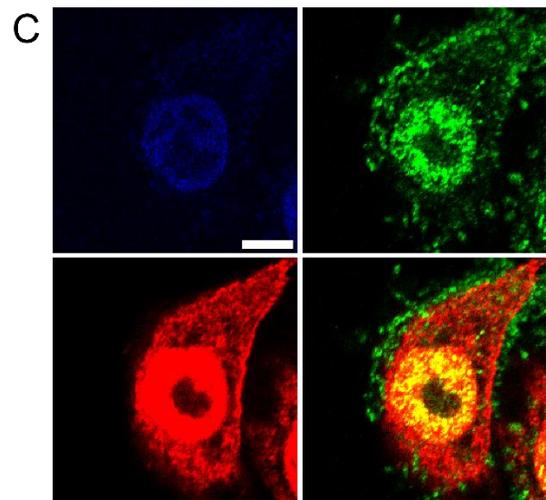
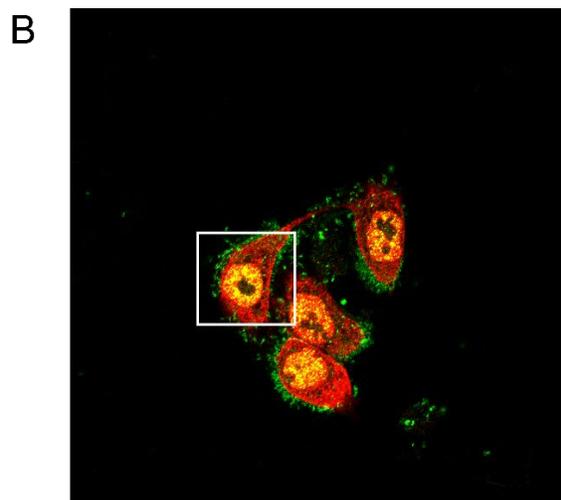
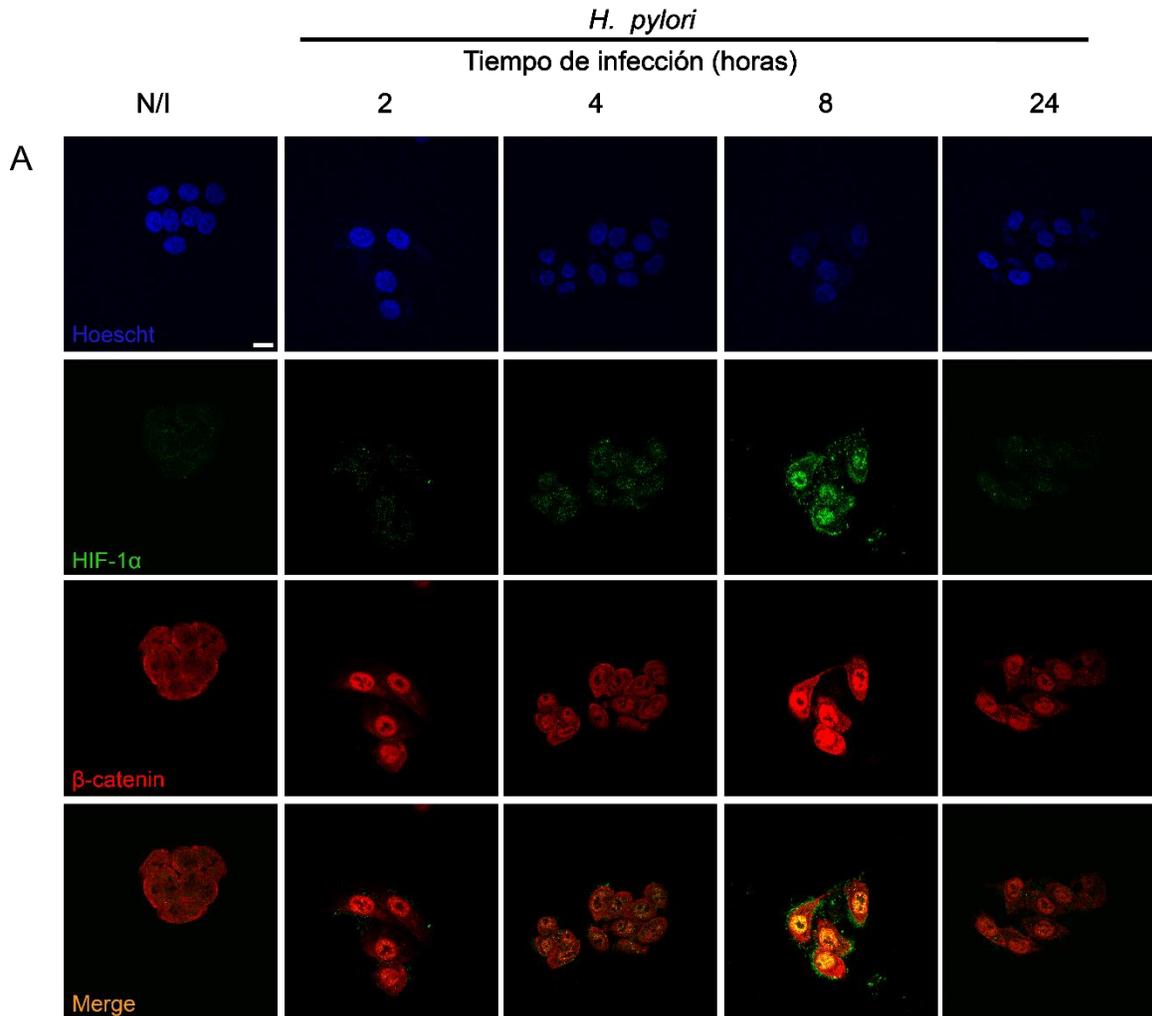


Figura 12: Efecto de la infección con *H. pylori* sobre la localización celular de HIF-1 α y β -Catenina. Células AGS (5×10^5) se sembraron en placas de 6 cm e infectadas con *H. pylori* por los tiempos indicados. Tras cumplirse los tiempos de infección, las células fueron utilizadas para preparar muestras de inmunofluorescencia según lo descrito en el apartado 4.6 de la sección de métodos. **A)** Imágenes representativas de microscopía confocal del efecto de *H. pylori* sobre la localización celular de HIF-1 α y β -Catenina, evaluada mediante inmunofluorescencia (núcleo en azul; HIF-1 α en verde; β -Catenina en rojo). **B-C)** Cuantificación de los niveles de intensidad de fluorescencia nuclear para las proteínas evaluadas. Se determinó la intensidad de fluorescencia de 3 ROI para 3 fotos por condición (barra de escala 20 μ m). (N=4; Promedio \pm SEM. ANOVA de una vía, post-test Dunnett * $p < 0,05$).

5.3 *Helicobacter pylori* induce la asociación nuclear entre HIF-1 α y β -catenina tras 8 horas de infección en células AGS.

Teniendo en cuenta que *H. pylori* produce el incremento de los niveles totales de HIF-1 α y β -catenina a tiempos cortos, observándose además a través de inmunofluorescencia que ambas proteínas translocaban al núcleo celular alcanzando un peak tras 8 horas de infección, es que se procedió a verificar si existe algún tipo de interacción entre estas proteínas. En primera instancia se procedió a realizar un nuevo análisis a las fotografías adquiridas previamente en microscopio confocal, enfocado en el estudio de la colocalización entre las proteínas HIF-1 α y β -catenina en el núcleo de células AGS infectadas con *H. pylori*. Se ejecutó en el software ImageJ un análisis de colocalización para calcular el coeficiente de Manders. Este coeficiente se basa en un arreglo matemático que permite evaluar la cantidad de pixeles asociados a la señal de una proteína que se superponen a los pixeles asociados a la señal de la otra proteína. De esta forma, se obtuvieron perfiles del coeficiente de Manders 1 (pixeles de HIF-1 α superpuestos a pixeles de β -catenina) y de Manders 2 (pixeles de β -catenina superpuestos a pixeles de HIF-1 α) en función del tiempo de infección. Gracias a que se hizo el mismo tipo de análisis de los perfiles de intensidad de fluorescencia, no existió sesgo en el área seleccionada para la medición. Adicionalmente, el análisis en conjunto de ambos coeficientes entrega un resultado más robusto. La figura 13 muestra imágenes representativas de la superposición entre los canales asociados a la señal de HIF-1 α (verde) y β -catenina (rojo). Se observó claramente un aumento en el número de pixeles amarillos (que dan cuenta de la superposición de canales) al llegar a las 8 horas de infección con *H. pylori* y que estos disminuyeron drásticamente luego de 24 horas de infección. En la figura 13 paneles D y E se muestran las gráficas asociadas a la medición de los coeficientes de Manders 1 y 2. Se

observó un aumento de la colocalización entre ambas proteínas alcanzando un peak a 8 horas de infección y disminuyendo tras 24 horas de infección con *H. pylori*.



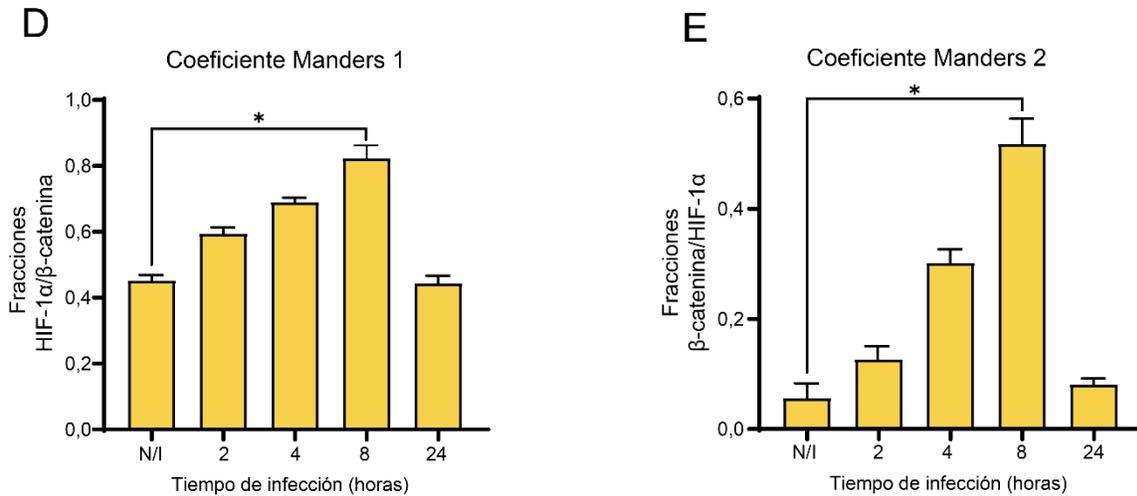


Figura 13. Evaluación de la co-localización entre HIF-1α y β-catenina inducida por *H. pylori*. Las muestras de inmunofluorescencia del punto 5.3 de esta sección fueron utilizadas para llevar a cabo análisis de co-localización por medio de la determinación de los coeficientes de Manders entre HIF-1α y β-catenina. Para esto 3 ROI de tamaño estándar (42x42 pixeles) fueron definidas de forma aleatoria en los núcleos de 3 fotografías por condición sobre las cuales se determinaron los coeficientes de Manders utilizando el plugin JaCoP del programa ImageJ. **A)** Imágenes representativas de inmunofluorescencias en cinética de infecciones con *H. pylori*. Se observan los canales por separado y el merge entre los canales rojo (β-Catenina) y verde (HIF-1α). **B)** Ampliación de imagen representativa de infección de 8 horas. **C)** Ampliación del recuadro enfocado en el panel B, separado en sus cuatro canales. **D-E)** Cuantificaciones de los coeficientes de Manders 1 (D) y 2 (E), comparando contra la condición control no infectado (N/I). (N=3. Promedio ± SEM, ANOVA de una vía, post-test Dunnet. *p<0,05).

5.4 Estandarización de la co-inmunoprecipitación de complejos HIF-1α/β-catenina en células AGS.

Pese a que los resultados obtenidos permiten establecer una relación espacial y temporal entre HIF-1α y β-catenina, no es posible determinar en base a estos estudios si existe una interacción entre estas proteínas. Para ello es necesario determinar dicha interacción mediante una técnica de mayor resolución. Para explorar esta posibilidad se procedió a desarrollar un ensayo de co-inmunoprecipitación y de esta forma determinar la existencia de complejos entre ambas proteínas. Tomando en consideración la localización celular de las proteínas de interés, se pensó que el complejo putativo es formado en el núcleo celular, implicando que la técnica debe ser capaz de romper la membrana celular y nuclear, sin desacoplar la interacción entre proteínas. Teniendo en cuenta estos parámetros, se partió con un protocolo de extracción estándar, utilizando un amortiguador

de lisis que contenía el detergente no iónico NP-40 (1%) e inhibidores de proteasas (descritos en el apartado 4.5 de la sección de métodos). Células AGS sembradas en placas de 100 mm (80% de confluencia) se trataron por 18 horas con el mimético químico de hipoxia desferroxiamina (DFO 100 μ M) para estabilizar a HIF-1 α , se homogenizaron con el amortiguador descrito y se sometieron a incubación con esferas acopladas a anticuerpo primario contra HIF-1 α durante 1 hora. Entonces, los extractos se analizaron mediante SDS-PAGE al 8% y posteriormente las proteínas se detectaron por Western blot. La figura 14 panel A muestra la inmunoprecipitación de HIF-1 α . No se observó una banda en el carril de inmunoprecipitación (IP) y una muy débil en el carril de input (10%). Este resultado nos sugirió que probablemente HIF-1 α , al ser una proteína cuya extracción es de alta complejidad, podía estar siendo degradada durante el proceso de precipitación. Por otro lado, se presentó la opción de inmunoprecipitar a β -catenina, la otra proteína que formaría parte del complejo, siendo esta mucho más estable y simple de analizar. Para comprobar este supuesto, se ejecutó un nuevo experimento utilizando el mismo diseño anterior, esta vez utilizando a β -catenina como proteína inmunoprecipitada. La figura 14B muestra el resultado asociado a la inmunoprecipitación de β -catenina, el cual mostró una banda clara tanto en el carril de IP como en el carril del input (10%). En este caso, no fue posible detectar en ningún carril a HIF-1 α como proteína coprecipitada (no mostrado), lo que reforzó el pensamiento de que esta proteína podía estar siendo degradada y por tanto perdida durante el procedimiento experimental.

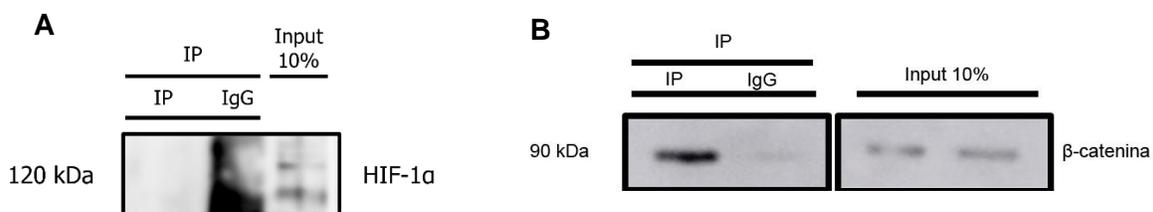


Figura 14: Inmunoprecipitación preliminar de HIF-1 α y β -catenina. Células AGS fueron sembradas (80% de confluencia) y tratadas con DFO 100 μ M por 18 horas para inducir la estabilización de HIF-1 α . Tras cumplido el tiempo de estímulo, las células fueron homogeneizadas con un amortiguador de lisis compuesto por NP-40 (1%) e inhibidores de proteasas. La inmunoprecipitación fue llevada a cabo incubando beads de agarosa acopladas a anticuerpos primarios contra HIF-1 α o β -catenina por 1 hora, tras lo cual los extractos fueron separados mediante geles SDS-PAGE al 8% y analizadas por Western blot. **A)** Inmunoprecipitación preliminar de HIF-1 α , se detectó una débil señal asociada a esta proteína en el carril de input (10%). Sin embargo, no se observó dicha señal en el carril de IP. **B)** Inmunoprecipitación preliminar de β -catenina, donde se detectó que una señal limpia en los carriles esperados.

Los hallazgos presentados permitieron elaborar dos conclusiones. En primer lugar, β -catenina presenta un comportamiento óptimo para ocupar el rol de proteína capturada en complejos; en segundo lugar, se requería un protocolo optimizado para poder detectar efectivamente la presencia de HIF-1 α tanto en la fracción co-inmunoprecipitada, como en input. De esta forma, se determinó que los parámetros críticos en la mantención de la estabilidad de HIF-1 α en los extractos correspondían a composición del amortiguador de lisis, tiempo de incubación y temperatura.

La composición del amortiguador de lisis utilizado para este experimento, como se mencionó previamente, era esencial debido a la necesidad de romper membranas celulares y nucleares sin interferir con la interacción entre proteínas. De esta forma, se optó por una combinación de detergentes no iónicos para elaborar el amortiguador de lisis: NP-40 al 1% y Triton X-100 al 0,1%. Estos detergentes presentan características químicas que les permiten desestabilizar eficientemente membranas celulares y nucleares, sin introducir cargas que puedan afectar interacciones entre proteínas y su uso se encuentra descrito en literatura para la detección de complejos nucleares^{75,76}. Una vez definida la composición del amortiguador, se obtuvieron extractos proteicos totales para determinar la ventana de tiempo de la cual se disponía para trabajar dichas muestras sin llegar a degradar a HIF-1 α . De esta forma, se sembraron células AGS sobre placas de 60 mm a 80% de confluencia y tratadas con DFO, se homogenizaron con el amortiguador descrito suplementado con inhibidores de proteasas e incubadas bajo rotación a 4°C para emular las condiciones experimentales de la co-inmunoprecipitación. Las muestras entonces se incubaron por los tiempos indicados en la figura 15A, que muestra un Western blot representativo de este experimento. Se observó que HIF-1 α se mantuvo detectable en todos los tiempos probados. Sin embargo, tras 35 minutos de incubación la señal asociada a esta proteína bajó considerablemente. Este hallazgo nos sugiere que la sospecha de que la incubación de las muestras de colP se encontraba más allá del tiempo máximo en que se puede tener estable a HIF-1 α era correcta.

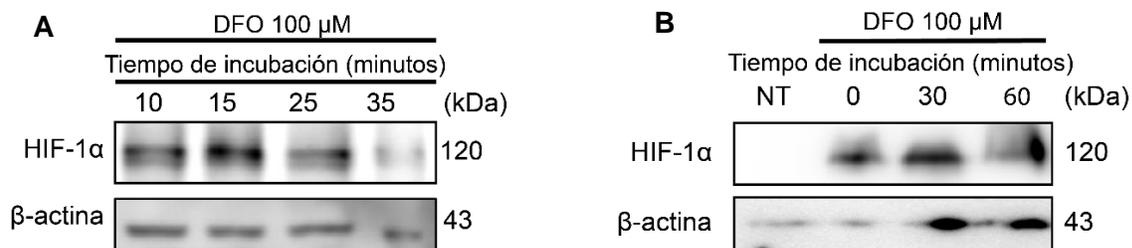


Figura 15: Estandarización de obtención de extractos proteicos para co-inmunoprecipitación. A) Determinación del tiempo máximo de incubación de HIF-1 α . Células AGS fueron sembradas a un 80% de confluencia, tratadas con DFO 100 μ M por 18 horas y luego homogeneizadas con un amortiguador de lisis compuesto por NP-40 (1%) y Tritón X-100 (0,1%) y suplementado con inhibidores de proteasas. Los extractos fueron incubados bajo rotación a 4°C por los tiempos indicados, luego mezclados con amortiguador de carga 4X y separados por geles SDS-PAGE al 8%. Las proteínas de interés fueron analizadas mediante Western blot. **B)** Determinación del tiempo máximo de incubación de los extractos para la detección de HIF-1 α utilizando el amortiguador suplementado con el compuesto MG-132. Células AGS fueron sembradas a un 80% de confluencia, tratadas con DFO 100 μ M por 18 horas y homogeneizadas con el amortiguador descrito en el apartado 4.5 de métodos. Las muestras entonces fueron incubadas por los tiempos indicados y posteriormente mezcladas con amortiguador de carga 4X, calentadas a 90°C por 5 minutos y separadas en geles SDS-PAGE al 8%. Las proteínas de interés fueron analizadas mediante Western blot.

Este hallazgo, indicaba que era indispensable modificar el protocolo y adaptarlo para poder ejecutarlo sin perder a HIF-1 α en las muestras. En este contexto, se probó el uso del inhibidor químico de proteasoma MG132, cuya adición en tampones de lisis ha sido descrita con la capacidad de preservar estable a HIF-1 α en extractos de proteína total⁷⁷. De esta forma, células AGS se sembraron en placas de 100 mm a 80% de confluencia y se homogenizaron con el amortiguador descrito en materiales y métodos. Los extractos entonces se sometieron a una incubación durante 0, 30 y 60 minutos en rotación a 4°C. La figura 15B muestra los resultados asociados a este experimento. Se observó que, utilizando este amortiguador de lisis se siguió detectando la presencia de la banda correspondiente a HIF-1 α tras 60 minutos de incubación. Estos resultados permitieron establecer las condiciones para el experimento de co-inmunoprecipitación, teniendo una detección óptima de las proteínas que formarían parte del complejo a detectar.

5.5 *Helicobacter pylori* induce la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina en células AGS.

La culminación de la estandarización de la técnica se muestra en la figura 16. Células AGS se trataron con el inductor de hipoxia química DFO 100 μ M por 18 horas y se homogenizaron con el amortiguador previamente descrito para luego incubar con un anticuerpo primario específico contra β -catenina, o con una inmunoglobulina control inespecífica. Se observó la inmunoprecipitación de β -catenina de manera clara, encontrándose altamente enriquecida en su precipitación. Este resultado valida la eficiencia

técnica de la inmunoprecipitación. Por otra parte, se determinó que en estas condiciones experimentales el estímulo fue capaz de inducir la coprecipitación de HIF-1 α junto a β -catenina. También se detectó la coprecipitación de la proteína TCF4 junto a β -catenina. Estos datos sugieren dos importantes hallazgos: primero, se detecta el complejo en este modelo celular al estabilizar a HIF-1 α ; segundo, el diseño experimental utilizado es adecuado para observar el fenómeno que se busca.

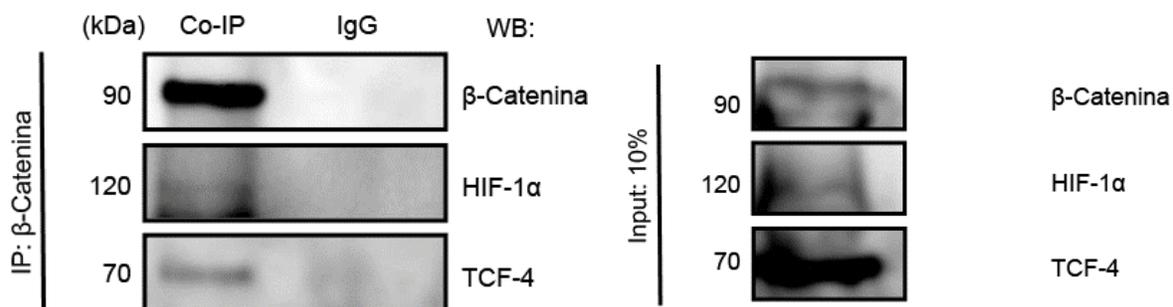


Figura 16: Estandarización de la co-inmunoprecipitación de complejos de β -catenina. Co-inmunoprecipitación estandarizada de complejos de β -catenina. Células AGS fueron sembradas a un 80% de confluencia, tratadas con DFO 100 μ M por 18 horas, para posteriormente llevar a cabo la co-inmunoprecipitación de complejos de β -catenina según lo descrito en el apartado 4.5 de la sección de métodos. Las muestras de coIP fueron separadas en geles SDS-PAGE al 8% y las proteínas de interés fueron detectadas mediante Western blot. Se detectaron las señales esperadas de las proteínas de interés en los carriles de co-IP e input.

Teniendo en cuenta los previos hallazgos, se procedió entonces a realizar experimentos de co-inmunoprecipitación con el objetivo de observar el efecto de *H. pylori* sobre la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina. En este contexto, se procedió a sembrar 6×10^7 células por placa en placas de 10 cm, las que fueron infectadas con *H. pylori* durante 8 horas. Tras cumplirse el tiempo de infección las células se homogenizaron con el amortiguador previamente descrito y sometidas a co-inmunoprecipitación por 1 hora. Tal como en los experimentos anteriores, se ejecutó la inmunoprecipitación de β -catenina y se observó la coprecipitación de HIF-1 α . Los resultados respectivos se pueden apreciar en la figura 20 donde se muestra la inmunoprecipitación de β -catenina. Se detectó una alta eficiencia de la precipitación debido al gran enriquecimiento de la banda característica de β -catenina en los carriles de co-inmunoprecipitación al comparar con los carriles de input. Al mismo tiempo se observó que la señal asociada a la coprecipitación de HIF-1 α se encontraba incrementada en la condición de infección con *H. pylori* en comparación al

control no infectado (N/I). Por otra parte, la presencia de esta proteína no fue detectada en el carril de la IgG control.

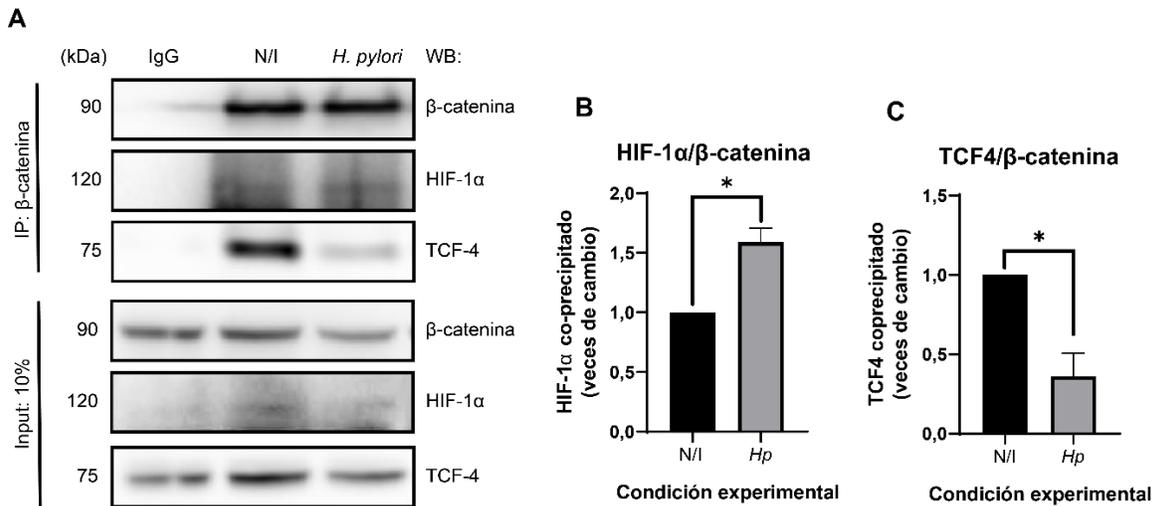


Figura 17: Efecto de *H. pylori* sobre la formación de complejos de β -catenina. Células AGS (6×10^7) fueron sembradas e infectadas por 8 horas con *H. pylori* a MOI 100. Tras cumplir el tiempo de infección, las células fueron utilizadas para preparar muestras para co-inmunoprecipitación según lo descrito en el punto 4.6 de la sección de métodos. Las muestras fueron separadas en geles SDS-PAGE al 8% y las proteínas de interés fueron analizadas mediante Western blot. **A)** Imagen representativa de la co-inmunoprecipitación de complejos HIF-1 α / β -catenina y TCF-4/ β -catenina. **B)** Cuantificación de la formación de complejos HIF-1 α / β -catenina. **C)** Cuantificación de la formación de complejos TCF-4/ β -catenina. Los niveles de HIF-1 α y TCF-4 fueron normalizados en base a los niveles de β -catenina y la condición de infección (*Hp*) fue comparada con la condición control no infectado (N/I) (N=3, Promedio \pm SEM. Test t-student de una muestra, * $p < 0,05$).

De manera muy importante se observó que la infección con *H. pylori* disminuyó notoriamente la coprecipitación de la proteína TCF4. Este hallazgo condujo a preguntarnos si es que la infección con *H. pylori* se encontraba ejerciendo algún tipo de efecto sobre la proteína de TCF-4 que explicase la disminución en su asociación a β -catenina. De esta forma, se realizó una inmunofluorescencia para observar el comportamiento de TCF-4 respecto a su localización celular durante la infección con *H. pylori*. Un número aproximado de 5×10^5 células AGS se sembraron en placas de 6 cm sobre cubreobjetos e infectadas a MOI 100 durante los tiempos indicados en la figura 18. Nuestros resultados muestran que TCF-4 se encontraba localizado en el núcleo celular en el control no infectado (N/I), la cual no se alteró por la infección con *H. pylori* en ningún punto de tiempo observado. Este hallazgo sugiere que la disminución observada en la formación del complejo TCF-4/ β -catenina no era debida una relocalización de TCF-4 por la infección, sino más bien, a un

probable cambio en la afinidad que posee β -catenina para asociarse en complejo con HIF-1 α o TCF-4.

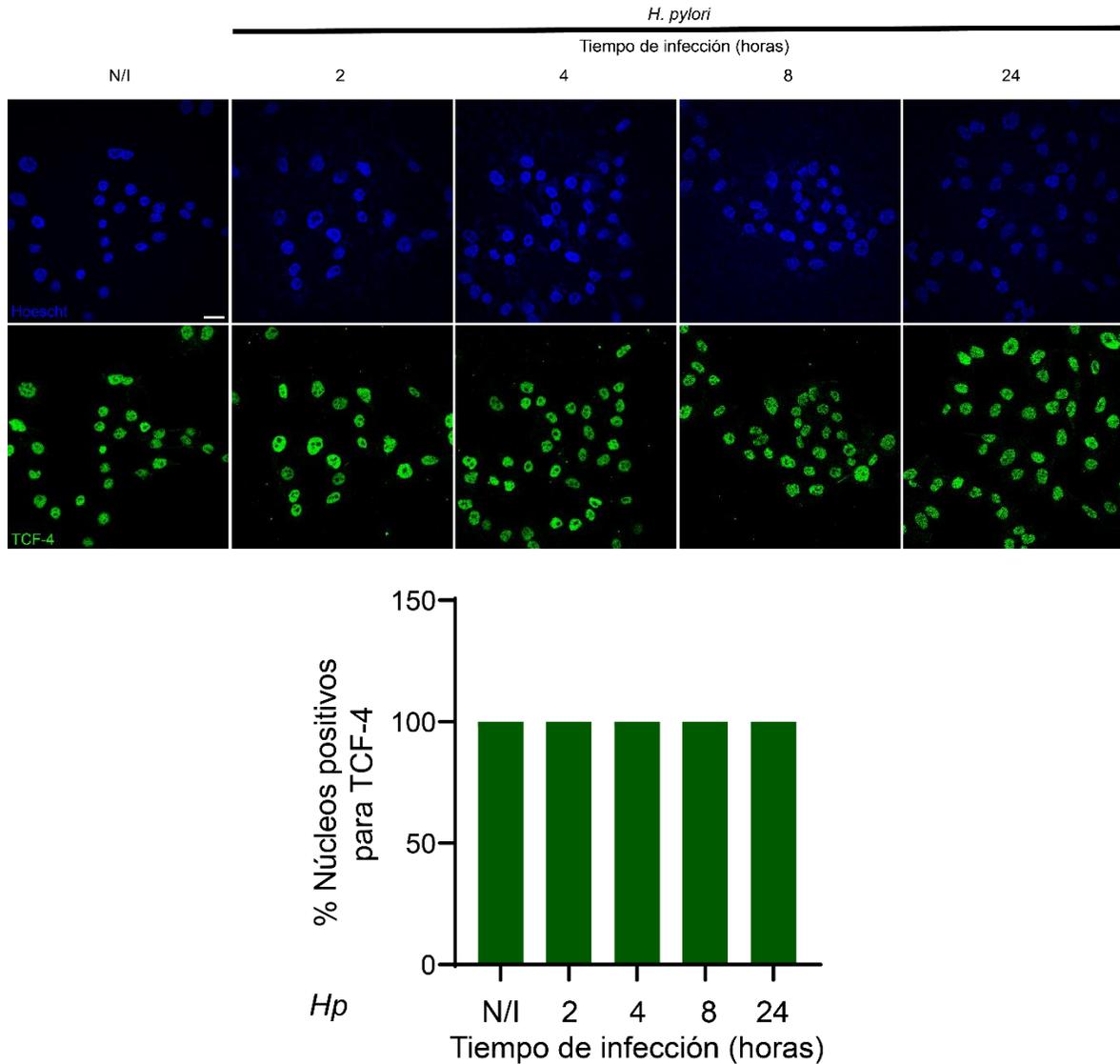


Figura 18: *H. pylori* no altera la localización nuclear de TCF-4 en células AGS. Células AGS (5×10^5) fueron sembradas en placas de 6 cm sobre cubreobjetos e infectadas por los tiempos indicados con *H. pylori* a MOI 100. Tras cumplirse los tiempos de infección, las células fueron utilizadas para realizar estudios de inmunofluorescencia contra TCF-4. Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de TCF-4 (canal verde), detectándose que su localización celular coincide con los núcleos celulares (canal azul) en todos los tiempos de infección con *H. pylori* explorados y la cuantificación correspondiente de núcleos positivos para la señal de TCF-4. Se detectó que en todas las condiciones el 100% de los núcleos celulares presentaban positividad para la señal de TCF-4. (N=3. No hay estadística asociada).

5.6 *Helicobacter pylori* induce la expresión génica dependiente de HIF-1 α

Tras determinar que la acumulación nuclear y asociación en un complejo entre HIF-1 α y β -catenina ocurría luego de 8 horas de infección con *H. pylori* se investigó la posibilidad de que este evento reflejase un cambio en la expresión de blancos transcripcionales de HIF-1 α . Estudios previos demostraron que la infección con *H. pylori* estimula la actividad transcripcional de HIF-1 α ⁶⁰. Los factores HIF-1 α y TCF-4 controlan la transcripción de una gran variedad de genes, muchos de ellos compartidos entre sí, dificultando la elección de genes específicos para su medición. Al revisar bases de datos y literatura, se determinó que los genes que codifican para anhidrasa carbónica 9 (CA9) y c-Myc conforman blancos transcripcionales específicos de HIF-1 α y TCF-4, respectivamente⁵⁸. De esta manera, se diseñaron y adquirieron partidores específicos contra estos genes para cuantificar su expresión mediante RT-qPCR. En primera instancia, se purificó RNA mediante el protocolo de TRIZOL-cloroformo. El RNA extraído se cuantificó y su pureza se analizó mediante el uso de espectrofotómetro, mientras que su integridad se verificó mediante un gel de agarosa al 2%. Posteriormente, se utilizó 1 μ g de RNA para su conversión a cDNA, el cual se utilizó para realizar las curvas de calibración para qPCR de los partidores de interés. La figura suplementaria 1 muestra las curvas de calibración para CA9 y c-Myc y la tabla con los parámetros que determinaron linealidad de la curva y eficiencia de los partidores. Estos datos mostraron un óptimo comportamiento para el ensayo. Con estos resultados, se procedió a realizar los experimentos para determinar la expresión de estos genes en células infectadas con *H. pylori*.

Para los ensayos de RT-qPCR, 2×10^6 células AGS se sembraron e infectaron con *H. pylori* a MOI 100 durante 8 horas. Tras cumplirse el tiempo de infección, se procedió con la obtención de muestras para llevar a cabo los ensayos.

La figura 19 muestra la expresión de los niveles RNA del gen blanco de HIF-1 α , CA9. Se observó un incremento estadísticamente significativo en su expresión tras 8 horas de infección. Este hallazgo, en concordancia con la translocación nuclear de HIF-1 α y la asociación de este factor con β -catenina sugieren que el complejo detectado aumenta la actividad transcripcional. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para establecer una causalidad clara en este contexto.

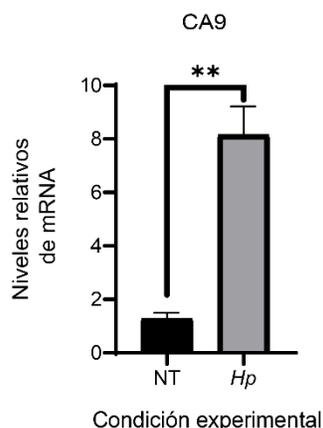


Figura 19: Efecto de *H. pylori* sobre la expresión de CA9. Células AGS (2×10^6) fueron infectadas por 8 horas con *H. pylori* a MOI 100. Tras cumplirse el tiempo de infección, las células fueron tratadas para purificar RNA y posteriormente cDNA. El cDNA obtenido se utilizó para ensayos de RT-qPCR evaluando la expresión de genes de interés. Gráfica representativa de la cuantificación mediante el método $\Delta\Delta Ct$ de los niveles relativos de mRNA de CA9. Se detectó que tras 8 horas de infección con *H. pylori* (condición Hp) hubo un incremento de aproximadamente de 8 veces de cambio respecto a la condición control no infectado (NI) (N=3. Promedio \pm SEM, test t-student pareado).

La figura 20, muestra por otra parte, la expresión relativa asociada al gen blanco específico de TCF-4, c-MYC. En este caso, no se detectaron cambios estadísticamente significativos sobre la expresión de este gen. Este hallazgo sugiere que pese a que un desacoplamiento del complejo TCF-4/ β -catenina es producido durante la infección con *H. pylori*, la porción remanente de dicho complejo podría estar transcripcionalmente activa. Sin embargo, es necesario llevar a cabo más experimentos para comprobar estas observaciones y determinar el comportamiento de este complejo con mayor exactitud.

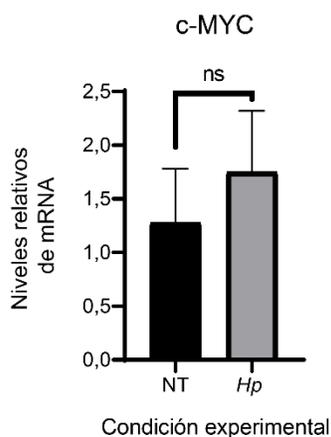


Figura 20: Efecto de *H. pylori* sobre la expresión génica de c-Myc. Células AGS (2×10^6) fueron infectadas por 8 horas con *H. pylori* a MOI 100. Tras cumplirse el tiempo de infección, las células fueron tratadas para purificar RNA y posteriormente cDNA. El cDNA obtenido se utilizó para ensayos de qPCR evaluando la

expresión de genes de interés. Gráfica representativa de la cuantificación mediante el método $\Delta\Delta C_t$ de los niveles relativos de mRNA de *c-Myc*. Tras 8 horas de infección con *H. pylori* no se detectaron cambios estadísticamente significativos en la expresión de *c-Myc* respecto a la condición control sin infección. (N=3. Promedio \pm SEM, test t-student pareado).

6. Discusión

Durante largos años, la bacteria *H. pylori* ha sido ampliamente estudiada por su rol en la gastritis crónica, siendo los fenómenos histológicos caracterizados dentro de la conocida cascada de Pelayo Correa²². Se estima que un 50% de la población mundial se encuentra infectado con esta bacteria, sin embargo, solo un 1,5% de las personas infectadas desarrollan GC^{16,80}. En contraste, sobre un 90% de los casos de GC intestinal corresponden a pacientes positivos para la infección de esta bacteria. En el año 1994 la IARC definió a *H. pylori* como un carcinogeno de tipo I, estableciendo una relación directa entre la infección causada por esta bacteria y la carcinogénesis gástrica de tipo intestinal²³. El rol de *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica es más bien temprano, contribuyendo al daño en el epitelio gástrico, promoviendo la apoptosis de las células infectadas a través de la activación de diversas vías de señalización (Figura 4), dentro de las que destaca la estabilización del factor de transcripción HIF-1 α .

La estabilización de HIF-1 α es un evento clave en la adaptación a hipoxia⁴² mediante la transcripción de genes asociados a procesos como migración, transición epitelio-mesénquima, angiogénesis e invasión^{55,81,82}. Se ha observado que el incremento en los niveles de esta proteína se encuentran relacionado al estado de avance de lesiones precancerosas del revestimiento gástrico, siendo progresivamente mayores desde tejido sano hasta tejidos con displasia leve a moderada⁵⁷. De manera interesante, se encontró que en tejido de pacientes con gastritis atrófica e infectados con la bacteria *H. pylori* había una mayor expresión de HIF-1 α respecto a los pacientes sanos⁵⁷. Sin ir más allá, en el presente trabajo se ha presentado una serie de antecedentes que muestran cómo *H. pylori* es capaz de inducir la estabilización y, por ende, el aumento en los niveles totales así como también la actividad transcripcional de HIF-1 α .

6.1 Estabilización de HIF-1 α y β -catenina por *Helicobacter pylori* y su rol en la carcinogénesis gástrica

El incremento de los niveles de HIF-1 α como resultado de la infección con *H. pylori* se ha caracterizado mediante 3 mecanismos generales (Figura 7). En primer lugar, la producción de ROS contribuye a la estabilización de esta proteína mediante la inhibición de su degradación vía proteosoma^{37,45}; en segundo lugar, la contribución de factores de

virulencia como CagA es un potente activador de inflamación, que conlleva a la transcripción de HIF-1 α dependiente de NF- κ B⁵⁹; y, en tercer lugar, la estabilización de HIF-1 α dependiente del eje de señalización Ureasa/TLR2/PI3K/mTOR, el cual fue caracterizado por nuestro grupo de investigación^{21,60}. En su conjunto, esta serie de mecanismos presentados producen la estabilización de HIF-1 α , produciendo una mayor expresión de genes que codifican para proteínas como VEGF, Mcl-1 y la proteasa Lon, relacionadas a la carcinogénesis gástrica⁸³. Datos de nuestro grupo indican que la infección con esta bacteria estabiliza a HIF-1 α produciendo un aumento en su actividad transcripcional en ensayos de reportero con luciferasa⁶⁰. Sin embargo, pese a que la expresión de blancos como Glut-1 y VEGF aumentó significativamente tras 24 horas de infección, se evidenció que este efecto no dependía de HIF-1 α , ya que células transfectadas establemente con un shRNA contra HIF-1 α e infectadas con *H. pylori* la expresión de estos blancos transcripcionales seguía incrementada. Estos datos sugieren que la expresión de estos blancos no se encuentra gobernada exclusivamente por HIF-1 α . Por otra parte, se observó un rol no transcripcional de HIF-1 α , fomentando la degradación de Ciclina D1 y de esta forma induciendo el arresto del ciclo celular de las células infectadas con *H. pylori*⁶⁰.

Se ha reportado que los niveles de Ciclina D1 se reducen en presencia de agentes genotóxicos, lo que se condice con la presencia de *H. pylori* en este modelo, ya que esta bacteria ha sido ampliamente descrita como inductora de daño al DNA⁸⁴. El rol de HIF-1 α en este contexto podría estar asociado entonces a la supervivencia celular y adaptación a la infección con *H. pylori*, algo que ha sido explorado en el contexto de hipoxia⁵⁸.

En el presente trabajo comprobamos que la infección con *H. pylori* induce un aumento en los niveles totales de la proteína HIF-1 α en células AGS de GC, tal como ha sido descrito previamente^{21,37,59,60}, siendo además capaces de determinar la localización de esta proteína al interior de la célula durante la infección con *H. pylori* (Figura 12A). Nuestros hallazgos determinaron no sólo la existencia de un aumento en los niveles totales, si no que a lo largo de la cinética de infección explorada, HIF-1 α fue progresivamente acumulándose en el núcleo de las células infectadas en conjunto con β -catenina, como mostraron nuestros estudios de inmunofluorescencia (Figuras 12B y 12A). Es importante destacar que por primera vez se evaluó el comportamiento de esta HIF-1 α junto a β -catenina, a pesar de que es conocida su relación en cáncer. Dicha relación ha sido observada como un signo de avance en la progresión tumoral, donde se ha documentado que los niveles tanto de HIF-

1 α como de β -catenina aumentan en conformidad de la progresión de GC^{49,67}. Sin embargo, su relación fuera del contexto de hipoxia tumoral es prácticamente desconocida.

Los factores de virulencia CagA y VacA de *H. pylori* han sido reportados con la capacidad de inducir la estabilización de β -catenina en células AGS, modelo celular de GC utilizado en el presente trabajo³⁶. En este contexto, la capacidad de inducir la estabilización y translocación nuclear por parte de estos factores de virulencia se daba de forma más transitoria que la observada en nuestros resultados. Específicamente, ventanas de tiempo de no más de 4 horas fueron exploradas en relación a VacA, observándose que tras este tiempo, β -catenina volvía a ser secuestrada por GSK3 β -catenina para la inducción de su degradación⁶⁸. En este sentido, la estabilización a tiempos cortos de β -catenina responde principalmente al eje VacA/PI3K/Akt que es capaz de inhibir la degradación dependiente del complejo de destrucción de β -catenina, específicamente, a través de la fosforilación de GSK3 β -catenina, inhibiendo su actividad. En nuestro trabajo, pudimos observar un aumento en los niveles totales de β -catenina a las 2 horas de infección, observándose una ligera fluctuación a las 4 horas de infección, seguida de un incremento tras 8 horas de infección (Figura 11B). Por otra parte, observamos que pese a esta disminución transitoria a las 4 horas de infección en los niveles totales de β -catenina, detectamos una mayor translocación nuclear de esta proteína respecto a las 2 horas de infección, algo no descrito previamente (Figuras 12A y 12C). El incremento observado a 8 horas de infección muestra niveles relativos similares a los observados tras 2 horas, sin embargo, la infección de 8 horas mostró un incremento estadísticamente significativo en relación a la translocación nuclear de β -catenina, indicando que existe una relocalización de esta proteína producto de la infección con *H. pylori* tras 8 horas de infección.

A nuestro entendimiento, esta es la primera vez en que se describe el comportamiento de β -catenina en relación a sus niveles totales y nucleares en células gástricas utilizando la bacteria *H. pylori* completa, explorando hasta 24 horas de incubación, detectando un máximo estadísticamente significativo tras 8 horas de infección respecto al control sin infección.

La infección con *H. pylori* de células gástricas AGS mostró un incremento sobre 10 veces de cambio en HIF-1 α al normalizar con los niveles de β -catenina-actina, lo que concuerda con lo reportado previamente en literatura, demostrando la reproducibilidad de los datos previos^{21,60}. El incremento de HIF-1 α es de carácter transitorio en nuestro modelo, probablemente debido a que HIF-1 α es un represor de su propia transcripción, lo que le

permite mantener su función como una respuesta de tipo aguda respecto a su estímulo canónico de hipoxia^{42,60}. En cáncer, sin embargo, es muy común observar que distintos tipos de tumores sólidos presenten zonas cuyas células expresen diferencialmente HIF-1 α , siendo mayor su expresión en las regiones donde existe una menor concentración de oxígeno. De esta forma, es común observar una mayor expresión de HIF-1 α en conformidad de la progresión tumoral^{47,57}.

HIF-1 α es una proteína que cumple la función canónica de factor transcripcional, por lo que en su secuencia aminoacídica presenta secuencias de destinación nuclear. Por ello, tras su estabilización es esperable encontrar a esta proteína localizada al interior del núcleo celular⁸⁵. Previamente, se reportó la estabilización y translocación nuclear causada por la infección con *H. pylori* tras 4 horas de infección a través de estudios de fraccionamiento celular, sin embargo, estos resultados sólo indican que la proteína de interés se encuentra en el citoplasma o núcleo celular, sin mayor información de la compartimentalización subcelular⁶⁰. El presente trabajo muestra que HIF-1 α experimenta una estabilización desde las 4 horas de infección, alcanzando un máximo entre las 8 y 12 horas de infección. Estos resultados obtenidos por Western blot fueron complementados con ensayos de inmunofluorescencia, en los cuales pudimos determinar el comportamiento de HIF-1 α respecto a su localización celular. Los resultados obtenidos (Figura 12A) muestran un incremento en la intensidad de la señal nuclear de HIF-1 α , alcanzando un máximo tras las 8 horas de infección.

De esta forma en lo que respecta a las actividades experimentales correspondientes al objetivo específico 1, podemos concluir que la infección con *H. pylori* causa un incremento en los niveles totales y acumulación nuclear de las proteínas HIF-1 α y β -catenina en células AGS de GC, alcanzando un máximo tras 8 horas de infección. Las vías específicas por las cuales *H. pylori* se encuentra ejerciendo tales efectos sobre estas proteínas si bien, no han sido parte de este estudio, la literatura sugiere fuertemente una conexión entre el rol del factor de virulencia Ureasa y la cascada de señalización compuesta por TLR2-PI3K/mTOR como principal contribuyente a la estabilización de HIF-1 α , mientras que el rol de VacA puede entregar información sobre los incrementos de β -catenina, sin embargo, mucho queda por dilucidar sobre esta vía de señalización.

6.2 Rol de *Helicobacter* en la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina y posibles implicaciones en la carcinogénesis gástrica

Teniendo en cuenta que tanto HIF-1 α como β -catenina mostraron una relocalización nuclear que alcanzó un máximo tras 8 horas de infección con *H. pylori*, realizamos un segundo análisis a las muestras de inmunofluorescencia, donde determinamos la co-localización entre estas proteínas al interior del núcleo celular. Para este fin, al igual que en los estudios de intensidad de fluorescencia nuclear, definimos ROIs de un área estandarizada y determinamos el coeficiente de Manders en dicha ROI. De esta forma nos fue posible determinar que HIF-1 α y β -catenina no sólo se relocalizan en el núcleo celular tras su estabilización producto de la infección con *H. pylori*, sino que además se encuentran co-localizando en dicho compartimiento (Figura 13).

La determinación de la co-localización entre dos proteínas es una aproximación que nos permite inferir que estas se encuentran en un espacio relativamente cercano, entregándonos una resolución que está intrínsecamente relacionada con el instrumento con el que se adquieren las imágenes analizadas. En este sentido, el microscopio C2 plus Nikon utilizado nos entrega una resolución de 200nm por pixel, lo que en nuestros análisis de co-localización se traduce en que los pixeles de HIF-1 α que se encuentran co-localizando con los pixeles de β -catenina están a 200nm de distancia entre sí. El coeficiente de Manders nos permite calcular la fracción de pixeles de una señal que se encuentran co-localizando con los pixeles de otra señal de interés, en este caso, calculamos la co-localización de HIF-1 α respecto a β -catenina, y además su inverso, el cual indica la fracción de pixeles de β -catenina que co-localizan con los correspondientes HIF-1 α . De esta forma determinamos que existe efectivamente una co-localización entre estas proteínas tras 8 horas de infección, resultado que se correlaciona con la notoria relocalización de HIF-1 α y β -catenina observada en estas células.

Diversos estudios han mostrado previamente que tanto HIF-1 α como β -catenina son capaces de translocar al núcleo celular tras la infección con *H. pylori*, algo que podría esperarse debido al rol transcripcional que cumplen estas proteínas en la célula^{36,60}. Pese a que existe amplio conocimiento de estas proteínas por separado, para nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que describe una asociación espacial a través de inmunofluorescencia entre estas proteínas, y más aún, que dicha asociación sea inducida por la infección con *H. pylori*. Estos datos aportan una valiosa aproximación sobre la

interacción que proponemos en la hipótesis de este trabajo, sin embargo, presenta la limitación técnica de una resolución de 200 nm, la cual no es suficiente para establecer si dos proteínas efectivamente interactúan entre sí. Por otra parte, la técnica de inmunofluorescencia y los análisis de microscopía como la co-localización nos entregan datos suficientemente robustos para establecer que, de existir una asociación espacial entre HIF-1 α y β -catenina, hay una alta probabilidad de que ocurra tras 8 horas de infección y que ocurra en el núcleo celular.

Es importante destacar que en este trabajo no se utilizó hipoxia como inductor de la estabilización de HIF-1 α , por dos razones principalmente: la primera recae en que a pesar de que hipoxia como estabilizante de HIF-1 α e inductor de su interacción con β -catenina está bien descrito en varios modelos (incluso en células AGS), los tiempos de tratamiento no han sido descritos por completo y por lo general incluyen tratamientos de tiempo largo (24 a 48 horas, en algunos casos 72 horas). Estos tiempos son mayores a los cambios observados en nuestro modelo (8 horas). En segundo lugar, el uso de DFO como mimético químico de hipoxia se encuentra bien descrito por nuestro grupo y han sido publicados resultados en este modelo, permitiéndonos un mejor conocimiento y manejo en su utilización como estabilizante de HIF-1 α ^{58,73,74,82}.

Habiendo definido las condiciones necesarias para ejecutar la co-inmunoprecipitación de complejos formados por β -catenina (Figura 16), se procedió a llevar a cabo el experimento con nuestro modelo de infección con *H. pylori*. Nuestros datos arrojaron que, en comparación a la condición control, la infección con *H. pylori* por 8 horas fue, efectivamente, capaz de inducir la co-precipitación de HIF-1 α junto a β -catenina, indicando que estas proteínas se encontrarían formando un complejo producto de la infección. A nuestro entendimiento, esta es la primera vez en que este rol es adjudicado a la infección causada por *H. pylori*. Existe amplia literatura, como se ha mostrado y mencionado previamente, que describen el papel de esta infección en relación a las vías de señalización asociadas a estas proteínas, sin embargo, jamás asociándolas entre sí. El factor de transcripción HIF-1 α ha sido ampliamente estudiado debido a su extenso y fundamental rol en la génesis y progresión del GC, describiéndose cómo su expresión se incrementa durante la cascada premaligna. Específicamente, Griffiths *et al.* describió mediante estudios histopatológicos, que HIF-1 α se encontraba prácticamente ausente en tejido sano, y su expresión se incrementó progresivamente desde gastritis asociada a *H. pylori*, metaplasia intestinal, displasia hasta adenocarcinoma⁵⁷. Se ha establecido que HIF-

1 α controla más de 50 genes que poseen HREs en su región promotora, a través de los cuales fomenta diversos procesos celulares, que permiten la adaptación a hipoxia⁴³. Por otra parte, diversos estudios han descrito la estabilización de β -catenina mediada por la infección con *H. pylori*, sin embargo, varios de estos estudios han descrito un rol asociado a esta bacteria en base a la incubación con factores de virulencia purificados y no a la infección con la bacteria completa⁶⁸. En el presente estudio, fuimos capaces de determinar que la cepa de referencia 26695 de *H. pylori* induce cambios en los niveles totales y en la localización celular de β -catenina y que esta proteína se encuentra asociada a HIF-1 α en un complejo.

La literatura nos presenta a hipoxia como el inductor clásico de HIF-1 α , y, que en presencia de este estímulo, HIF-1 α se estabiliza y desplaza a TCF-4 de su unión con β -catenina, para así unirse a este cofactor transcripcional y promover expresión génica^{58,74,82}. De esta forma, el complejo HIF-1 α / β -catenina es formado como una respuesta de carácter más agudo frente a la hipoxia celular, a través de este complejo la célula se adapta a la baja disponibilidad de oxígeno, con la consecuente disminución de la proliferación y promoción de la supervivencia celular. Por otra parte se ha observado que el tratamiento con ligando Wnt3a, un estimulador canónico de la vía de TCF/ β -catenina, antagoniza el arresto del ciclo celular inducido por hipoxia, promoviendo además la proliferación celular⁵⁴. Estos efectos, por tanto, se pueden observar como contrapartes, opuestos de un fenómeno adaptativo a un estímulo común de encontrar en los tumores sólidos, la hipoxia.

Pese a que existe una amplia cantidad de antecedentes que relacionan y muestran el complejo e intrincado sistema transcripcional compuesto por HIF-1 α , TCF-4 y β -catenina, su presencia en un modelo como el utilizado en el presente trabajo es completamente desconocida, y en la literatura disponible existen muy pocos trabajos que siquiera mencionen a estas tres proteínas en modelos de carcinogénesis gástrica inducida por *H. pylori*. En efecto, para nuestro conocimiento este es el primer trabajo en que se reporte que la infección con *H. pylori* es capaz de inducir la formación de un complejo entre HIF-1 α y β -catenina, y, más aún de que la formación de este complejo promueve la disociación de la interacción entre TCF-4 y β -catenina (Figura 17). Los presentes hallazgos mostraron a través de la co-inmunoprecipitación de complejos formados por β -catenina, que la infección con *H. pylori* induce un incremento de alrededor de 1,5 veces de cambio respecto a la condición control sin infectar en lo que respecta al complejo HIF-1 α / β -catenina (Figura 17B). Notablemente, en estos experimentos se detectó una marcada disminución en cuanto al

complejo TCF-4/ β -catenina, experimentando una disminución sobre el 50% en comparación a la condición control (Figura 17C). En este contexto, es plausible preguntarse si esta disminución de la interacción entre TCF-4 y β -catenina es causada por un efecto adicional de la infección, por ejemplo, a un cambio en los niveles totales de TCF-4 o a que esta proteína experimente cambios en su localización subcelular. En este contexto, nuestros resultados mostraron que la infección con *H. pylori* no se encuentra alterando la localización o niveles de TCF-4 en el núcleo de las células AGS. Es importante señalar que lo esperado es que TCF-4 sea hallado en el núcleo celular, debido a su función intrínseca como factor transcripcional, su secuencia aminoacídica posee señales de destinación nuclear, por tanto no es de extrañar hallar su presencia en el núcleo (Figura 18). Estos análisis dan pie entonces a pensar que los cambios observados en los complejos HIF-1 α / β -catenina y TCF-4/ β -catenina, se deben a un cambio asociado a la preferencia de β -catenina para unirse a una u otra proteína, como ya fue reportado previamente por el grupo de Kaidi *et al.*⁵⁸. A pesar de que los datos presentados en este trabajo son consistentes con este planteamiento, por sí solos son insuficientes para establecer que efectivamente los cambios observados se deben a un cambio en la afinidad de β -catenina para unirse a HIF-1 α de forma preferente en detrimento de TCF-4 en nuestras condiciones experimentales. Es claro que, estos resultados plantean algunas nuevas preguntas, para las cuales se han propuesto experimentos adicionales que permitirían dilucidar de mejor forma lo que sucede con la dinámica observada en estos complejos proteicos. En concreto, se llevarán a cabo infecciones a distintos tiempos con *H. pylori*, evaluando una co-marcación de TCF-4 y β -catenina, utilizando esta vez, un anticuerpo específico contra β -catenina activa (no fosforilada) y verificando si producto de la infección con *H. pylori* β -catenina activa disminuye su co-localización con TCF-4.

Nuestro principal pensamiento en línea con los hallazgos mostrados en este trabajo respecto a los cambios inducidos por *H. pylori* en la dinámica de los complejos formados por β -catenina es que estos complejos tienen una responsabilidad transcripcional diferencial, promoviendo efectos celulares distintos como ha sido reportado^{58,73,74,82}. Existen varios reportes que apoyarían este pensamiento, en primer lugar, el rol de la infección causada por la bacteria *H. pylori* sobre la estabilización de HIF-1 α plantea grandes similitudes con la estabilización “canónica” de HIF-1 α inducida por hipoxia. En efecto, la infección causada por esta bacteria es capaz de montar una respuesta celular altamente compleja, promoviendo la acumulación de ROS y NOS, así como también activando cascadas de señalización celular como la demostrada por nuestro grupo, que, en su

conjunto, logran inhibir la degradación proteosomal de HIF-1 α e incrementar sus niveles totales³⁷. En segundo lugar, los hallazgos presentados en el objetivo 2 de este trabajo, muestran que HIF-1 α no solo se encuentra interactuando con β -catenina a nivel nuclear, sino que esta interacción es a nivel de la formación de un complejo proteico, nunca antes detectado como un evento causado producto de la infección con *H. pylori*. Notablemente, pudimos detectar no solo la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina tras 8 horas de infección, sino que además, el complejo TCF-4/ β -catenina disminuye drásticamente su presencia tras 8 horas de infección, mostrando que β -catenina podría efectivamente modificar su afinidad y unirse preferentemente a HIF-1 α en estas condiciones. En tercer lugar, los efectos asociados a la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina han mostrado que uno de sus principales roles se encontraría en el arresto del ciclo celular, promoviendo la supervivencia de las células bajo hipoxia. De forma consistente con esto, el trabajo de Canales *et al.*⁶⁰ mostró un notorio arresto en el ciclo celular tras 24 horas de infección en comparación al control sin infección⁶⁰, hallazgo que se encuentra parcialmente en línea con el ensayo de viabilidad celular realizado en este trabajo: la figura 3 de material suplementario muestra que la infección con *H. pylori* por 24 horas, no provoca una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular evaluada mediante azul de tripán.

En base a lo reportado en literatura y hallazgos tanto de nuestro grupo, existe una alta probabilidad de que el rol del complejo formado por HIF-1 α y β -catenina se encuentre estrechamente relacionado con la supervivencia celular y que se daría en base a un rol no canónico de HIF-1 α , como lo es la degradación de ciclina D1 para inducir arresto en el ciclo celular^{60,62}. Pese a que nuestro grupo ha investigado el rol transcripcional de HIF-1 α durante la infección con *H. pylori*, el rol preciso de este factor transcripcional no ha sido determinado del todo, puesto que genes blanco clásicos como VEGF o GLUT-1 mostraron un alza incluso cuando HIF-1 α fue noqueado, mostrando que este incremento de mRNA de dichos genes no fue producto de la transcripción mediada por HIF-1 α ⁶⁰. Lo anterior da cuenta del complejo sistema transcripcional del que participan HIF-1 α y TCF-4 mediante su unión a β -catenina, puesto que existen muchos genes blancos compartidos entre HIF-1 α y TCF-4, complejizando la especificidad de los análisis sobre estos genes. Efectivamente, a modo de ejemplo, VEGF es un gen cuya expresión es regulada, tanto por HIF-1 α , como por TCF-4, favoreciendo morfogénesis vascular y angiogénesis *in vitro* e *in vivo*^{43,47,51}. Esta función compartida nos lleva a pensar en la posibilidad de que en una temporalidad temprana post-infección con *H. pylori*, HIF-1 α se encuentra transcripcionalmente activo, lo que se traduce

en una mayor expresión de genes como *VEGF*⁶⁰. Por otro lado, como evento más tardío, el incremento en la expresión génica de blancos compartidos podría ser sostenido gracias TCF-4, tras la caída en los niveles de HIF-1 α . Sin embargo, es necesario realizar más análisis para dilucidar los mecanismos involucrados en el funcionamiento de estos factores transcripcionales en el contexto de la infección por *H. pylori*.

En resumen, los resultados obtenidos en el marco del objetivo específico 2 de este trabajo nos indican que, la infección con *H. pylori* por 8 horas indujo la co-localización entre HIF-1 α y β -catenina y su asociación en un complejo. Notablemente, la infección con *H. pylori* produjo una drástica disminución en la formación del complejo TCF-4/ β -catenina, sin alterar la localización nuclear de TCF-4. En conjunto estos resultados plantean la posibilidad de que β -catenina pueda cambiar su afinidad por estas proteínas como parte de la respuesta adaptativa de las células a la infección con *H. pylori*.

6.3 Rol de *Helicobacter pylori* sobre la expresión de CA9 como blanco transcripcional de HIF-1 α y rol del complejo HIF-1 α / β -catenina

Nuestro siguiente objetivo, fue explorar si los cambios observados respecto a la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina y la disminución del complejo TCF-4/ β -catenina tenían un impacto sobre la expresión de genes controlados específicamente por estos factores transcripcionales. Para este propósito, se realizaron infecciones de 8 horas con *H. pylori* y se evaluó mediante RT-qPCR la expresión génica de CA9 (blanco transcripcional específico de HIF-1 α) y *c-Myc* (blanco transcripcional específico de TCF-4)⁵⁸. Nuestros resultados demostraron que la infección por 8 horas produjo un incremento cercano a 8 veces en la expresión relativa de CA9 en comparación a la condición control (sin infección) (Figura 19). Por otra parte, *c-Myc*, cuya expresión se esperaba disminuida no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición control (sin infección) (Figura 20). Debido a que observamos previamente una disminución en formación del complejo TCF-4/ β -catenina, esperábamos observar también una disminución en la expresión de *c-Myc*. En este contexto, la no variación en la expresión de *c-Myc* podría explicarse en base a dos posibilidades: en primer lugar, si bien existe una importante disminución en la formación del complejo TCF-4/ β -catenina, dicho complejo no desaparece por completo, pudiendo ser este remanente el responsable de la expresión observada en *c-Myc*. En segundo lugar, se ha reportado que TCF1/LEF1 podría inducir la expresión de

genes blanco de forma independiente de β -catenina⁸⁶. Estos autores sin embargo, no incluyen a *c-Myc* dentro de los blancos transcripcionales de su estudio, dificultando la posibilidad de establecer una relación más concreta en este aspecto e inferir si este fenómeno pudiese encontrarse ocurriendo en nuestro modelo. Por otra parte, *c-Myc* es uno de los genes blanco de TCF1 , induciendo su expresión en células del sistema inmune para promover su diferenciación⁸⁷. Estos hallazgos, en conjunto con los antecedentes mostrados abren una gran cantidad de preguntas que implican la posibilidad de establecer nuevas investigaciones para explorar estos aspectos desconocidos aún en nuestro modelo.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se sugiere que HIF-1 α al formar un complejo con β -catenina produce el incremento de la expresión de *CA9*, sin embargo, nuestros resultados no son suficientes para demostrar una causalidad que conecte la formación de este complejo y la expresión de *CA9* como un blanco transcripcional. Para comprobar esto, se han propuesto varias estrategias: en primer lugar se planteó la posibilidad de generar un sistema para interferir con la interacción de HIF-1 α y β -catenina y, de esta forma evitar la formación del complejo. Para este objetivo nos basamos en la posibilidad de que la formación de los complejos responda a un equilibrio químico, en el que en condiciones de estabilización de HIF-1 α promueve la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina⁵⁸. Teniendo en cuenta esta posibilidad se ha realizado la adquisición del plasmidio de Addgene #16512 el cual codifica para la proteína de TCF-4 y cuenta con una etiqueta molecular de Myc. A través de la transfección transitoria de este plasmidio se esperaba inducir un aumento en los niveles totales de TCF-4. Así, al haber una mayor masa de esta proteína el equilibrio se mantuviese inclinado a la formación del complejo TCF-4/ β -catenina, previniendo la formación de complejos HIF-1 α / β -catenina. En este contexto, procedimos con la purificación de dicho plasmidio y células AGS fueron transfectadas de manera transitoria para evaluar la inducción de un incremento en los niveles totales de proteína de este plasmidio. Los resultados arrojaron efectivamente un leve incremento en los niveles totales de TCF-4 al transfectar entre 1 a 2 μ g de pcDNA, indicando que efectivamente, existía un cierto nivel de expresión asociado a la transfección de este plasmidio (Figura S2C). Este resultado, a pesar de parecer auspicioso se debe tomar con precaución, debido a que nos presenta un panorama homogéneo de extractos totales de proteínas, sin indicar la población real de células que expresan la proteína TCF-4 transfectada respecto al total de células en placa.

Este planteamiento experimental resulta entonces dificultoso de lograr por dos motivos principales: en primer lugar, en general, las transfecciones de plasmidios son poco eficientes y dependientes de la línea celular; del total de células transfectadas un determinado porcentaje será capaz de incorporar el plasmidio y expresar la proteína de interés; en segundo lugar y derivado del motivo anterior, se nos presenta una limitante técnica para poder determinar efectivamente el número de células transfectadas con éxito, debido a que para lograr diferenciar la proteína endógena de la expresada exógenamente es necesario detectar el tag molecular Myc que posee esta última. Experimentalmente, la determinación del número de células que expresan este plasmidio se puede llevar a cabo mediante un experimento de inmunofluorescencia, para el cual se requiere llevar a cabo la inmunomarcación de TCF-4 total y por otra parte del marcador molecular Myc, esto, utilizando anticuerpos específicos purificados de especies distintas. Sin embargo, no contamos con herramientas de inmunomarcación que nos permitan marcar el Myc-tag, imposibilitando la ejecución de este diseño experimental. Para tratar de subsanar esto, planteamos un experimento similar, cotransfectando células AGS con el plasmidio pTCF4/Myc y el plasmidio pEGFP y evaluando la eficiencia de dicha cotransfección mediante inmunofluorescencia. Se esperaba en este caso, que la incorporación de un plasmidio fuera capaz de contribuir a la incorporación de un segundo plasmidio en cuestión, como se ha discutido en literatura (Figura S2D). Los resultados asociados a dicho experimento se muestran en la figura 1 del material suplementario, donde se observa que, por una parte TCF-4 se expresa homogéneamente en las células de los campos observados, mientras que sólo una pequeña porción de células analizadas por campo mostraron señales asociadas a la transfección con GFP. Se concluyó entonces a partir de estos resultados que no es posible determinar con las herramientas a nuestra disposición la población efectiva que logra transfectarse y expresar el plasmidio pTCF-4/Myc. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió no continuar con estos experimentos sin contar antes con las herramientas necesarias para determinar efectivamente la población de células transfectadas positivamente.

Debido a estas complicaciones experimentales, se propuso intervenir la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina, utilizando un siRNA para β -catenina (Figura S5). Este trabajo se realizó en colaboración con el Dr. Patricio Silva del laboratorio de Biología Celular y Molecular del Dr. Vicente Torres, donde se adquirió este material y de momento se ha logrado la estandarización de su uso en la línea celular endotelial Ea.hy 926. La figura 4 del material suplementario muestra que la transfección con el siRNA de β -catenina fue efectiva

en todas las condiciones experimentales utilizadas. Este método de silenciamiento resulta bastante conveniente de utilizar debido a dos razones principales: por una parte, su incorporación a las células es mucho más eficiente que una transfección de plasmidios debido al reducido tamaño de un siRNA. Por otra parte, este tipo de transfección genera una disminución aguda de los niveles de la proteína blanco, por lo que, a diferencia de las metodologías de *knockdown*, las células transfectadas no son capaces de montar una respuesta compensatoria sobre la proteína noqueada. Así, se puede obtener información más confiable de los fenómenos observados. La utilización de este material en el modelo celular AGS formará parte entonces del artículo científico que planea publicar los resultados asociados al presente trabajo.

La tercera estrategia experimental que proponemos para intervenir con la formación y evaluar a responsabilidad transcripcional del complejo HIF-1 α / β -catenina es a través de la infección con la cepa de *H. pylori* que posee la delección del factor de virulencia Ureasa. Esta cepa ha sido descrita previamente por nuestro grupo de investigación por no poseer la capacidad de inducir la estabilización de HIF-1 α ²¹. Actualmente nos encontramos en proceso de comenzar a trabajar con esta cepa de *H. pylori* en el marco de la continuación del presente trabajo.

En su conjunto, nuestros resultados muestran por primera vez que la infección con *H. pylori* induce el incremento en los niveles totales de HIF-1 α y β -catenina, fomentando su translocación nuclear y asociación en un complejo con la capacidad de inducir la transcripción de genes blanco de HIF-1 α . La dinámica e intercambio observado en los niveles de los complejos de β -catenina podría dar a conocer una novedosa forma de adaptación celular a estímulos carcinogénicos como lo es la infección con *H. pylori* principal factor de riesgo para el desarrollo de GC de tipo intestinal. Por otra parte, la comprensión de la participación de *H. pylori* sobre el comportamiento de estos complejos proteicos podría contribuir al desarrollo de estrategias terapéuticas enfocadas en la inhibición de la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina y de esta manera contribuir a la prevención de la carcinogénesis gástrica.

7. Conclusiones

1. Se determinó que durante la infección con *H. pylori* en células AGS de cáncer gástrico se produce un incremento en los niveles totales y translocación nuclear de las proteínas HIF-1 α y β -catenina.
2. La infección con *H. pylori* indujo una significativa asociación nuclear entre HIF-1 α y β -catenina en un complejo proteico tras 8 horas de infección en células AGS.
3. La infección de células AGS con *H. pylori* indujo la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina la que fue acompañada por una significativa reducción del complejo TCF-4/ β -catenina.
4. Tras 8 horas de infección en células AGS con *H. pylori*, CA9, gen blanco de HIF-1 α , incrementó sus niveles significativamente respecto al control sin infección, sugiriendo que la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina tiene un rol transcripcional.

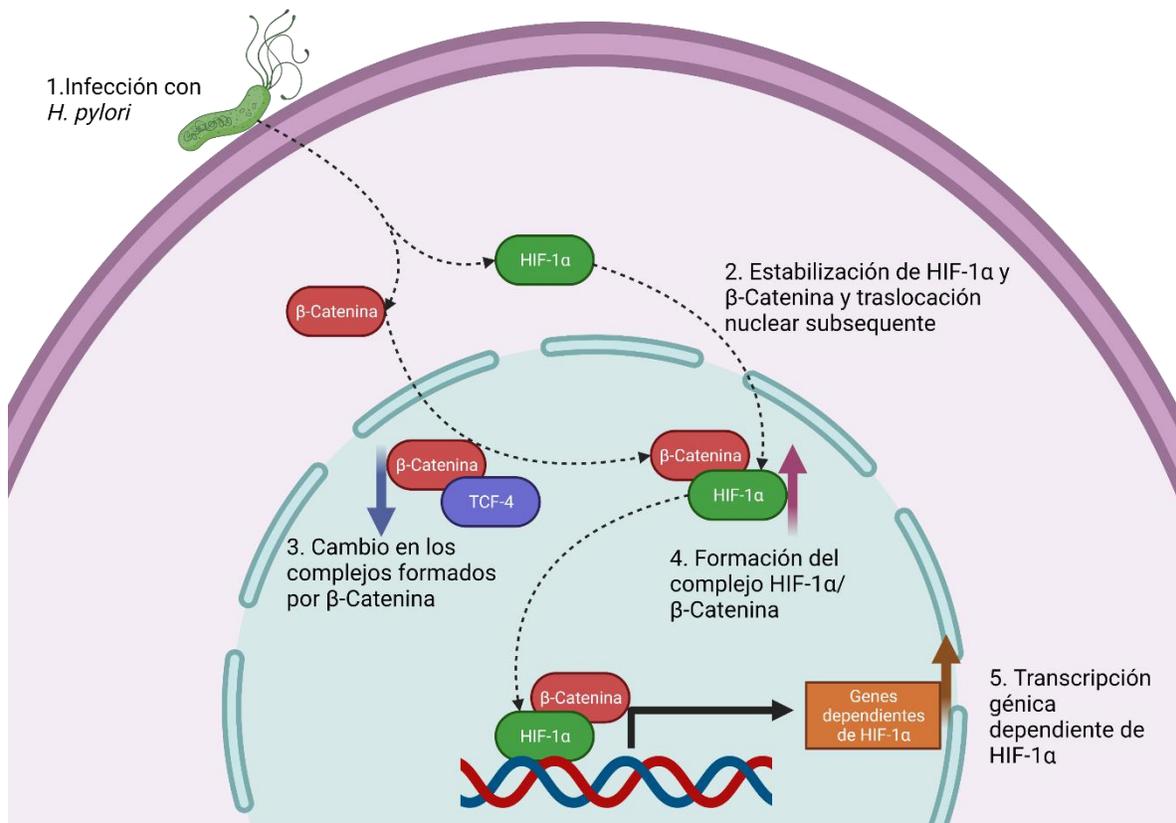


Figura 21: Modelo propuesto. En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo y las conclusiones elaboradas respecto a estos, se propone que el modelo de señalización en células AGS de cáncer gástrico se encuentra compuesto por 5 pasos. 1: Infección con *H. pylori* es responsable a través de diferentes mecanismos

de señalización intracelular dependientes de la acción de sus factores de virulencia, de la estabilización de β -catenina y HIF-1 α . **2:** luego de estabilizarse, HIF-1 α y β -catenina son capaces de translocar al núcleo celular para que sucedan eventos siguientes. **3/4:** Cambios en la formación de complejos de β -catenina, mostrándose la disminución del complejo TCF-4/ β -catenina e incremento de la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina. **5:** El complejo HIF-1 α / β -catenina induce la transcripción de genes dependientes de HIF-1 α como CA9. Estos resultados sugieren que la formación del complejo HIF-1 α / β -catenina es un evento dependiente de la infección causada por *H. pylori* y que podría relacionarse con algunos de los eventos tempranos relacionados a la carcinogénesis gástrica.

8. Bibliografía

1. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).
2. Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R. & Sitarz, R. Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *IJMS* **21**, 4012 (2020).
3. Correa, P. Gastric Cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* **42**, 211–217 (2013).
4. [ecancermedicalsience-2016-article-707.es \(1\).pdf](#).
5. Waldum, H. & Fossmark, R. Gastritis, Gastric Polyps and Gastric Cancer. *IJMS* **22**, 6548 (2021).
6. Palrasu, M., Zaika, E., El-Rifai, W., Que, J. & Zaika, A. I. Role of Bacterial and Viral Pathogens in Gastric Carcinogenesis. *Cancers* **13**, 1878 (2021).
7. Hurme, M., Lahdenpohja, N. & Santtila, S. Gene polymorphisms of interleukins 1 and 10 in infectious and autoimmune diseases. *Annals of Medicine* **30**, 469–473 (1998).
8. Qu, Y., Dang, S. & Hou, P. Gene methylation in gastric cancer. *Clinica Chimica Acta* **424**, 53–65 (2013).
9. Sanjeevaiah, A., Cheedella, N., Hester, C. & Porembka, M. R. Gastric Cancer: Recent Molecular Classification Advances, Racial Disparity, and Management Implications. *JOP* **14**, 217–224 (2018).
10. Guo, X.-F. *TNF- α -308* polymorphism and risk of digestive system cancers: A meta-analysis. *WJG* **19**, 9461 (2013).
11. Pasechnikov, V. Gastric cancer: Prevention, screening and early diagnosis. *WJG* **20**, 13842 (2014).

12. *Tobacco smoke and involuntary smoking: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 11 - 18 June 2002.* (IARC, 2004).
13. Correa, P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* **19 Suppl 1**, S37-43 (1995).
14. Díaz, P., Valenzuela Valderrama, M., Bravo, J. & Quest, A. F. G. *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Adaptive Cellular Mechanisms Involved in Disease Progression. *Front. Microbiol.* **9**, 5 (2018).
15. Venkateshwari, A. *et al.* *Helicobacter pylori* infection in relation to gastric cancer progression. *Indian J Cancer* **48**, 94 (2011).
16. Hooi, J. K. Y. *et al.* Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **153**, 420–429 (2017).
17. Wang, Y.-K. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *WJG* **21**, 11221 (2015).
18. Moyat, M. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *WJG* **20**, 5583 (2014).
19. Ito, N., Tsujimoto, H., Ueno, H., Xie, Q. & Shinomiya, N. *Helicobacter pylori*-Mediated Immunity and Signaling Transduction in Gastric Cancer. *JCM* **9**, 3699 (2020).
20. Weeks, D. L., Eskandari, S., Scott, D. R. & Sachs, G. A H⁺-Gated Urea Channel: The Link between *Helicobacter pylori* Urease and Gastric Colonization. *Science, New Series* **287**, 482–485 (2000).
21. Valenzuela-Valderrama, M. *et al.* The *Helicobacter pylori* Urease Virulence Factor Is Required for the Induction of Hypoxia-Induced Factor-1 α in Gastric Cells. *Cancers* **11**, 799 (2019).
22. Correa, P. Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. 7.

23. *Schistosomes, liver flukes and helicobacter pylori: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 7 - 14 June 1994.* (IARC, 1994).
24. Dunne, C. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *WJG* **20**, 5610 (2014).
25. Muzaaheed. *Helicobacter pylori* Oncogenicity: Mechanism, Prevention, and Risk Factors. *The Scientific World Journal* **2020**, 1–10 (2020).
26. Servetas, S. L., Bridge, D. R. & Merrell, D. S. Molecular mechanisms of gastric cancer initiation and progression by *Helicobacter pylori*. *Current Opinion in Infectious Diseases* **29**, 304–310 (2016).
27. Jang, T. J. & Kim, J. R. Proliferation and apoptosis in gastric antral epithelial cells of patients infected with *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology* **35**, 265–271 (2000).
28. Gong, M., Ling, S. S. M., Lui, S. Y., Yeoh, K. G. & Ho, B. *Helicobacter pylori* γ -Glutamyl Transpeptidase Is a Pathogenic Factor in the Development of Peptic Ulcer Disease. *Gastroenterology* **139**, 564–573 (2010).
29. Suzuki, M. *et al.* *Helicobacter pylori* CagA Phosphorylation-Independent Function in Epithelial Proliferation and Inflammation. *Cell Host & Microbe* **5**, 23–34 (2009).
30. Chu, A. *et al.* *H. pylori* slyD, a novel virulence factor, is associated with Wnt pathway protein expression during gastric disease progression. *Microbial Pathogenesis* **148**, 104428 (2020).
31. Herrero, R. *et al.* Regional variations in *Helicobacter pylori* infection, gastric atrophy and gastric cancer risk: The ENIGMA study in Chile. *PLoS ONE* **15**, e0237515 (2020).
32. Backert, S., Tegtmeyer, N. & Fischer, W. Composition, structure and function of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island encoded type IV secretion system. *Future Microbiology* **10**, 955–965 (2015).

33. Backert, S. & Tegtmeyer, N. Type IV Secretion and Signal Transduction of *Helicobacter pylori* CagA through Interactions with Host Cell Receptors. *Toxins* **9**, 115 (2017).
34. Palrasu, M. *et al.* Bacterial CagA protein compromises tumor suppressor mechanisms in gastric epithelial cells. *Journal of Clinical Investigation* **130**, 2422–2434 (2020).
35. Valenzuela, M. A. *Helicobacter pylori* -induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *WJG* **21**, 12742 (2015).
36. Franco, A. T. *et al.* Activation of β -catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 10646–10651 (2005).
37. Park, J.-H. *et al.* Gastric Epithelial Reactive Oxygen Species Prevent Normoxic Degradation of Hypoxia-inducible Factor-1 α in Gastric Cancer Cells. **9**.
38. Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA and Gastric Cancer: A Paradigm for Hit-and-Run Carcinogenesis. *Cell Host & Microbe* **15**, 306–316 (2014).
39. Gonciarz, W. *et al.* The effect of *Helicobacter pylori* infection and different *H. pylori* components on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and fibroblasts. *PLoS ONE* **14**, e0220636 (2019).
40. Karabay, G. *et al.* Apoptosis and proliferation in gastric epithelium due to *Helicobacter pylori* : An immunohistochemical and ultrastructural study. (2006).
41. Peek, R. M. *et al.* *Helicobacter pylori* cagA⁺ Strains and Dissociation of Gastric Epithelial Cell Proliferation From Apoptosis. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **89**, 863–868 (1997).
42. Semenza, G. L. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. *New England Journal of Medicine* **365**, 537–547 (2011).
43. Kitajima, Y. & Miyazaki, K. The Critical Impact of HIF-1 α on Gastric Cancer Biology. *Cancers* **5**, 15–26 (2013).

44. Semenza, G. L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* **148**, 399–408 (2012).
45. Salceda, S. & Caro, J. Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 22642–22647 (1997).
46. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721–732 (2003).
47. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* **33**, 207–214 (2012).
48. Maxwell, P. H. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 8104–8109 (1997).
49. Griffiths, E. A., Pritchard, S. A., Welch, I. M., Price, P. M. & West, C. M. Is the hypoxia-inducible factor pathway important in gastric cancer? *European Journal of Cancer* **41**, 2792–2805 (2005).
50. Lu, X. & Kang, Y. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Metastasis. *Clin Cancer Res* **16**, 5928–5935 (2010).
51. Torres, P. *et al.* The salivary peptide histatin-1 promotes endothelial cell adhesion, migration, and angiogenesis. *FASEB j.* **31**, 4946–4958 (2017).
52. Chen, L. *et al.* HIF-1 Alpha Overexpression Correlates with Poor Overall Survival and Disease-Free Survival in Gastric Cancer Patients Post-Gastrectomy. *PLoS ONE* **9**, e90678 (2014).
53. Rohwer, N. *et al.* HIF-1 α determines the metastatic potential of gastric cancer cells. *Br J Cancer* **100**, 772–781 (2009).

54. Zhang, Q. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial–mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling. *Carcinogenesis* **34**, 962–973 (2013).
55. Semenza, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in Molecular Medicine* **8**, S62–S67 (2002).
56. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. vol. 75 (Springer Netherlands, 2014).
57. Griffiths, E. A. *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 α expression in the gastric carcinogenesis sequence and its prognostic role in gastric and gastro-oesophageal adenocarcinomas. *Br J Cancer* **96**, 95–103 (2007).
58. Kaidi, A., Williams, A. C. & Paraskeva, C. Interaction between β -catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* **9**, 210–217 (2007).
59. Kang, M.-J., Song, E.-J., Kim, B.-Y., Kim, D.-J. & Park, J.-H. *Helicobacter pylori* Induces Vascular Endothelial Growth Factor Production in Gastric Epithelial Cells Through Hypoxia-Inducible Factor-1 α -Dependent Pathway. *Helicobacter* **19**, 476–483 (2014).
60. Canales, J. *et al.* *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. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, (2017).
61. Lee, D. Y. *et al.* Regulation of SIRT3 signal related metabolic reprogramming in gastric cancer by *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA. *Oncotarget* **8**, 78365–78378 (2017).
62. Goda, N. *et al.* Hypoxia-Inducible Factor 1 α Is Essential for Cell Cycle Arrest during Hypoxia. *Mol Cell Biol* **23**, 359–369 (2003).
63. Scott, D. R., Marcus, E. A., Weeks, D. L. & Sachs, G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **123**, 187–195 (2002).

64. Huelsken, J. & Birchmeier, W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates. *Current Opinion in Genetics & Development* **11**, 547–553 (2001).
65. Reya, T. & Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* **434**, 843–850 (2005).
66. MacDonald, B. T., Tamai, K. & He, X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell* **17**, 9–26 (2009).
67. Chiurillo, M. A. Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *WJEM* **5**, 84 (2015).
68. Nakayama, M. *et al.* Helicobacter pylori VacA-induced Inhibition of GSK3 through the PI3K/Akt Signaling Pathway. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 1612–1619 (2009).
69. Ito, K. *et al.* Loss of Runx3 Is a Key Event in Inducing Precancerous State of the Stomach. *Gastroenterology* **140**, 1536-1546.e8 (2011).
70. Song, X., Xin, N., Wang, W. & Zhao, C. Wnt/ β -catenin, an oncogenic pathway targeted by *H. pylori* in gastric carcinogenesis. *Oncotarget* **6**, 35579–35588 (2015).
71. Hubbi, M. E. *et al.* A Nontranscriptional Role for HIF-1 as a Direct Inhibitor of DNA Replication. *Science Signaling* **6**, ra10–ra10 (2013).
72. Koshiji, M. *et al.* HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J* **23**, 1949–1956 (2004).
73. Zhou, D. *et al.* RON and RON Δ 160 promote gastric cancer cell proliferation, migration, and adaptation to hypoxia via interaction with β -catenin. *Aging* **11**, 2735–2748 (2019).
74. Tang, K. *et al.* HIF-1 α stimulates the progression of oesophageal squamous cell carcinoma by activating the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Br J Cancer* **127**, 474–487 (2022).
75. Burckhardt, C. J., Minna, J. D. & Danuser, G. Co-immunoprecipitation and semi-quantitative immunoblotting for the analysis of protein-protein interactions. *STAR Protocols* **2**, 100644 (2021).

76. Ohh, M. *et al.* The von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Protein Is Required for Proper Assembly of an Extracellular Fibronectin Matrix. *Molecular Cell* **1**, 959–968 (1998).
77. Moroz, E. *et al.* Real-Time Imaging of HIF-1 α Stabilization and Degradation. *PLoS ONE* **4**, e5077 (2009).
78. Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N. D. & Kamangar, F. Gastric Cancer: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Screening, and Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **23**, 700–713 (2014).
79. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* **513**, 202–209 (2014).
80. Eslami, M., Yousefi, B., kokhaei, P., arabkari, V. & Ghasemian, A. Current information on the association of *Helicobacter pylori* with autophagy and gastric cancer. *J Cell Physiol* **234**, 14800–14811 (2019).
81. Lee, J.-W., Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, S.-H. & Kim, K.-W. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* **36**, 1–12 (2004).
82. Zhang, J., Xu, J., Dong, Y. & Huang, B. Down-regulation of HIF-1 α inhibits the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer by inhibiting PI3K/AKT pathway and VEGF expression. *Bioscience Reports* **38**, BSR20180741 (2018).
83. Luo, B. *et al.* ATP-Dependent Lon Protease Contributes to Helicobacter pylori-Induced Gastric Carcinogenesis. *Neoplasia* **18**, 242–252 (2016).
84. Shi, Y. *et al.* Helicobacter pylori -Induced DNA Damage Is a Potential Driver for Human Gastric Cancer AGS Cells. *DNA and Cell Biology* **38**, 272–280 (2019).
85. Depping, R. *et al.* Nuclear translocation of hypoxia-inducible factors (HIFs): Involvement of the classical importin α/β pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1783**, 394–404 (2008).

86. Doumpas, N. *et al.* TCF / LEF dependent and independent transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin target genes. *The EMBO Journal* **38**, e98873 (2019).
87. Gounari, F. & Khazaie, K. TCF-1: a maverick in T cell development and function. *Nat Immunol* **23**, 671–678 (2022).

9. Material suplementario

9.1 Estandarización partidores de qPCR

Con el objetivo de estandarizar los partidores diseñados para evaluar la expresión de los genes de interés en este trabajo, se procedió a evaluar la eficiencia de cada uno de ellos confeccionando curvas de calibración. Para esto, se sembraron células AGS a un 80% de confluencia en placas de 6 cm para posteriormente ser homogeneizadas con TRIZOL. Los lisados fueron entonces utilizados para purificar RNA y posteriormente cDNA. El cDNA resultante fue utilizado en diluciones crecientes (sin diluir, 1:5, 1:25, 1:125, 1:625), evaluándose el porcentaje de eficiencia y R^2 de las curvas obtenidas. Se observaron parámetros aceptables para todos los partidores evaluados, por lo que se decidió utilizarlos para los experimentos a ejecutar en este trabajo.

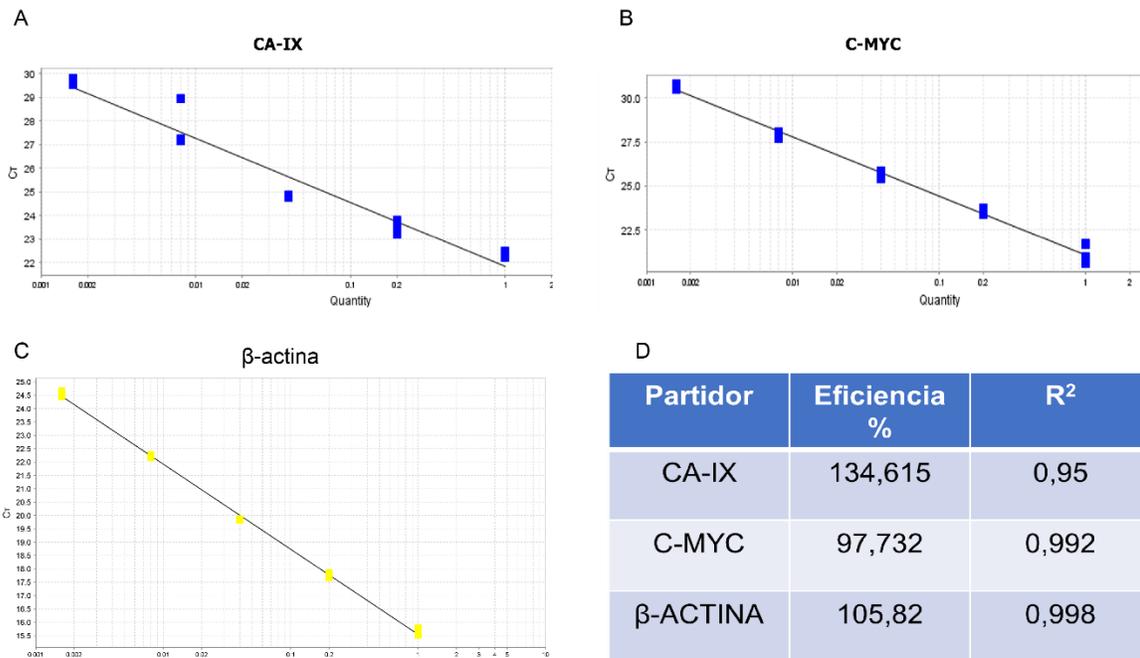


Figura S1: Estandarización de partidores de qPCR. Se estandarizó el uso de los partidores de los genes **(A)** CA9, **(B)** *c-Myc* y como control interno se utilizó a **(C)** β -actina, determinando la eficiencia de cada uno de ellos. Para esto, se obtuvo cDNA de células AGS sembradas a un 80% de confluencia en placas de 6 cm y luego se obtuvieron muestras de cDNA de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 4.7 de la sección de métodos. **(D)** Se evaluó parámetros de eficiencia y linealidad de las curvas confeccionadas, declarando como aceptables los resultados obtenidos para cada uno de los partidores evaluados.

9.2 Transfección de células AGS con el plasmidio pcDNA TCF-4/Myc-tag

Se transfectaron células AGS según el número estipulado en cada ensayo con el plasmidio de sobreexpresión pcDNA c-Myc/TCF-4 (Addgene-16512) o pEGFP utilizando el kit Lipofectamina 3000 (Invitrogen ThermoFisher Scientific). Las células fueron

transfectadas en medio OPTIMEM (Gibco) por 4 horas, tras las cuales se reemplazó el medio por medio RPMI completo, luego, fueron incubadas por 16 a 20 horas para realizar los estímulos correspondientes a cada ensayo.

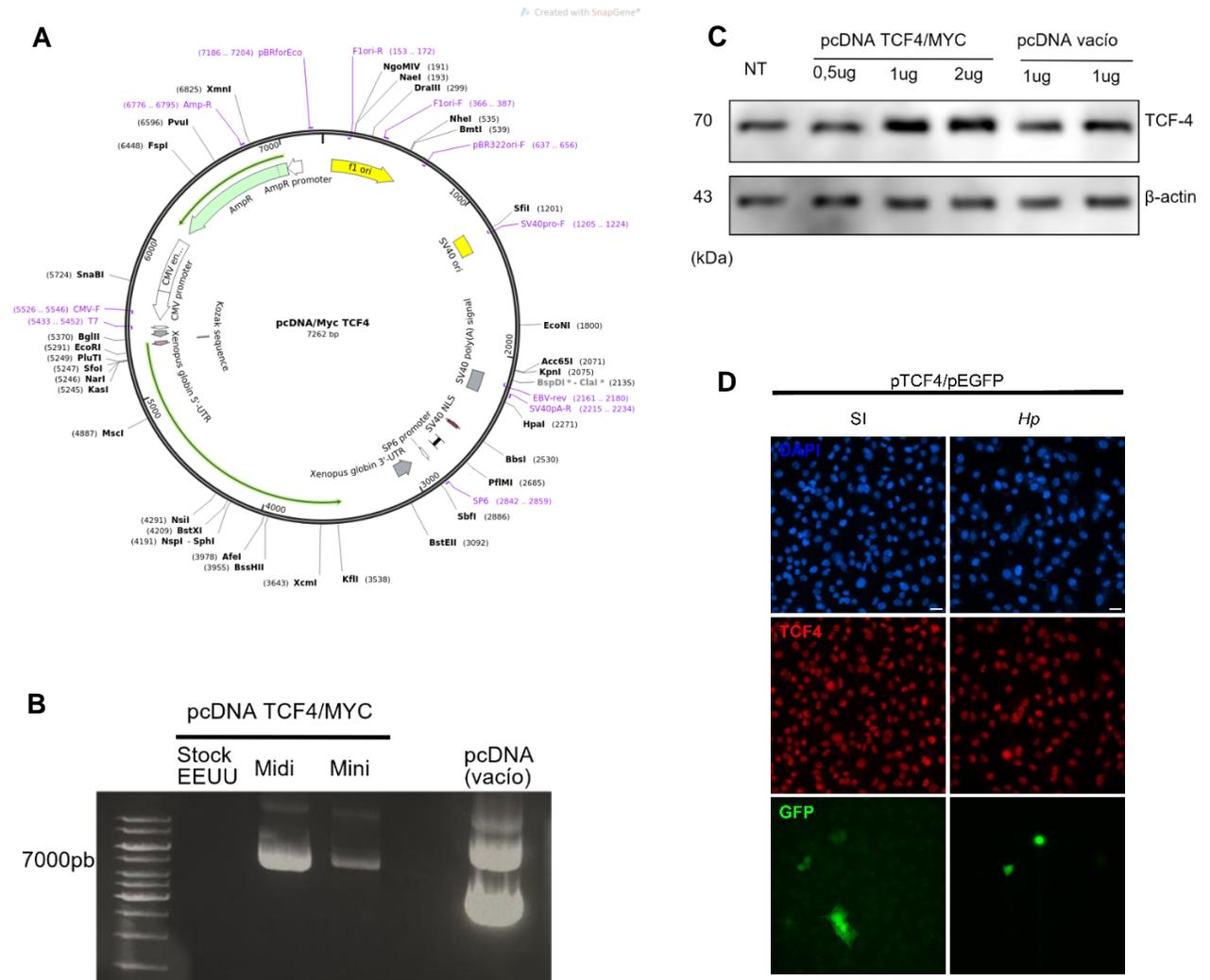


Figura S2: Estandarización de la transfección de células AGS con el plasmidio pcDNA/Myc TCF4. **A)** Representación esquemática de la construcción del plasmidio pcDNA/Myc TCF4. **B)** Gel de agarosa representativo, donde se observa la corrida de distintas purificaciones del plasmidio pcDNA TCF4/MYC y su comparación con un pcDNA vacío. **C)** Western blot representativo de TCF-4 de la transfección en cantidades crecientes del plasmidio pcDNA TCF4/MYC o con pcDNA vacío. **D)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia realizada para evaluar la co-transfección de pcDNA TCF4/MYC y pEGFP (barra de escala 20µm).

9.3 Ensayo de Ligación por Proximidad

En el contexto de la determinación de la interacción entre HIF-1α y β-catenina se propuso como estrategia experimental alternativa a la co-IP la utilización de PLA, este ensayo ha sido ampliamente reportado por su capacidad de entregar resultados robustos y

reproducibles sobre la determinación de interacciones proteína-proteína. Nuestros resultados, sin embargo, fueron contrarios a lo esperado, detectando señales positivas nucleares y citoplásmicas en la condición sin infección (NT) y una total ausencia en la condición de infección con *H. pylori* por 8 horas. En este contexto, se buscaron reportes relacionados a modelos de infección e interacciones entre proteínas detectadas por PLA, sin embargo, no hallamos ninguna publicación que investigase la interacción entre proteínas en un modelo de infección bacteriana utilizando este método. Nuestra suposición al respecto es que la presencia de las bacterias en el medio puede ser un agente interferente en la ejecución de esta técnica, puesto que en su procedimiento se contemplan pasos enzimáticos relativos a la técnica de PCR convencional. Al no contar con más información respecto a estos resultados, no fue posible elaborar conclusiones al respecto.

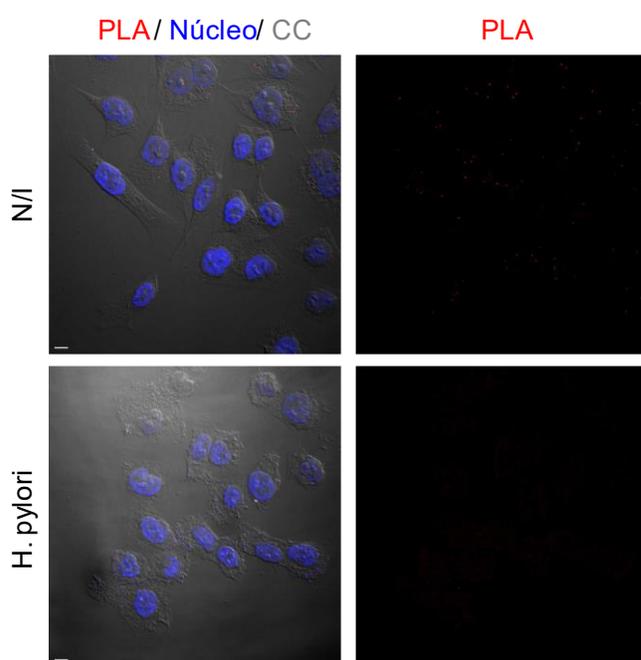


Figura S3: Determinación de la interacción entre HIF-1 α y β -catenina mediante PLA. Imágenes representativas del ensayo PLA (N=3. Barra de escala 20 μ m) Para la determinación de la interacción entre HIF-1 α y β -catenina 8×10^5 células se sembraron en placas de 60mm sobre cubreobjetos de 12 mm. Al menos 4h previo a infectar se cambió el medio por medio completo fresco sin antibióticos. Las células entonces fueron sometidas a los estímulos correspondientes a cada experimento. Tras cumplirse los tiempos de estímulo, las células fueron lavadas con PBS pH 7,2 frío 2 veces y fijadas por 20 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS pH 7,2. Posteriormente las células fueron lavadas dos veces con PBS 1X y permeabilizadas con Tritón X-100 al 0,5% en PBS. Luego, las células fueron bloqueadas con solución de bloqueo proporcionada por el kit DuoLink Proximity Ligation Assay (Sigma) durante 1h a temperatura ambiente. Tras el bloqueo las células fueron incubadas con anticuerpos primarios anti HIF-1 α (1:500, conejo) y anti- β -catenina (1:500, ratón) a 4°C por toda la noche. Luego, las células fueron lavadas con BSA 5% en PBS 2 veces 10min cada una y posteriormente

incubadas por 1h a 37°C con sondas PLA PLUS y MINUS preparadas en solución diluyente de anticuerpos proporcionada por el kit. Las células fueron lavadas con tampón A y posteriormente incubadas con la mezcla de ligación por 30min a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas con tampón A e incubadas con la mezcla de amplificación por 100min a 37°C. Luego las células fueron lavadas con tampón B DuoLink y montadas con medio de montaje Prolong Gold con DAPI proporcionado por el kit. Las muestras fueron visualizadas 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).

9.4 Determinación del efecto de *Helicobacter pylori* sobre la viabilidad celular

Este experimento tuvo por objetivo determinar si *H. pylori* se encontraba produciendo una disminución de la viabilidad en las células luego de 24 horas de infección. Esto, debido a que existe una serie de reportes que ha explorado el rol de *H. pylori* como inductor de muerte celular vía apoptosis, y, una de las preguntas más usuales sobre el trabajo con este modelo de infección (y la comparativa de experimentos en formatos de cinética) es como se ve afectado el número de células sembradas producto de la exposición a este patógeno. De esta forma, 2×10^5 células AGS fueron sembradas en placas de 12 pocillos e infectadas con *H. pylori* a MOI 100 por 24 horas. Transcurrido el período de incubación indicado, el medio fue retirado y las células fueron lavadas dos veces con PBS, para posteriormente ser recolectadas en medio fresco. Un volumen de 20 μ l de suspensión celular fue mezclado con 20 μ l de azul de tripán. El azul de tripán es un compuesto de teñir de dicho color a células cuya membrana se ha vuelto permeable, lo que indica que han perdido viabilidad. Por el contrario, una célula viable no permitirá el ingreso de este colorante y, por tanto, es posible distinguir células viables de las no viables mediante su observación en microscopio. El número de células viables y no viables fue contabilizado utilizando una cámara de Neubauer. La figura suplementaria 4 muestra los resultados obtenidos respecto a la viabilidad celular frente a la infección con *H. pylori* por 24 horas, donde se puede observar que la infección no causó una disminución significativa de la viabilidad de las células. Nuestros resultados, no se condicen del todo con lo reportado previamente, donde se ha observado que la infección por 24 horas con *H. pylori* es capaz de producir una reducción de la viabilidad celular cercana al 50%, sin embargo, en nuestras manos no se ha replicado dicho comportamiento, aun cuando hemos observado una ligera disminución en la viabilidad de las células infectadas esta no es cercana a lo reportado previamente. Hay que tomar en cuenta que, si bien el ensayo de azul de tripán es bastante utilizado y confiable,

posee variables internas que pueden influir en los resultados observados posteriormente. Entre ellas, una variable crítica que se podría discutir y señalar como una de las posibles implicadas en las variaciones observadas respecto a literatura es la incubación con tripsina. La tripsina es una enzima cuya actividad catalítica le permite degradar componentes de anclaje de las células a la matriz donde se encuentran sembradas, siendo ampliamente utilizadas en el cultivo de células adherentes. Sin embargo, su utilización debe ser por un tiempo limitado, tras el cual su actividad debe ser neutralizada (comúnmente con medio de cultivo completo) para evitar que continúe degradando componentes celulares y con ello, produciendo la muerte de las células expuestas. El uso de esta enzima para separar células adherentes de la matriz donde se encuentran sembradas está, además, dado intrínsecamente por el modelo celular utilizado, habiendo células que demoran más que otras en ser “levantadas” de su matriz. En el caso del modelo utilizado en este trabajo, el tiempo de tripsinización de las células AGS fue comúnmente de 4 minutos, tiempo en el cual observamos la separación completa de las células de su matriz sin pérdida de la viabilidad en el posterior subcultivo. Por otra parte, no podemos saltar a conclusiones acerca de si la tripsina utilizada o el tiempo de exposición pudo o no incidir de alguna forma en la mayor caída de la viabilidad reportada previamente, pero en nuestras manos, hemos podido determinar que no fue un factor que incidiera en la viabilidad de ninguna de las condiciones experimentales utilizadas.

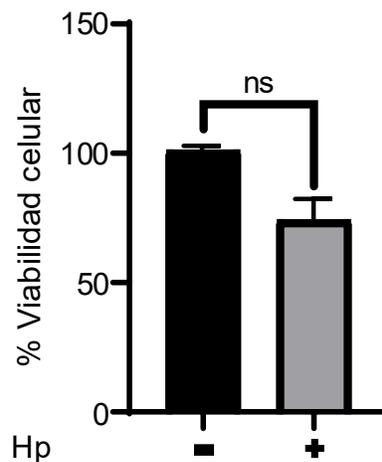


Figura S4: Evaluación de la viabilidad de células AGS frente a *H. pylori*. Células AGS fueron sembradas e infectadas con *H. pylori* a MOI 100 por 24 horas. Tras este tiempo, las células fueron lavadas con PBS tripsinizadas y recolectadas en medio fresco para luego ser mezcladas con azul de tripán. Las células viables y no viables fueron contabilizadas mediante cámara de Neubauer. Se presenta la disminución de la viabilidad en la condición con infección con *H. pylori* por 24 horas respecto a la condición no infectada, a la cual fue asignada

el 100% de viabilidad. Se presenta el promedio de 3 experimentos independientes (N=3; Promedio \pm SEM, test t-student pareado de dos vías, $p < 0,05$).

9.5 Estandarización y ensayos preliminares con siRNA contra β -catenina

En el contexto de la investigación para determinar el rol preciso del complejo formado por HIF-1 α y β -catenina, nos propusimos utilizar la estrategia de siRNA contra β -catenina como una alternativa para producir una disrupción en la formación del complejo. En este sentido, en colaboración con el Dr. Patricio Silva del laboratorio de Biología Celular y Molecular del Dr. Vicente Torres, comenzamos el trabajo asociado a esta estrategia experimental. Se llevó a cabo entonces, la transfección de siRNA en el modelo de células endoteliales Ea.hy 926, proceso tras el cual las células fueron expuestas a estímulos de normoxia e hipoxia (contexto investigativo asociado al Dr. Silva) y los niveles totales de β -catenina fueron evaluados mediante Western blot. Los resultados de este experimento probaron una clara disminución en los niveles de esta proteína (Figura S5A). Tras esto, se procedió a realizar una prueba experimental para evaluar si la transfección no solo disminuye el total de β -catenina en las células, sino que además este efecto pueda tener consecuencias en la migración de las células, siendo este un proceso controlado por la expresión génica asociada a esta proteína. En este contexto, se ejecutó un ensayo de Transwell para evaluar la migración de las células transfectadas con un siRNA control o con el siRNA contra β -catenina, utilizando las mismas condiciones experimentales que en el ensayo de Western blot. Los resultados asociados a este experimento son mostrados en la Figura S5B. Se puede observar que la utilización del siRNA contra β -catenina fue capaz de revertir el efecto promigratorio asociado a hipoxia, indicando la efectividad de esta herramienta para disminuir los niveles totales y procesos asociados a esta proteína. Estos resultados nos animan a utilizar esta estrategia para el trabajo que continuará posteriormente a la presente investigación, con el objetivo de dilucidar los mecanismos y rol específicos del complejo descrito en este trabajo.

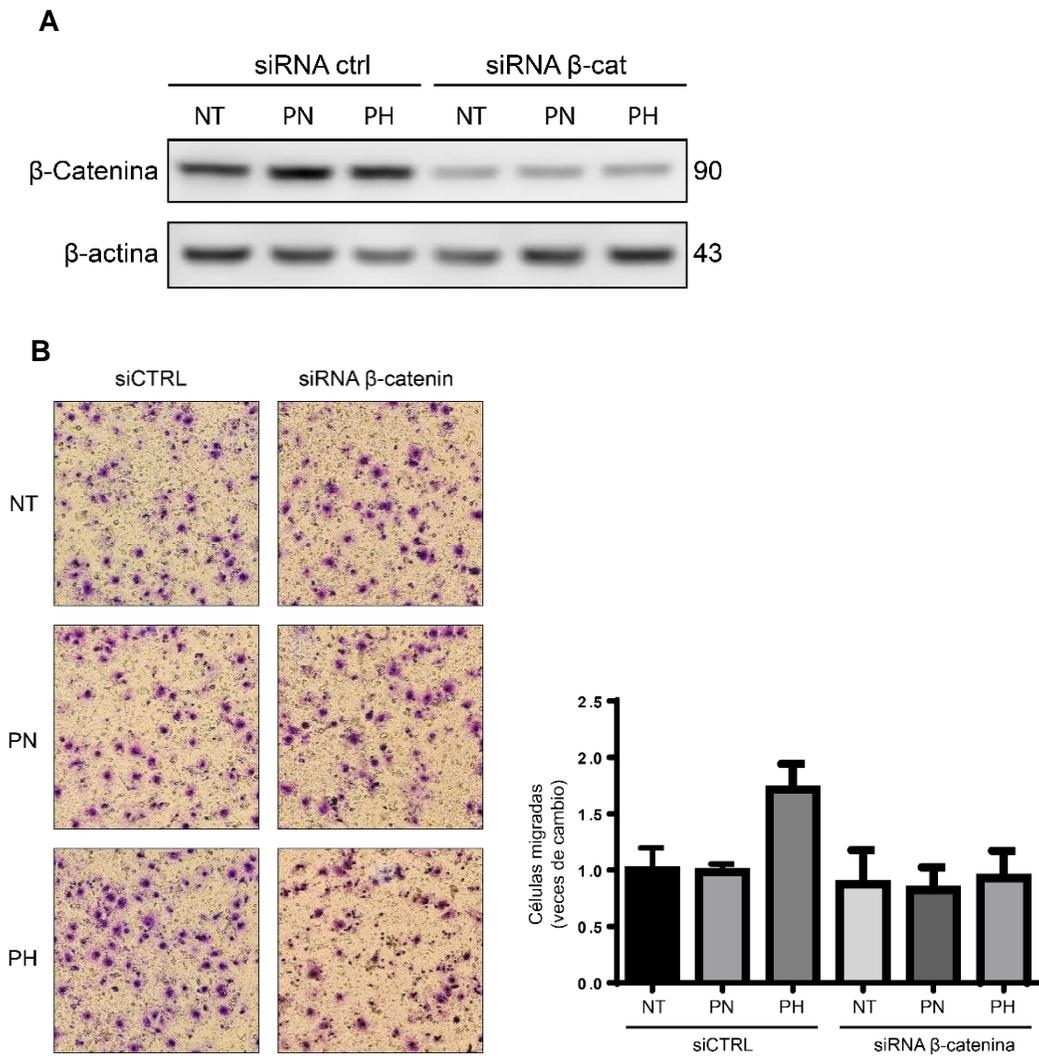


Figura S5: Estandarización del uso y efectividad del siRNA contra β -catenina. **A)** Imagen representativa del Western blot para la evaluación de los niveles totales de β -catenina en células Ea.hy 926 tratadas con siRNA control o siRNA contra β -catenina. **B)** Imágenes representativas de ensayo Transwell para evaluar la migración de células Ea.hy 926 tratadas con el siRNA control o contra β -catenina y su respectiva cuantificación (N=2, Promedio \pm SEM).