

Universidad de Costa Rica  
Facultad de Ciencias Básicas  
Escuela de Biología

Trabajo final de Graduación Modalidad “Tesis de Graduación”  
Para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética Humana

**Expresión de genes involucrados en remodelación de tejido en respuesta a la infección por especies de bacterias del género *Helicobacter* en un sistema de cultivo *in vitro* con una línea celular de cáncer gástrico**

Rebeca Soto Molinari

B26600

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2019

## Miembros del Tribunal

Ph.D. Warner Alpízar Alpízar  
Director de Trabajo Final de Graduación

---

Ph.D. Vanessa Ramírez Mayorga  
Lector de Trabajo Final de Graduación

---

M.Sc. Wendy Malespín Bendaña  
Lector de Trabajo Final de Graduación

---

Ph.D. Gabriela Chavarría Soley  
Miembro del Tribunal

---

Ph.D. Federico Muñoz Rojas  
Vicedecano Facultad de Ciencias  
Presidente del Tribunal

---

Bach. Rebeca Soto Molinari  
Postulante

---

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, 17 de diciembre de 2019

## **Reconocimientos**

A los integrantes de mi Comité Asesor de Trabajo Final de Graduación por la guía, enseñanza y lecciones de aprendizaje inculcadas en esta etapa académica. Al Programa de Especial Interés Institucional de Epidemiología del Cáncer, INISA, por el apoyo y la capacitación brindada. A la Dra. Silvia Molina por su gran contribución al compartir de su experiencia en los procesos metodológicos de estudios en modelos *in vitro* de cáncer gástrico. A los doctores Francis Mégraud, James Fox y Richard Peek Jr. por la donación de cepas bacterianas y líneas celulares que permitieron la realización de esta tesis. Al personal del Programa de Especial Interés Institucional de Epidemiología del Cáncer, en especial a Melany Calderón, Mariana Piedra, Lucía Figueroa y Elena Vásquez por su colaboración con el proyecto. A la Vicerrectoría de Investigación, UCR por el financiamiento para la elaboración de esta investigación. Por último, agradezco a mi familia y amistades por brindarme tantas herramientas de apoyo durante todo el proceso y confiar en mí hasta el final.

## Índice General

Miembros del Tribunal.....	ii
Reconocimientos.....	iii
Resumen.....	viii
Justificación.....	1
Marco teórico.....	3
Aspectos generales del cáncer.....	3
Cáncer gástrico.....	3
Factores de riesgo y patogénesis.....	4
Relación entre <i>H. pylori</i> y el cáncer gástrico.....	6
Patogenicidad variable en cepas de <i>H. pylori</i> .....	7
Remodelación de tejido y su importancia en cáncer.....	9
Sistema de activación de plasminógeno en cáncer gástrico.....	10
Metaloproteinasas de matriz extracelular en cáncer gástrico.....	12
Importancia de uPA, uPAR y MMP-7 en cáncer gástrico.....	16
<i>H. felis</i> en estudios de cáncer.....	16
Sistemas <i>in vitro</i> vs. <i>in vivo</i> .....	17
Objetivos.....	19
Metodología.....	20
Línea celular y condiciones de cultivo.....	20
Cultivo bacteriano y condiciones.....	21
Co-cultivos de línea celular con bacterias <i>Helicobacter spp.</i> .....	21

Extracción de ARN.....	23
Síntesis de ADNc de ARNs totales y PCR tiempo real .....	23
Análisis estadístico.....	24
Resultados.....	25
Cinética de expresión de <i>PLAUR</i> en respuesta a la infección con <i>H. pylori</i> .....	25
Cinética de expresión de <i>PLAU</i> y <i>MMP7</i> en respuesta a la infección con <i>H. pylori</i> .....	26
Cinética de expresión de <i>PLAUR</i> en respuesta a la infección con <i>H. felis</i> .....	26
Expresión de <i>PLAUR</i> , <i>PLAU</i> y <i>MMP7</i> en las líneas celulares de cáncer gástrico MKN-45 y MKN-74.....	27
Discusión.....	31
Conclusiones y recomendaciones.....	39
Bibliografía.....	41

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro I.</b> Código de identificación de las sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) utilizadas para cada gen de estudio y tamaños de los amplicones obtenidos en la RT-qPCR.....	24
--	----

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Cinética de expresión del gen <i>PLAUR</i> en la línea celular AGS para diferentes tiempos de infección con la bacteria.....	25
<b>Figura 2.</b> Cinética de expresión del gen <i>PLAUR</i> en la línea celular AGS co-cultivada con la cepa SS1 de <i>H. pylori</i> .....	26
<b>Figura 3.</b> Cinética de expresión del gen <i>PLAUR</i> para dos experimentos de infección en la línea celular AGS co-cultivada con la bacteria <i>H. felis</i> .....	27
<b>Figura 4.</b> Inducción del fenotipo “colibrí” en células MKN-45 tras la infección con la cepa 7.13 de <i>H. pylori</i> .....	29
<b>Figura 5.</b> Expresión relativa para los genes <i>PLAUR</i> , <i>PLAU</i> y <i>MMP-7</i> en la línea celular MKN-45 a distintos tiempos de infección con la cepa 7.13 de <i>H. pylori</i> .....	30

## Resumen

El cáncer gástrico (CG) es la consecuencia final de una secuencia de eventos precancerosos iniciados por factores ambientales y la infección por *Helicobacter pylori*. A pesar de ser considerada como el principal factor de riesgo para esta neoplasia, la gran mayoría de personas infectadas con esta bacteria no desarrolla CG. Los mecanismos biológicos que explican cómo es que esta bacteria, y sus factores de virulencia, alteran los procesos fisiológicos normales aún no están claros. La invasión de células malignas al tejido sano adyacente y la eventual metástasis, son eventos cruciales del desarrollo y la progresión del cáncer. Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y el sistema activador de plasminógeno participan activamente en la remodelación de tejido que ocurre durante estos procesos. La expresión elevada de algunas proteínas de estos grupos ha sido correlacionada con aspectos clínico-patológicos del CG, entre ellos mayor agresividad y baja sobrevida.

Esta investigación tenía como objetivo determinar la expresión, a nivel de ARNm, de tres genes involucrados en remodelación de tejido (*PLAU*, *PLAUR* y *MMP-7*), en respuesta a la infección por bacterias del género *Helicobacter* en un sistema de cultivo *in vitro*; así como evaluar un modelo para estudiar el rol de éstos en la etiología del CG. La expresión de *PLAU* y *MMP-7* no fue detectada en ninguno de los experimentos en la línea celular AGS, lo cual indica que no existe expresión basal de estos genes, ni inducción por parte de las bacterias, en este modelo *in vitro*. Sin embargo, los estudios cinéticos de expresión para el gen *PLAUR* revelaron que éste es expresado en un nivel basal, alcanzando su pico máximo de expresión (1.45 veces respecto al gen de referencia) a las 12 horas post-infección con la cepa 26695 de *H. pylori*, aunque no se alcanzó significancia estadística. A nivel descriptivo, se determinó que la infección por *H. felis* induce la expresión de *PLAUR* a las 36 horas post-infección, con un aumento de 12.89 veces respecto al gen de referencia.

Dado a que *PLAU* y *MMP-7* no son expresados en la línea celular AGS, se decidió evaluar la expresión de todos los genes en estudio en otras líneas celulares (MKN-45 y MKN-74), lo cual representó experimentos adicionales a los inicialmente propuestos. Estos análisis revelaron que las células MKN-45 expresan de forma basal los tres genes, y que el co-cultivo de ésta con la cepa 7.13 de *H. pylori* induce un aumento significativo en la

expresión de los genes *PLAU* y *PLAUR* a las 24 horas post-infección. Este resultado sugiere, que la línea celular MKN-45 es más adecuada para estudiar la cinética de expresión de estos genes en futuros estudios *in vitro*, enfocados a responder interrogantes puntuales. En conclusión, el establecimiento de modelos *in vitro* estandarizados para estudiar aspectos propios del papel que juega *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica es un proceso complejo. Lo recomendable, antes de iniciar un estudio puntual en una plataforma *in vitro*, es realizar pruebas piloto, para determinar cuáles líneas celulares y cepas son las más apropiadas en cada caso.

**Palabras clave:** Cáncer gástrico, *Helicobacter pylori*, remodeladores de tejido, biomarcadores pronóstico, expresión génica.

## Justificación

Debido a que el cáncer es una enfermedad altamente compleja y cada vez más recurrente en la población mundial, existe una creciente necesidad de realizar estudios para generar conocimiento sobre aspectos etiológicos, epidemiológicos, moleculares, terapéuticos y de prevención, que aporten al manejo y entendimiento de esta enfermedad. Dentro de los tipos de cáncer más comunes, el cáncer gástrico (CG) es el quinto con mayor incidencia y el tercero en mortalidad a nivel mundial (GCO, 2018; Bray *et al.*, 2018). Además, Costa Rica se destaca en el mundo y en la región latinoamericana por presentar elevadas tasas de incidencia y mortalidad (GCO, 2018). El CG se sitúa en el primer lugar de mortalidad en nuestro país y en el cuarto de incidencia, luego del cáncer de próstata, mama y colorrectal (GCO, 2018). Éste cáncer se ha mantenido a través de los años como uno de los tipos de cáncer más mortales, debido a que en la mayoría de los casos el diagnóstico es tardío y por tanto, las posibilidades de tratamiento son reducidas (Rugge *et al.*, 2015). El conocer más sobre los factores de riesgo y especialmente abordar el tema de prevención, pueden ser factores determinantes para disminuir las alarmantes estadísticas de este adenocarcinoma.

La caracterización del patrón de expresión de genes asociados con diferentes aspectos de la biología tumoral es clave porque permite entender mejor su rol en el inicio, promoción y progresión de la enfermedad. Este proyecto pretendía determinar si la expresión de genes involucrados en la remodelación de tejido que se da en el contexto de la invasión local de las células malignas y la metástasis que ocurren durante la progresión tumoral, es inducida específicamente en respuesta a la infección por *H. pylori*; o si otras especies del género *Helicobacter* podrían recapitular este fenómeno. Asimismo, este proyecto contribuye a dilucidar 1) cuáles cepas de *H. pylori* logran inducir la expresión de estas moléculas en fases tempranas de la carcinogénesis gástrica; 2) si la inducción de estas proteínas es independiente de la respuesta inflamatoria asociada a la infección de la bacteria; y 3) un sistema de cultivo *in vitro* apropiado para estudiar este fenómeno.

Este proyecto fue desarrollado en el marco de un proyecto más amplio inscrito en la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (número de proyecto 810-B7-281) y se desarrolló en el marco del Programa de Especial Interés Institucional de Epidemiología del Cáncer, del Instituto de Investigaciones en Salud (INISA).

## **Marco teórico**

### **Aspectos generales del cáncer**

El cáncer es un grupo de casi 200 tipos de enfermedades complejas, responsable de millones de muertes que ocurren anualmente alrededor del mundo, superando incluso al número de muertes causadas por las enfermedades cardiovasculares (Dass *et al.*, 2008; Ferlay *et al.*, 2015). Estas son enfermedades multifactoriales, con distintos factores de riesgo, etiología y comportamiento biológico según el tipo de cáncer u órgano afectado, y también con variación importante entre cada individuo; lo que hace el estudio del cáncer aún más complejo (Katsios y Roukos, 2010; Ma y Tao, 2012). En respuesta a este panorama, los investigadores se enfrentan a la constante búsqueda de estrategias para la prevención, detección temprana y tratamiento, que logren disminuir la incidencia y/o mortalidad de estas malignidades. Es por lo tanto necesario entender mejor los procesos moleculares que definen el origen, desarrollo y progresión del cáncer, así como la identificación de sus factores de riesgo (Dass *et al.*, 2008).

### **Cáncer gástrico**

El CG es el quinto cáncer más común y el tercero más mortal a nivel mundial (GCO, 2018; Bray *et al.*, 2018); lo que lo convierte en uno de los tipos de cáncer con mayor relevancia en el área de investigación médica y científica (Hu *et al.*, 2012; Ma y Tao, 2012). A pesar de la alta prevalencia de este cáncer mundialmente, muchos estudios epidemiológicos que comparan sus tasas de incidencia y de mortalidad han encontrado resultados muy heterogéneos entre regiones del mundo (de Martel *et al.*, 2013). Según los datos del Global Cancer Observatory (2018), países asiáticos como China y Japón, centroamericanos como Costa Rica y Guatemala, y suramericanos como Colombia, destacan por sus altas tasas de incidencia y mortalidad por CG. Sin embargo, a pesar de que la incidencia ha disminuido en las últimas décadas, el CG continúa siendo un desafío debido a que su diagnóstico suele ser en etapas muy avanzadas, cuando el pronóstico es malo y las opciones de tratamiento limitadas (Rugge *et al.*, 2015).

El CG se puede clasificar según sus características histopatológicas. Aunque existen varios esquemas de clasificación, la clasificación de Lauren es uno de los más utilizados y divide a esta neoplasia en dos categorías principales; el tipo difuso, que se caracteriza a grandes rasgos por la ausencia de uniones intracelulares y el tipo intestinal que sí presenta estas uniones (Lauren, 1965). Adicionalmente, una tercera categoría fue añadida, el tipo mixto, donde se observa una histología combinada de los dos tipos anteriormente mencionados, con la presencia de ambas características; donde algunas secciones de la biopsia o tejido quirúrgico presentan uniones intracelulares y otras no. La tasa de prevalencia de los tipos intestinal y difuso varía geográficamente, sin embargo el tipo intestinal es el más común globalmente (Hu *et al.*, 2012; Sitarz, *et al.*, 2018). En cuanto a la etiología de cada uno de estos tipos histológicos de cáncer, se ha observado que el tipo intestinal es más usualmente relacionado con factores ambientales como la infección con *H. pylori*, la dieta y el estilo de vida; mientras el tipo difuso es comúnmente asociado con alteraciones genéticas (Hu *et al.*, 2012). Además, se ha reportado que el CG de tipo intestinal está asociado con gastritis crónica atrófica y metaplasia intestinal, mientras el tipo difuso se origina de mucosa gástrica normal y no presenta evidencia que lo relacione con la cascada de eventos pre-neoplásicos que sí caracteriza al CG de tipo intestinal (Sitarz, *et al.*, 2018).

### **Factores de riesgo y patogénesis**

Dentro de las posibles razones asociadas a las marcadas diferencias en incidencia entre regiones geográficas, se consideran factores de riesgo extrínsecos o ambientales como la dieta y el estilo de vida, e igualmente factores intrínsecos como lo son la composición genética de los individuos y las poblaciones. Sin embargo, la infección por la bacteria *Helicobacter pylori* es el principal factor de riesgo para el desarrollo del CG (Parsonnet *et al.*, 1991; Blaser *et al.*, 1995; Parsonnet *et al.*, 1997; Matysiak-Budnik y Mégraud, 2006; Plummer *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Mégraud *et al.*, 2015). Incluso, esta bacteria ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer como un carcinógeno humano clase I (International Agency for Research on Cancer, 1994). Entre los principales factores de riesgo intrínsecos asociados a la infección con la bacteria destacan la

respuesta inmune del hospedero a patógenos y los factores específicos de los patógenos (Crawford *et al.*, 2003; Piazuelo y Correa, 2013; Mégraud *et al.*, 2015).

La patogénesis del CG incluye una secuencia de eventos histológicos bien caracterizados, al menos para el CG de tipo intestinal. Inicia con una gastritis crónica superficial, la cual puede ser inducida por *H. pylori* y otros factores principalmente relacionados con la dieta; en aproximadamente un décimo de los casos ésta progresa a una gastritis atrófica. En un subgrupo aún menor de los casos, la gastritis atrófica avanza a una metaplasia intestinal, displasia y eventualmente a una neoplasia o adenocarcinoma gástrico (Wroblewski, Peek y Wilson, 2010; Piazuelo y Correa, 2013). De igual forma, se ha demostrado que la colonización del epitelio gástrico con *H. pylori* induce otras condiciones patológicas además de la gastritis superficial y el adenocarcinoma gástrico, como lo son las úlceras pépticas y el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas, o linfoma de MALT por sus siglas en inglés (Burkitt *et al.*, 2017).

La infección de esta bacteria produce una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por la infiltración de células inmunes, que incluyen neutrófilos, linfocitos T y macrófagos en el epitelio gástrico (Wroblewski *et al.*, 2010). Parte importante del rol que juega *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica se atribuye a esta respuesta inflamatoria, ya que se ha visto que *H. pylori* puede inducir la producción de citoquinas proinflamatorias como la IL-8 y la IL-6 y activar factores de transcripción como NF- $\kappa$ B, y facilitar su posterior translocación al núcleo (Saha *et al.*, 2008; Wroblewski *et al.*, 2010). Se ha sugerido que la activación de NF- $\kappa$ B por *H. pylori* se da mediante la vía ERK1/2 MAPK (Saha *et al.*, 2008). Este factor de transcripción regula la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune adaptativa e innata, proliferación celular, adhesión celular, diferenciación, respuesta al estrés, inflamación y apoptosis (Chang *et al.*, 2004; Perkins, 2007); por lo que la activación prolongada de este factor de transcripción por *H. pylori* también está asociado con el aumento en el riesgo de desarrollar CG (Perkins, 2007).

## **Relación entre *H. pylori* y el cáncer gástrico**

*H. pylori* es una bacteria Gram negativa, capaz de colonizar el estómago humano y sobrevivir por años en este ambiente, causando así una inflamación gástrica crónica y persistente (Matysiak-Budnik y Mégraud, 2006). La bacteria presenta algunas adaptaciones para sobrevivir en el ambiente hostil del estómago, dentro de las cuales destacan su capacidad de tolerar el ambiente microaerófilico gástrico, la expresión de la enzima ureasa que le permite modular el microambiente aumentando el pH estomacal, y la presencia de flagelos que le confieren motilidad para movilizarse en las capa de moco gástrico y acceder a la mucosa, donde puede adherirse a las células epiteliales para obtener nutrientes (Burkitt *et al.*, 2017).

La asociación entre la bacteria y el CG ha sido apoyada por gran cantidad de estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales, e incluso filogenéticos (Burkitt *et al.*, 2017). La prevalencia mundial de la infección por *H. pylori* en humanos se estima cercana al 50%. Estudios filogenéticos sugieren que la bacteria ha co-evolucionado con las poblaciones humanas desde antes de la migración de los primeros humanos de África, 58.000 años atrás (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007). La evidencia experimental ha demostrado contundentemente el potencial de *H. pylori* de inducir CG en modelos animales (Parsonnet *et al.*, 1991; Ohnishi *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011; Varon *et al.*, 2012, Burkitt *et al.*, 2017). Por otro lado, estudios de intervención en humanos muestran que la erradicación de esta bacteria puede disminuir el riesgo de desarrollar este cáncer (Fukase *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011); aunque la disminución del riesgo depende del grado de avance en la cascada de eventos pre-neoplásicos en el que se encuentre el paciente (Graham, 2015). Sin embargo, incluso en pacientes con cambios irreversibles en la mucosa gástrica provocados por la bacteria, su erradicación previene que el riesgo aumente e inclusive disminuye la probabilidad en el riesgo de desarrollar CG (Graham, 2015). Adicionalmente, estudios de meta-análisis han sugerido que el riesgo relativo de desarrollar CG, es de dos a tres veces mayor en personas infectadas con *H. pylori* que desarrollaron gastritis crónica atrófica, comparado con las que no están infectadas (Danesh, 1999). De igual forma, estudios epidemiológicos apoyan esta asociación, ya que la mayoría confirman una correlación geográfica entre la prevalencia de la bacteria y la incidencia de este cáncer; mostrando una

disminución en incidencia de CG en los países con tasas decrecientes de infección *por H. pylori*, y de forma contraria, una alta incidencia de CG en los países con alta prevalencia de esta bacteria (Matysiak-Budnik y Mégraud, 2006; Sablet *et al.*, 2011).

### **Patogenicidad variable entre cepas de *H. pylori***

La infección por *H. pylori* está presente en algún momento durante la secuencia de lesiones pre-cancerosas propias de la carcinogénesis gástrica en al menos 80% de los casos con CG (Graham, 2015). Sin embargo, el que solo entre un 1-3% de las personas infectadas con esta bacteria llegue a desarrollar CG, es una indicación de que hay otros factores etiológicos importantes (Wroblewski *et al.*, 2010; Burkitt *et al.*, 2017). Específicamente, aspectos propios de la respuesta del hospedero ante la infección y la variabilidad genética existente entre las cepas bacterianas, pueden influir en su capacidad patogénica. Algunos de estos factores que influyen de forma importante en la patogenicidad de algunas cepas de *H. pylori*, y que podrían explicar en parte por qué no todos los individuos con la bacteria llegan a desarrollar cáncer, es la presencia de la isla de patogenicidad *cag* (CagPAI) en su genoma y de polimorfismos en el gen *vacA* (Kim *et al.*, 2011; Salama *et al.* 2013).

La isla CagPAI es una región de ADN que contiene más de 30 genes que codifican para un sistema de secreción tipo IV, e incluye el gen *cagA*, el cual codifica la proteína que lleva el mismo nombre (Mégraud *et al.*, 2015). Una vez que las cepas *cagA* positivas colonizan el estómago y se adhieren a las células epiteliales del hospedero, la proteína CagA es translocada al citosol de las células epiteliales gástricas, mediante el sistema de secreción tipo IV. Una vez en el citoplasma, la proteína CagA es fosforilada en grado variable; entre más fosforilación se presente, mayor es el potencial oncogénico. Esta fosforilación lleva a la activación de múltiples vías de señalización intracelular importantes (Crawford *et al.*, 2003), capaces de activar o inactivar factores de transcripción que pueden producir cambios temporales en la expresión de genes y llevar al desarrollo de un carcinoma gástrico (Graham, 2015). Las cepas que contienen *cagPAI* poseen, por lo tanto, mayor potencial oncogénico que las *cagPAI* negativas (Crawford *et al.*, 2013; Mégraud *et al.*, 2015). Como lo demuestran Ohnishi y colaboradores (2008), ratones transgénicos que expresan de forma ectópica el gen *cagA*, desarrollan espontáneamente neoplasias

gastrointestinales; siendo CagA una oncoproteína capaz de inducir CG. Debido a la variabilidad en la prevalencia de distintas cepas de la bacteria en la población humana, el estudio de la presencia de estos genes que causan una patogenicidad variable en las cepas es un factor clave que debe tomarse en cuenta en la relación entre el CG y *H. pylori*.

Por otra parte, la citotoxina VacA, codificada por el gen del mismo nombre, es otra proteína producida por *H. pylori*, la cual es internalizada a las células y causa la formación intracelular de vacuolas que genera daño intracelular en el epitelio gástrico (Wroblewski *et al.*, 2010). VacA se ha relacionado con la estimulación de apoptosis y la afectación del funcionamiento mitocondrial (de Bernard *et al.*, 1997; Cover y Blanke, 2005; Palframan *et al.*, 2012). También hay evidencia de que esta proteína produce una disrupción en la función de la barrera protectora del epitelio gástrico y en la modulación de la respuesta inflamatoria (Wroblewski *et al.*, 2010), siendo de importancia para el potencial oncogénico de la cepa. Todas las cepas identificadas de *H. pylori* poseen el gen *vacA*, sin embargo existe diversidad genética en las cepas que generan diferencias en cuanto a su citotoxicidad (McClain, *et al.*, 2001).

Varios polimorfismos han sido identificados en tres regiones variables del gen *vacA*: la región de secuencia señal (s), la región media (m) y la región intermedia (i) (Atherton, *et al.*, 1995; Rhead, *et al.*, 2007). Las variaciones alélicas en la región s y m son clasificadas como *s1* o *s2* y *m1* o *m2*, respectivamente (Atherton, *et al.*, 1995). El alelo *s2* codifica una proteína VacA con un segmento extra en el extremo amino terminal que imposibilita la formación de vacuolas, mientras que el alelo *s1* no presenta este segmento adicional de aminoácidos (McClain, *et al.*, 2001). Por otro lado, los genotipos *m1* y *m2* difieren en un segmento de su secuencia, afectando la especificidad de varios receptores celulares relacionados con la actividad de VacA (Ji, *et al.*, 2000). De hecho, se ha observado que las cepas de *H. pylori* con los genotipos *s1/m1* y *s1/m2* del gen *vacA* causan inflamación crónica más severa que aquellas cepas portadoras del genotipo *s2/m2*. Sin embargo, el mayor nivel de virulencia se atribuye a la combinación alélica *s1/m1*, la cual se ha asociado con un aumento en el riesgo de ulceración péptica y CG (Atherton *et al.*, 1995; Gerhard *et al.*, 1999; Miehlke *et al.*, 2000; Louw *et al.*, 2001). En cuanto a la región intermedia, el

alelo *i1* ha sido correlacionado con la producción del factor de virulencia CagA y la presencia del alelo *s1* (Chung, *et. al.*, 2010).

### **Remodelación de tejido y su importancia en cáncer**

La invasión local de células malignas en tejido sano adyacente y la metástasis, son eventos fundamentales en el desarrollo y la progresión del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011). Ambos procesos son facilitados por proteasas, capaces de degradar componentes de la matriz extracelular; e inclusive algunas de éstas se han asociado con aspectos patológicos del CG. Estudios recientes sugieren una posible conexión entre *H. pylori* y la expresión de algunas de estas proteasas en mucosa gástrica (Krakowiak *et al.*, 2015; Alpízar-Alpízar *et al.*, 2013, Alpízar-Alpízar *et al.*, 2010).

La metástasis es el resultado de una secuencia de pasos que incluyen la invasión individual o colectiva de las células neoplásicas a nivel local, la entrada de éstas a la vasculatura sanguínea o linfática y su supervivencia en circulación, la extravasación en sitios distantes y por último el establecimiento y colonización de las células tumorales diseminadas en los órganos o tejidos distantes (Valastyan y Weinberg, 2011; Lambert *et al.*, 2017). En los primeros eventos de la cascada metastásica se da la remodelación de la matriz extracelular para generar un microambiente propicio para la invasión local. Dicha remodelación es mediada principalmente por el sistema de activación de plasminógeno y las metaloproteínas de matriz (MMPs) (Lund *et al.*, 2011).

La activación de enzimas proteolíticas facilita el rompimiento de componentes de la membrana basal, y con esto la invasión de células cancerosas al tejido no-neoplásico adyacente; lo que se asocia con un mayor poder pro-invasivo y pro-metastásico (Lund *et al.*, 2011). Estos eventos dejan en claro el por qué un grupo importante de biomarcadores para diagnóstico y pronóstico del cáncer corresponde a proteínas involucradas con la remodelación de tejido (Tang *et al.*, 2008; Capellani *et al.*, 2010; Lund *et al.*, 2011). Algunos de estos biomarcadores pronóstico parecen estar directamente relacionados con la etiología del CG y podrían, por lo tanto, predecir fenotipos más agresivos de la enfermedad;

independientemente de otras variables clínicas comúnmente utilizadas como factores pronóstico en cáncer (Alpizar-Alpizar *et al.*, 2012).

### **Sistema de activación de plasminógeno en cáncer gástrico**

La activación de plasminógeno se puede realizar por dos proteasas distintas, el activador de plasminógeno uroquinasa (uPA) o el activador de plasminógeno tisular (tPA), siendo el primero más relevante en el contexto de la biología tumoral. La proteasa uPA tiene su receptor específico uPAR, anclado a glicolípidos de membrana, además de su inhibidor endógeno PAI-1 (Kriegbaum *et al.*, 2011). La interacción uPA-uPAR conlleva a la conversión de la uroquinasa inactiva (pro-uPA) en su forma activa, la cual activa a su vez el plasminógeno, convirtiéndolo en plasmina que es capaz de degradar varios componentes de la matriz extracelular (MEC) y activar algunas MMPs (Kriegbaum *et al.*, 2011).

La expresión de uPAR y su ligando uPA es de mucha relevancia en el estudio del cáncer, principalmente porque la degradación de MEC facilita la invasión y migración de células cancerosas en el tejido circundante (Kriegbaum *et al.*, 2011). Varios estudios también han sugerido la participación de algunos miembros del sistema activador de plasminógeno en procesos no relacionados con la degradación de matriz extracelular, como por ejemplo la asociación de uPAR con un mayor potencial proliferativo (Yu *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002) y su participación en varios procesos de señalización celular (Smith y Marshall, 2010). Los niveles de expresión de uPA y uPAR bajo condiciones homeostáticas es casi indetectable, sin embargo en cáncer y en otras patologías, su expresión aumenta de forma significativa (Kriegbaum, *et al.*, 2011). En general, uPA y uPAR son principalmente expresadas por células no neoplásicas peri-tumorales, y en menor grado por células de cáncer localizadas en el frente invasivo del tumor (Lund, *et al.*, 2011).

El uso del receptor uPAR como biomarcador pronóstico ha sido reportado por varios estudios en CG, e incluso en otros tipos de cáncer, y se ha demostrado que su presencia está ligada a micrometástasis y agresividad (Lund *et al.*, 2011; Alpizar-Alpizar *et al.*, 2012). Las células uPAR positivas suelen predominar en el estroma tumoral,

principalmente en células inflamatorias como los macrófagos y neutrófilos que infiltran al tejido tumoral y en células endoteliales localizadas en el frente invasivo del tumor (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2010; Alpízar-Alpízar *et al.* 2012). Varios estudios han utilizado métodos de inmunohistoquímica semicuantitativos para caracterizar la expresión de uPAR de mejor forma y determinar su papel en la progresión del cáncer. Por ejemplo, en CG la expresión de uPAR en células de cáncer ha demostrado ser un parámetro pronóstico independiente del subtipo histológico, así como del estadio del tumor maligno (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2012). Además, algunos estudios han demostrado que la presencia de células malignas positivas para uPAR en médula ósea de pacientes de CG está asociada con baja supervivencia, en comparación con pacientes en los cuales hay diseminación de células de cáncer uPAR-negativas en este órgano (Heiss *et al.*, 2002). Debido a esto y a otras características, uPAR es considerado un potencial biomarcador pronóstico en CG (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2012; Ma y Tao, 2012, Alpízar-Alpízar, *et al.*, 2018).

Además, existe evidencia que sugiere que la expresión de uPAR puede estar inducida por la infección de *H. pylori* en mucosa gástrica no neoplásica. Alpízar-Alpízar *et al.*, (2010) encontraron mediante análisis semicuantitativos de inmunofluorescencia, una correlación entre la presencia de *H. pylori* en mucosa gástrica y la expresión de uPAR; específicamente, se observó que conglomerados de la bacteria se encontraban cercanos a la superficie de células de epitelio gástrico que expresaban uPAR (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2010). Aunque este estudio no demuestra de forma directa algún rol causal, da pie a que el tema sea sometido a mayor investigación, para definir si efectivamente la bacteria induce la expresión de uPAR.

Con el fin de dilucidar el papel de *H. pylori* en la inducción de uPAR, varios estudios han utilizado sistemas *in vitro* de líneas celulares de CG co-cultivadas con la bacteria. En algunos de estos se ha demostrado el papel de las cepas *cagA* + de *H. pylori* en el aumento de la expresión de uPA y uPAR en células de CG; evidenciando un posible papel inductor de la bacteria en la expresión de ARNm de estas moléculas (Kim *et al.*, 2005; Iwamoto *et al.*, 2008). Más recientemente, se investigó la posible relación entre *H. pylori* y uPAR haciendo uso de un modelo animal de carcinogénesis gástrica (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2013). De acuerdo con esta investigación, la expresión de uPAR en las

células foveolares del epitelio gástrico es inducida muy tempranamente en el curso de la infección de la bacteria; y además esta expresión aumenta de manera progresiva en función del tiempo de infección (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2013). Estos resultados apuntan a que *H. pylori* puede estimular la expresión de uPAR, y bajo ciertas circunstancias, puede potenciar el desarrollo de condiciones patológicas gástricas que eventualmente lleven a la neoplasia del tejido gástrico. Aunque existe evidencia importante que ha logrado establecer una relación entre la bacteria y la expresión de uPAR, aún no está claro si es una relación directa, provocada por la bacteria *per se*, o si es la respuesta inflamatoria que induce la infección por *H. pylori* la que está implicada en los mecanismos que desencadenan la expresión de uPAR en epitelio gástrico sano.

uPA al igual que uPAR, ha sido sugerido como biomarcador pronóstico en varios tipos de cáncer, donde altos niveles indican un mal pronóstico (Ji *et al.*, 2005; Lund *et al.*, 2011). La actividad catalítica de uPA permite además de la activación, el clivaje de uPAR, el cual tiene tres dominios conocidos como uPAR (I), uPAR (II) y uPAR (III). La liberación de uPAR (I) producto de este clivaje, hace que éste viaje como un componente soluble en sangre. Este dominio uPAR (I) soluble también suele ser utilizado como marcador y a la vez permite una medida indirecta de la actividad de uPA, ya que refleja su actividad catalítica (Lund *et al.*, 2011).

Estudios preliminares de expresión de uPA en CG indican que hay un aumento de su expresión durante la progresión e invasión del cáncer (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2018). De igual forma en casos de CG, hay expresión de uPA en macrófagos, miofibroblastos y en células endoteliales gástricas, adicional a las células de cáncer (Alpízar-Alpízar *et al.*, 2018). En cuanto a la relación entre uPA y la presencia de *H. pylori*, hay evidencia que sugiere la inducción de uPA por la bacteria, aunque esta relación no es tan sólida como la de su receptor (Kim *et al.*, 2005).

### **Metaloproteinasas de matriz extracelular en cáncer gástrico**

Otra familia de proteasas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular es la de las MMPs. Esta familia comprende más de 23 endopeptidasas dependientes de zinc,

capaces de degradar casi cualquier proteína de la matriz extracelular (Koskensalo *et al.*, 2010). Las MMPs son sintetizadas inicialmente como zimógenos (pro-MMPs) y al ser liberadas al espacio extracelular son activadas por otras proteasas, incluyendo a la plasmina e inclusive las mismas MMPs. Las MMPs están involucradas en muchos procesos biológicos no patológicos, incluyendo cicatrización de heridas, remodelación de tejido y desarrollo embrionario (Koskensalo *et al.*, 2010). Éstas, sin embargo, también tienen un papel importante en la invasión y metástasis de cáncer, por medio de la degradación de tejido conectivo, membranas basales y matriz estromal; ya que como resultado de la degradación de la matriz extracelular se liberan una serie de factores que potencian el crecimiento, la proliferación y la angiogénesis, que facilitan el crecimiento y progresión tumoral (Kessenbrock *et al.*, 2010; Koskensalo *et al.*, 2010). Además, la expresión elevada de ciertas MMPs se ha relacionado con algunos parámetros clínico-patológicos en varios tipos de cáncer, entre ellos estadios tumorales avanzados y baja sobrevida de los pacientes (Sier *et al.*, 1996; Waas *et al.*, 2002; Kessenbrock *et al.*, 2010).

Dentro de las MMPs, la MMP-7 también llamada matrilisina, es un miembro muy activo de la familia de MMPs. Posee una amplia actividad proteolítica y es capaz de activar a otras metaloproteinasas, como la MMP-2 y la MMP-9, las cuales también han sido implicadas en tumorogénesis y metástasis (Scorilas *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2004). En contraste con otras MMPs que se expresan normalmente en células estromales, la MMP-7 es expresada principalmente en células tumorales, lo que la hace una proteína interesante de estudiar en el contexto de la biología del cáncer. (Crawford *et al.*, 2003; Koskensalo *et al.*, 2010). Otra característica que hace relativamente única a MMP-7 es que ésta es principalmente producida por células epiteliales (Odgen, *et al.*, 2010).

De igual forma que con uPAR y su ligando uPA, la MMP-7 ha demostrado ser un potencial biomarcador en CG (Soleyman-Jahi *et al.*, 2015). Koskensalo y colaboradores (2010) encontraron una correlación significativa entre la expresión elevada de MMP-7 en tejido de CG y la baja sobrevida de los pacientes. La expresión de esta proteasa también ha mostrado ser mayor en tejido tumoral de pacientes con CG que en la mucosa gástrica normal. Además, hay diferencia en los niveles de expresión de esta MMP según el subtipo histológico de CG, presentándose mayores niveles de expresión en el tipo difuso que en el

intestinal (Kitoh *et al.*, 2004; Kuang *et al.*, 2013); no obstante, existe alguna controversia respecto a dicha observación, ya que algunos autores reportan lo opuesto, encontrando mayor expresión de MMP-7 en el subtipo intestinal (Yamashita *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2006). La sobreexpresión de MMP-7 en pacientes con cáncer ha demostrado ser relevante para la invasión y metástasis, y ha sido correlacionada con el estadio del GC (Kuang *et al.*, 2013). También se ha reportado que la MMP-7 inhibe la apoptosis de células cancerosas, reduce la adhesión celular e induce la angiogénesis, todo esto fomentando el potencial invasivo del cáncer (Aihara *et al.*, 2006; Okayama *et al.*, 2009; Yeh *et al.*, 2010).

Adicionalmente, la proteína MMP-7 puede ser inducida como respuesta a una variedad de estímulos, dentro de los que destaca el contacto bacteriano con las células. Distintas bacterias, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides thetaiotaomicron* y *H. pylori* han demostrado ser inductoras de una expresión aumentada y sostenida de MMP-7 (Crawford *et al.*, 2003). Además de mostrar un aumento transcripcional en células que entran en contacto directo con bacterias, otro de los factores que convierte a la MMP-7 en un atractivo blanco para su estudio en CG es que es la única MMP que se expresa principalmente en tejido epitelial bien diferenciado, lo cual es directamente relevante para el CG; ya que en el contexto de la infección por *H. pylori*, la adherencia de esta bacteria a células epiteliales es primordial para la inducción de inflamación gástrica (Wroblewski *et al.*, 2003).

Varios autores han reportado que *H. pylori* es capaz de inducir la expresión de MMP-7 en células epiteliales gástricas cultivadas *in vitro* (Crawford *et al.*, 2003; Wroblewski *et al.*, 2003; Ogden *et al.*, 2008). Interesantemente, los niveles de expresión de MMP-7 inducida por esta bacteria son significativamente mayores al compararse con otras bacterias que también logran inducirla (Crawford *et al.*, 2003). En un estudio con tejido gástrico humano, se determinó que las cepas cagA+ de *H. pylori* en particular son las que inducen la expresión de la MMP-7; donde un 80% de las personas infectadas con estas cepas expresan MMP-7, mientras que ésta no se expresa del todo en los pacientes no infectados o infectados con cepas negativas para este factor de virulencia (Crawford *et al.*, 2003). Por lo tanto, la virulencia de la cepa de *H. pylori* parece ser relevante en esta inducción.

Algunos estudios han sido llevados a cabo con animales experimentales con el fin de elucidar el papel de *H. pylori* en la inducción de la MMP-7 *in vivo*. Odgen *et al.* (2010) reportaron que la inflamación provocada por este microorganismo en la mucosa gástrica es más severa en ratones *knockout* para MMP-7, comparado a sus controles *wildtype*; mientras que los altos niveles de ésta protegen el tejido gástrico de la infección bacteriana. Por consiguiente, los ratones deficientes de MMP-7 muestran estados de inflamación crónica más severa que los silvestres, y mayor cantidad de células T y B infiltradas en tejido gástrico. Además, en este mismo estudio, se demostró que los ratones deficientes de esta enzima proteolítica infectados con *H. pylori* presentaban mayores niveles de proliferación y apoptosis, en comparación con los silvestres infectados y los deficientes no infectados.

En concordancia con lo anterior, Wroblewski *et al.* (2003) plantean la hipótesis de que la inducción de MMP-7 en respuesta a la infección con *H. pylori* es un mecanismo de defensa del hospedero; como parte de una estrategia para mantener la integridad del epitelio por el daño que pueda ocasionar la bacteria. Sin embargo, también plantean que su inducción prolongada podría iniciar a largo plazo, eventos que aceleren la transformación maligna y faciliten el desarrollo de la neoplasia gástrica (Wroblewski *et al.*, 2003). Se ha reportado que la sobre-expresión de MMP-7 facilita la degradación de factores pro-apoptóticos, lo que propiciaría la preservación de las células que presentan daños en el ADN, contribuyendo así con la formación de tumores (Mitsiades *et al.*, 2001; Vargo-Gogola *et al.*, 2002). Todos estos resultados dan mayor fuerza a la hipótesis planteada anteriormente, ya que apoyan el rol protector de MMP-7 contra la infección, pero también dejan en evidencia el papel de la MMP-7 en la apoptosis, donde deficiencias de ésta aumentan eventos apoptóticos y su sobre-expresión los reduce (Odgen *et al.*, 2010).

Aunque la expresión elevada de MMP-7 puede representar un mecanismo de defensa en las fases tempranas de la carcinogénesis gástrica, la expresión sostenida como resultado de la infección persistente por *H. pylori* convierte a esta proteasa en un factor que va en contra de la integridad del epitelio gástrico. También se especula que MMP-7 podría estar relacionada con la adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas. Esto podría contribuir a explicar por qué esta bacteria induce MMP-7, ya que la adherencia es fundamental para que este microorganismo colonice eficientemente la mucosa gástrica

(Wroblewski *et al.*, 2003). Esta hipótesis es apoyada por estudios inmunohistoquímicos que encuentran a la MMP-7 localizada en la superficie de las células epiteliales gástricas en pacientes con CG (Odgen *et al.*, 2010). Estos hallazgos, en conjunto, apuntan a que la expresión de MMP-7 puede conferir un mayor riesgo para el desarrollo del CG, asociado a la presencia de *H. pylori*.

### **Importancia de uPA, uPAR y MMP-7 en cáncer gástrico**

La importancia de uPA, uPAR y MMP-7 como biomarcadores pronósticos para CG, según estudios pre-clínicos ya discutidos, hace de éstos blancos importantes para el desarrollo de fármacos que logren reducir, o al menos estabilizar el tamaño del tumor y su agresividad. De este modo el estudio de estas moléculas, así como de los mecanismos moleculares que explican la posible inducción de estas moléculas en respuesta a *H. pylori* y sus implicaciones en la patogénesis del CG, serían de relevancia y podrían tener un impacto clínico, sobre todo de prevención. Lo anterior es particularmente importante en poblaciones como la costarricense, donde la prevalencia de la bacteria en la población es superior al 75% (Sierra *et al.*, 1992; Sierra *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 2008). El uso de plataformas *in vitro*, como la que se usa en este estudio, y de otras especies del género *Helicobacter* permite esclarecer una interrogante muy importante, que a la fecha no ha sido explorada: si la inducción de estas proteínas en el epitelio gástrico es específica para *H. pylori*, o si otras bacterias de este género son capaces de inducir el mismo fenómeno.

### ***Helicobacter felis* en estudios de cáncer**

*H. felis* es una bacteria gram negativa, pariente cercana de *H. pylori*, que coloniza naturalmente la mucosa gástrica de gatos y perros. Sin embargo, debido a su capacidad de producir inflamación severa y persistente en ratones de laboratorio, ésta ha sido muy utilizada experimentalmente como un modelo equivalente al de *H. pylori* en humanos (Lee *et al.* 1990). *H. felis* ha sido ampliamente utilizada para generar modelos murinos altamente reproducibles de patologías gástricas, incluyendo la gastritis crónica (Lee, *et al.*, 1990; Lee, *et al.*, 1993), gastritis atrófica (Fox, *et al.*, 2000), linfoma (Enno, *et al.*, 1995; Enno, *et al.*, 1998) y adenocarcinoma (Fox, *et al.*, 2002). Esta bacteria comparte algunos factores de

virulencia con *H. pylori*, mas no cuenta con el gen *vacA*, ni con la isla *cagPAI*; por lo que es una bacteria tanto *VacA* como *CagA* negativa (Arnold et al., 2011).

### **Sistema *in vitro* vs. *in vivo***

Las células AGS son ampliamente utilizadas en ensayos *in vitro* para el estudio de varios eventos del desarrollo y progresión del CG (Shirin et al., 1999; Kim *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2013). Esta línea celular permite evaluar los efectos de distintos agentes de forma controlada, excluyendo prácticas invasivas en humanos. Nuevas posibilidades de blancos terapéuticos han surgido del estudio de enfermedades complejas como el cáncer en modelos *in vitro* (Lovitt *et al.*, 2014). De igual forma, se han esclarecido los mecanismos para diversos agentes involucrados en el desarrollo y/o progresión del CG, algunos involucrando a *H. pylori* (Xia *et al.*, 2012; Bessède *et al.*, 2013), lo que ha contribuido al entendimiento de esta patología.

En el caso de *H. pylori* y el CG, ya se ha observado que hay relación en los niveles de expresión de uPAR, uPA y MMP7 con la presencia de la bacteria; sin embargo, no está claro si esta inducción es directamente asociada la bacteria, o a la respuesta inflamatoria que ésta desencadena. Al utilizarse un sistema de infección *in vitro*, la respuesta de las células inflamatorias a la bacteria no ocurre. De esta forma, se excluye el factor inflamación del modelo, limitándose únicamente a la producción de algunos mediadores de la respuesta inmune por parte de las células. Este sistema permite también estudiar la infección de las células por parte de otras especies de *Helicobacter*, como lo es *H. felis*, que no ha sido estudiado en el contexto de la inducción de uPAR, uPA y MMP7 en células humanas. Sin embargo, Conlin y colaboradores (2004) sí utilizaron esta especie, junto con *H. pylori*, para infectar células derivadas de estómago (NCI-N87) y evaluar si la expresión de varios genes cambiaba significativamente entre ambas especies; esto con el fin de determinar si la expresión de dichos genes era un fenómeno generalizado en respuesta a una infección bacteriana del género o exclusiva de *H. pylori*. En resumen, el modelo *in vitro* utilizado en el presente proyecto podría ser una valiosa herramienta para dilucidar si la inducción de uPAR, uPA y MMP7 es directamente producida por *H. pylori*, si puede ser inducida por

otras bacterias del género, y si las células inflamatorias son o no necesarias en este fenómeno.

## Objetivos

### Objetivo general:

- Determinar la expresión de genes involucrados en remodelación de tejido en respuesta a la infección por especies de bacterias del género *Helicobacter* en un sistema de cultivo *in vitro*, para entender fenómenos relacionados con la etiología del cáncer gástrico.

### Objetivos específicos:

- Cuantificar la expresión relativa a nivel de ARNm para los genes *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7*, en células AGS co-cultivadas con *Helicobacter pylori* a diferentes intervalos de tiempo.
- Cuantificar la expresión relativa a nivel de ARNm para los genes *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7*, en células AGS co-cultivadas con *Helicobacter felis* a diferentes intervalos de tiempo.
- Comparar la expresión de los genes *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7* para determinar posibles diferencias en la cinética de expresión de ARNm en células AGS co-cultivadas con *H. pylori*, versus las co-cultivadas con *H. felis*.

## Metodología

Los experimentos se realizaron en los laboratorios del Programa de Epidemiología del Cáncer, del INISA, Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica. Todos los experimentos realizados con la línea celular AGS, fueron hechos a partir de ARNs almacenados, provenientes de infecciones previas de otros proyectos de investigación del Programa de Epidemiología del Cáncer.

- **Línea celular y condiciones de cultivo:**

Se trabajó con la línea celular AGS, derivada de adenocarcinoma gástrico humano de tipo difuso (CRL-1739), adquirida de ATCC (American Type Culture Collection), la cual es ampliamente utilizada en estudios de este tipo (Wroblewski *et al.*, 2010; Alpizar-Alpizar *et al.*, 2013). El cultivo celular se realizó en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> con 6 mL de medio RPMI 1640 (Gibco Life Technologies), suplementado con 1% de antibióticos penicilina-streptomina y 10 % de suero fetal bovino (SFB, Gibco Life Technologies). Para cada experimento se realizaron cultivos durante una semana a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en una atmósfera humidificada. Posteriormente se despegaron las células con tripsina, se contaron con una cámara de Neubauer y se sembraron un total de 400 000 células en placas de seis pozos de 2 cm<sup>2</sup>. Los experimentos se realizaron en aquellos cultivos en los que se observó una monocapa celular con al menos un 90% de confluencia. Todas las líneas celulares empleadas en esta investigación se utilizaron entre los pasajes 5-8.

En el caso de las líneas celulares MKN-45 y MKN-74, se empleó la misma metodología de cultivo, con la diferencia de que se utilizó TryPId para despegar las células de la placa. Adicionalmente, para realizar el conteo y la estimación de células a sembrar en cada pozo se utilizó azul de tripán. Este reactivo tiñe de azul las células muertas y de esta forma permite realizar una estimación más precisa de la cantidad de células viables a utilizar en el experimento. Finalmente, se sembraron

un total de 300 000 células MKN-45 en cada pozo de las placas y 400 000 células MKN-74.

▪ **Cultivo bacteriano y condiciones:**

Para el cultivo de la especie *H. pylori* se utilizó la cepa 26695 (KE26695; *cagA*<sup>+</sup> y *VacA s1m1*) obtenida de ATCC y la cepa 7.13 donada por el Dr. Richard M. Peek Jr, director de la División de Gastroenterología del Centro Médico de la Universidad de Vanderbilt. Adicionalmente se empleó la cepa SS1, utilizada en modelos murinos, *cagA*<sup>+</sup> y con *VacA s2m2* (van Doorn, *et al.*, 1999; Ayraud, Janvier & Fauchère, 2002), sin embargo aunque esta cepa produce la proteína CagA, ésta no es translocada a las células, pues su sistema de secreción tipo IV no es funcional (Lee, *et al.*, 1997; Eaton, *et al.*, 2001; Crabtree, Ferrero & Kusters, 2002). Para la especie *H. felis* se utilizó la cepa CS1, la cual es CagA<sup>-</sup> y VacA<sup>-</sup> negativa. Tanto las cepas bacterianas SS1 como la CS1 fueron donadas por el Dr. James G. Fox, profesor y director de la División de Medicina Comparativa y profesor en el Departamento de Ingeniería Biológica, en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT). En ambos casos, las bacterias fueron cultivadas en placas agar-sangre de oveja o caballo a 37°C, bajo un ambiente microaerófilico (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85% N<sub>2</sub>) durante una semana. Para todos los experimentos de infección realizados se utilizaron bacterias cultivadas en pasajes tempranos.

▪ **Co-cultivos de línea celular con bacterias *Helicobacter spp*:**

Las células AGS fueron co-cultivadas con *H. pylori* o con *H. felis*. Tres horas previas a la infección, se removió el medio de las células y se realizaron lavados del cultivo con PBS 1X para eliminar cualquier resto de antibiótico. Posteriormente, las células se mantuvieron en medio RPMI simple (libre de antibióticos y SFB) para realizar la infección con las bacterias. Las bacterias se recolectaron de las placas de cultivo en 1 mL PBS 1X con ayuda de un raspador y se estimó la densidad óptica a 600nm en un biofotómetro Eppendorf. Para todos los co-cultivos, *H. pylori* se añadió a las células en una relación bacteria:célula de 100:1, lo cual corresponde a

un MOI (*multiplicity of infection*) fijo de 100, mientras que *H. felis* fue añadida a un MOI de 25. El MOI para *H. felis* se definió luego de haber realizado experimentos de cultivo a distintos MOI y observar la tasa de crecimiento de esta bacteria.

Cada experimento se realizó por triplicado experimental para cada cepa bacteriana de *H. pylori*, mientras que para la bacteria *H. felis* se realizaron dos experimentos completos de infección. El control negativo corresponde a células AGS que no fueron co-cultivadas con las bacterias. Los co-cultivos fueron detenidos a las 3, 6, 12, 18, 24 y 36 horas post-inoculación de las células, con la intención de analizar la cinética de expresión de los tres genes a estudiar. Se realizaron un total de ocho experimentos independientes de infección en la línea celular AGS.

Por otro lado, las células MKN-45 y MKN-74 fueron co-cultivadas con *H. pylori* cepa 7.13. Tres horas previas a la infección, se removió el medio de las células y se realizaron lavados del cultivo con PBS 1X para eliminar cualquier resto de antibiótico. Posteriormente, las células se mantuvieron en medio RPMI simple con vancomicina, para realizar la posterior infección con las bacterias. Las bacterias se recolectaron de las placas de cultivo en 1 mL PBS 1X con un raspador y se estimó la densidad óptica a 600nm en un biofotómetro Eppendorf. Para todos los co-cultivos, esta cepa se añadió a las células en un MOI fijo de 50.

Es importante mencionar que los experimentos con las líneas celulares MKN-45 y MKN-74 no estaban contemplados inicialmente en los objetivos de esta investigación. Estas células fueron obtenidas en un punto avanzado del proyecto; a pesar de esto, se decidió incluirlas para evaluarlas de forma preliminar como modelos *in vitro*. Por esta razón, únicamente se presentan experimentos preliminares de cinética de expresión para los genes en estudio. Tras analizar la expresión basal de los genes en ambas líneas celulares, se decidió continuar los experimentos de infección únicamente con la línea MKN-45. En este caso, se realizaron dos experimentos de infección independientes, donde cada una de las muestras se realizó por triplicado biológico. Los co-cultivos fueron detenidos a las 2, 4 y 24 horas post-inoculación de las células.

- **Extracción de ARN:**

Se utilizó el total del material contenido en cada pozo después de las infecciones. El ARN celular y bacteriano total fue extraído con TRIzol Reagent (Ambion), según las indicaciones del fabricante. Las concentraciones obtenidas fueron cuantificadas por medio de un Nanodrop, y los ácidos nucleicos extraídos fueron almacenados a -80 °C hasta su posterior utilización.

- **Síntesis de ADNc de ARNs totales y PCR tiempo real:**

El total de ARN extraído fue utilizado para la síntesis de ADNc por una transcripción reversa utilizando el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), según las indicaciones del fabricante. Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: 70°C durante 10 minutos, 50°C por 60 minutos y por último 85°C durante 5 minutos. Como verificación del proceso, los productos de las retrotranscripciones fueron corridos en geles de agarosa al 1% en geles pre-teñidos con Gel Red y fueron visualizados en un transiluminador de luz UV. El ADNc obtenido se sometió a una qRT-PCR con sondas Taqman (Applied Biosystems) para cada gen (Cuadro I), en un equipo Step One Plus de PCR en Tiempo Real, Applied Biosystems. Cada muestra se amplificó con tres réplicas técnicas en cada placa de PCR para el caso de los experimentos con las células AGS, mientras que las células MKN-45 fueron realizadas por duplicado técnico. La reacción de qRT-PCR fue realizada con un volumen final de 10 µL, el cual contenía 0.5 µL de ADNc, 5 µL de Taqman Master mix, 0.5 µL de sonda y 4 µL de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas en el caso de los experimentos con las células AGS. Para los experimentos con la línea celular MKN-45 se utilizaron 3 µL de ADNc, 5 µL de Taqman Master mix, 0.5 µL de sonda y 1.5 µL de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas. Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: 50° C para la desnaturalización inicial durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95° C por 10 minutos y para el acoplado de las sondas 60° C por 1 minuto. La expresión de los genes fue normalizada con el gen de referencia

*GAPDH*. La expresión de los genes en las células infectadas versus las no infectadas se comparó mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

**Cuadro I.** Código de identificación de las sondas Taqman (Thermo Fisher Scientific) utilizadas para cada gen de estudio y tamaños de los amplicones obtenidos en la RT-qPCR

Gen	ID	Longitud producto (pb)
<i>PLAU</i> (uPA)	Hs01547054_m1	61
<i>PLAUR</i> (uPAR)	Hs00958880_m1	63
<i>MMP7</i>	Hs01042796_m1	64
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1	157

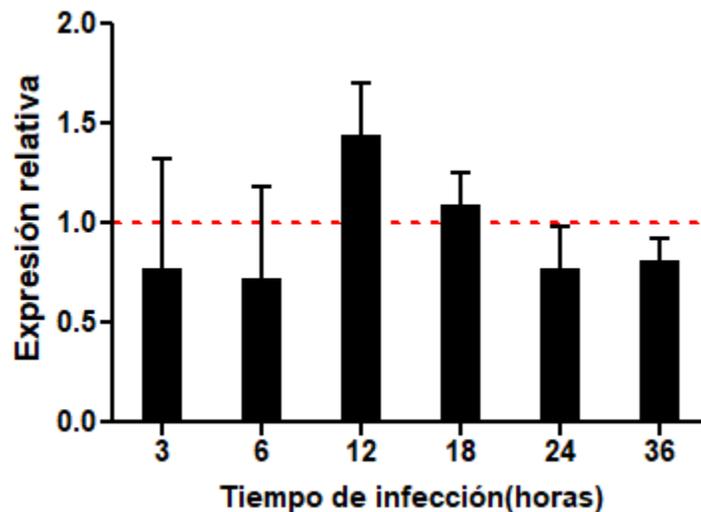
▪ **Análisis estadístico:**

Cada muestra fue realizada por triplicado técnico en la qRT-PCR, por lo que los ciclos umbral o Cts obtenidos para cada muestra fueron promediados. El  $\Delta Ct$  y el  $\Delta\Delta Ct$  se calcularon a partir del valor Ct obtenido. Se realizó una prueba de Wilcoxon para comparar los niveles de expresión relativa obtenidos para cada gen y para cada tiempo de infección versus los obtenidos en las células sin infectar normalizadas con el gen referencia. Adicionalmente, se realizaron pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis mediante el programa estadístico GraphPad Prism 7 para comparar los niveles de expresión relativa del gen según su cinética de expresión en el tiempo. Por medio de estos análisis se permite conocer si las mediciones relativas de expresión de los genes son significativamente distintas según la cepa bacteriana a la que están expuestas las células y al tiempo de infección; y así evidenciar si es *H. pylori* específicamente la que logra inducir o aumentar la expresión de estos genes en las líneas celulares estudiadas.

## Resultados

### Cinética de expresión de *PLAUR* en respuesta a la infección con *Helicobacter pylori*

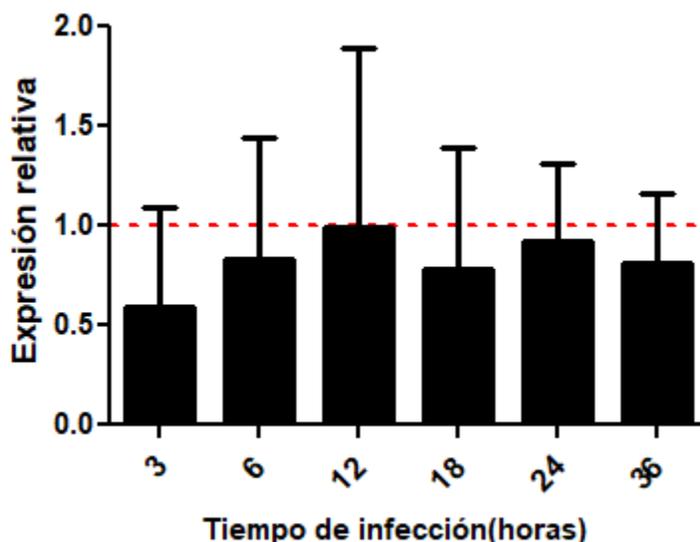
Los resultados de cinética de expresión del ARNm para el gen *PLAUR* en células AGS co-cultivadas con la cepa 26695 de *H. pylori* se muestran en la figura 1. La expresión de *PLAUR* en los diferentes tiempos del ensayo cinético fue siempre cercana al valor de referencia del gen *GAPDH*. Aunque a las 12 horas post-infección hay un aumento en la expresión relativa, con una expresión 1.45 veces mayor que el gen de referencia, éste no alcanzó significancia estadística ( $p > 0.05$ ).



**Figura 1. Cinética de expresión del gen *PLAUR* en la línea celular AGS para diferentes tiempos de infección con la bacteria *H. pylori* cepa 26695. La línea punteada representa el valor referencia de la expresión relativa del gen *GAPDH*.**

En el caso de la cepa SS1 de *H. pylori*, no hay inducción en la expresión de *PLAUR* en ningún tiempo post-infección con la bacteria ( $p > 0.05$ ; Fig. 2). Aunque se observa que a las 3 horas post-infección la expresión de *PLAUR* disminuye, esta disminución no es estadísticamente significativa ( $p = 0.12$ ). Juntos, estos resultados indican que la infección

con *H. pylori* no produjo cambios significativos en la expresión del gen *PLAUR*, en células AGS.



**Figura 2. Cinética de expresión del gen *PLAUR* en la línea celular AGS co-cultivada con la cepa SS1 de *H. pylori*. La línea punteada representa el valor referencia de la expresión relativa del gen *GAPDH*.**

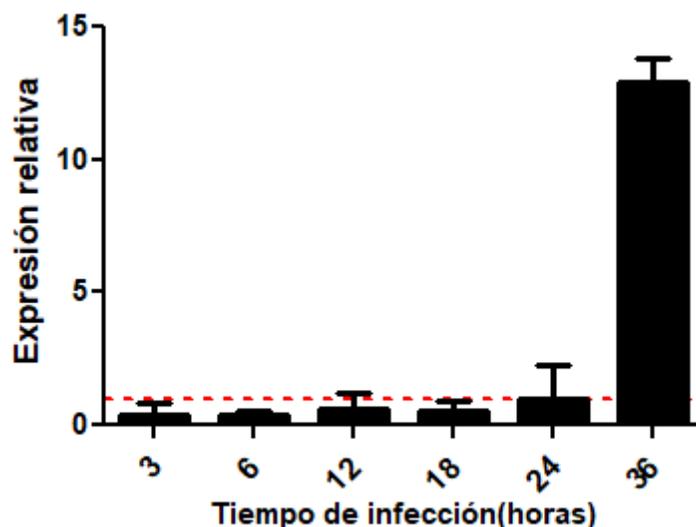
#### **Cinética de expresión de *PLAU* y *MMP7* en respuesta a la infección con *Helicobacter pylori***

No se observó expresión de los genes *PLAU* y *MMP-7* de forma basal en las células AGS control. Éstos tampoco fueron expresados cuando las células fueron co-cultivadas con las cepas 26695 o SS1 de *H. pylori*.

#### **Cinética de expresión de *PLAUR* en respuesta a la infección con *Helicobacter felis***

Los resultados de los ensayos cinéticos con la bacteria *H. felis* demostraron que ésta aumenta de forma evidente la expresión de *PLAUR* a las 36 horas post-infección (Fig. 3). Debido a que para esta cepa bacteriana únicamente se realizaron dos réplicas

experimentales de infección, no fue posible realizar pruebas estadísticas que evalúen la significancia de esta observación. Sin embargo, se observó que la expresión de *PLAUR* aumentó 12.89 veces con respecto al gen de referencia tras la infección con *H. felis* a las 36 horas post-infección.



**Figura 3. Cinética de expresión del gen *PLAUR* para dos experimentos de infección en la línea celular AGS co-cultivada con la bacteria *H. felis*. La línea punteada representa el valor referencia de la expresión relativa del gen *GAPDH*.**

### **Expresión de *PLAUR*, *PLAU* y *MMP7* en las líneas celulares de cáncer gástrico MKN-45 y MKN-74**

Como experimentos adicionales a los realizados con la línea AGS, se realizaron análisis preliminares de la expresión de *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7* en las líneas MKN-45 y MKN-74. La evaluación de nuevas líneas celulares, y cepas bacterianas se realizó con la intención de explorar alternativas para el establecimiento de un modelo *in vitro* más adecuado para el estudio de estos genes. Primeramente, se realizaron experimentos de optimización en los que solamente se cuantificó la expresión basal de *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7* en las células MKN-45 y MKN-74 no infectadas a las 24 horas de cultivo.

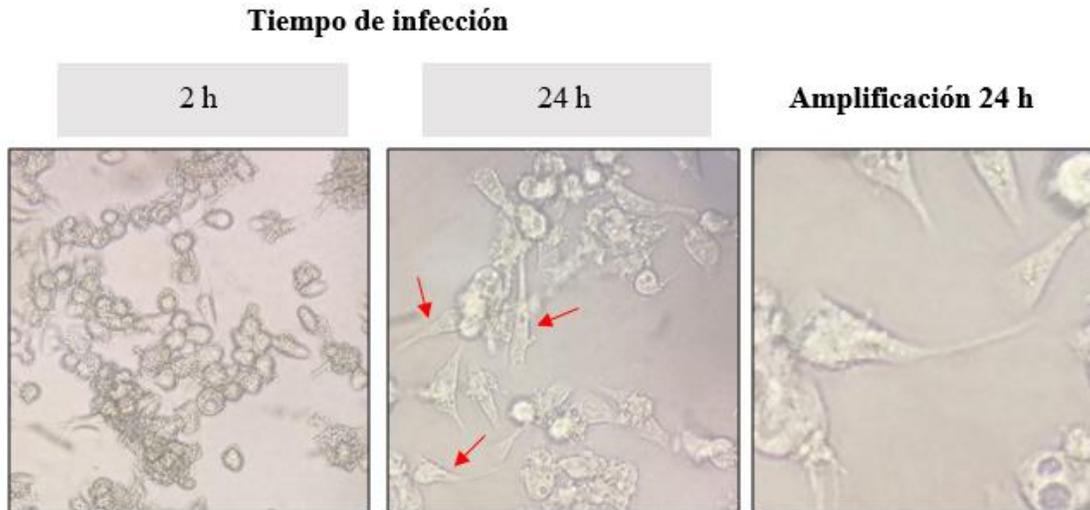
Adicionalmente, se probaron distintas concentraciones de ADNc al realizar la PCR en tiempo real; con el fin de definir cuál concentración es más adecuada para el estudio de la cinética de expresión de dichos genes. Específicamente, se utilizaron concentraciones de 5, 10 y 15 ng/μL de ADNc para cada muestra; excepto en el caso del gen de referencia *GAPDH*, para el cuál únicamente se utilizó la concentración de 5 ng/μL.

Los resultados de expresión basal para los genes en estudio evidenciaron el potencial de la línea celular MKN-45 para el desarrollo de un modelo *in vitro* adecuado para los genes en estudio, ya que ésta expresa tanto a *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7* de forma basal. Adicionalmente, este experimento preliminar permitió concluir que de las concentraciones utilizadas, la concentración de 15 ng/μL de ADNc fue la más adecuada para realizar la PCR en tiempo real. Lo anterior, debido a que esta concentración evidenció valores de ciclos umbrales más tempranos en los genes en estudio al comparar con las demás concentraciones empleadas. Por su parte, al analizar los ciclos umbral de expresión para los genes estudiados en la línea celular MKN-74, se observó que ésta no presenta expresión basal para el gen *MMP-7*. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió continuar con los experimentos de infección únicamente en la línea MKN-45.

Una vez realizados los experimentos de optimización mencionados, se realizaron experimentos piloto con la línea celular MKN-45 co-cultivada con la cepa 7.13 de *H. pylori* (cagA+). Esto con el objetivo de determinar la expresión relativa para *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7* tras la infección a las 2, 4 y 24 horas post-infección. Al ser un experimento piloto, estos tiempos de co-cultivo fueron seleccionados inicialmente para conocer de forma general sobre la cinética de expresión de los genes, sin embargo de acuerdo a los resultados de cinética de expresión obtenidos se podrían desarrollar futuros estudios en donde se evalúen mayor cantidad de tiempos de infección o tiempos intermedios.

En este caso, la cepa 7.13 de *H. pylori* logró evidenciar la inducción del fenotipo colibrí en este modelo (Fig 4.). Estos cambios morfológicos también fueron evidenciados tras las infecciones de las células AGS con las cepas 26695 y SS1 de *H. pylori*, mientras la infección con *H. felis* no mostró estos cambios de morfología celular. (Wendy Malespín, datos del proyecto 742-B1-158, Programa de Epidemiología del Cáncer, INISA). Adicionalmente, se determinó que la expresión de los genes *PLAUR* y *PLAU* aumenta de

forma significativa a las 24 h de infección ( $p < 0.05$ ) en respuesta a la infección con la cepa 7.13 de *H. pylori*; mostrando un incremento de 4.45 veces para *PLAUR* y 5.32 veces para *PLAU* con respecto a las células control no infectadas (Fig 5). Por su parte, la expresión del gen *MMP7* se mantuvo en niveles basales y no fue sobre-regulada por la infección en ninguno de los tiempos estudiados ( $p > 0.05$ ) (Fig 5).



**Figura 4. Inducción del fenotipo “colibrí” en células MKN-45 tras la infección con la cepa 7.13 de *H. pylori*.** El fenotipo colibrí fue observado a las 24 horas de infección en el modelo *in vitro* empleado. La tercera columna representa la imagen magnificada de las 24 horas de infección para permitir un mejor detalle de la morfología celular inducida. Microscopio invertido Olympus CKX41, magnificación: 100X.

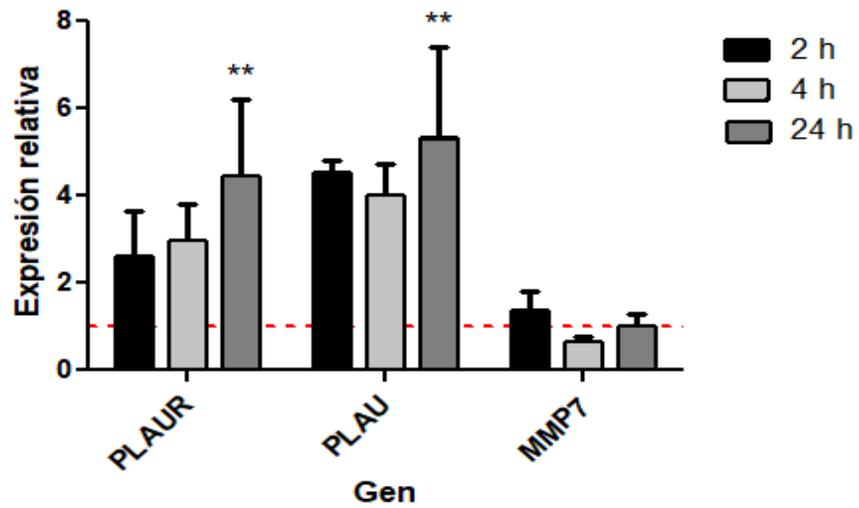


Figura 5. Expresión relativa para los genes *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7* en la línea celular MKN-45 a distintos tiempos de infección con la cepa 7.13 de *H. pylori*. La línea punteada representa el valor referencia de la expresión relativa del gen *GAPDH*.

## Discusión

La remodelación de la matriz extracelular (MEC) es un proceso fundamental para que ocurra la invasión y posterior metástasis en cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011), por lo que es crucial comprender cuáles factores pueden potenciar este proceso y, eventualmente, cómo prevenirlo o atenuarlo. El objetivo de esta investigación se centró en determinar si la bacteria *H. pylori* es capaz de inducir por sí sola la expresión de tres genes involucrados con la remodelación de la MEC en líneas celulares de CG; para conocer un poco más sobre la participación de esta bacteria en la etiología de la enfermedad. Según los resultados obtenidos en esta investigación, *H. pylori* produjo una inducción de los genes *PLAU* y *PLAUR* tras 24 horas de infección en la línea celular MKN-45. Si bien estos son resultados preliminares, evidencian que la presencia *per se* de la bacteria es suficiente para producir esta inducción, sin embargo, no se puede concluir que la respuesta inflamatoria contra *H. pylori* no sea un evento fundamental en la inducción de estos genes. Al igual, esta investigación preliminar sugiere que el estudio *in vitro* con células no es el más adecuado para abordar sistemáticamente la cinética de expresión de los factores implicados en la remodelación de tejido aquí estudiados.

La inducción de la expresión del gen *PLAUR* por cepas de *H. pylori* ha sido reportada en varios estudios con sistemas de cultivo *in vitro*. Por ejemplo, Kim y colaboradores (2005) encuentran una inducción en la expresión de ARNm de uPAR en la línea celular de CG AGS, tras cuatro horas de infección con las cepas 26695 y J99; ambas CagA+ y con genotipo *s1m1* para *vacA*. Específicamente, al infectar con la cepa 26695 se observó un aumento en la expresión relativa de *PLAUR* de alrededor de 4.5 veces con respecto las células sin infectar. Cabe resaltar que la metodología para cuantificar los niveles de expresión en este caso fue de forma indirecta, mediante la determinación de la actividad de luciferasa posterior a la transfección de células AGS con constructos promotor-reportero (pGL3-uPAR) del gen humano de uPAR y el gen de la luciferasa.

Resultados similares al anterior se han encontrado con otras líneas celulares y cepas bacterianas. Un estudio que utilizó células MKN-45 infectadas con la cepa NCTC11637 de *H. pylori* (CagA+), demostró que la expresión de *PLAUR* aumentaba 3 veces a las 4 horas

de post-infección (Iwamoto, *et al.*, 2008). Este resultado apoya la idea de que las cepas de *H. pylori* positivas para CagA son capaces de inducir la expresión de este gen relacionado con agresividad y metástasis en cáncer. Sin embargo, otros estudios han concluido que *H. pylori* es capaz de inducir la expresión de la proteína uPAR en distintas líneas celulares sin importar el estatus de CagA de la cepa (Alpízar *et al.*, 2013). En esta última investigación, las líneas celulares AGS fueron infectadas con las cepas J99 (CagA+) y SS1, que como ya se mencionó posee un T4SS no funcional. En este caso, la expresión de uPAR se determinó por medio de Western Blots y se determinó que ambas cepas lograban inducir la expresión de la proteína luego de 6 horas de co-cultivo (Alpízar *et al.*, 2013).

A pesar de los resultados obtenidos en los estudios anteriormente discutidos, las diferencias metodológicas, las líneas celulares y las cepas bacterianas utilizadas, son factores que juegan un papel importante en el establecimiento de modelos para estudios de la cinética de expresión de un gen. Si bien en estas investigaciones experimentales anteriormente mencionadas no se estableció la cinética de expresión del gen *PLAUR*, los modelos cinéticos requieren de estandarizaciones más rigurosas que permitan obtener resultados comparables a través del tiempo. Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian que sí hay expresión basal del gen *PLAUR* en la línea celular AGS, sin embargo, no se observa una inducción en su expresión por causa de *H. pylori*. Adicionalmente, las grandes desviaciones obtenidas a la hora de promediar los resultados obtenidos en los experimentos con las cepas evidencian la necesidad de realizar mayor cantidad de experimentos para este modelo de co-cultivo.

El hecho de no haber encontrado diferencias en expresión con las células AGS, tras la infección con las cepas estudiadas de *H. pylori*, evidencia la necesidad de incluir mayor cantidad de cepas bacterianas en el estudio. De igual forma, para evaluar de forma más amplia la patogenicidad, deberían de incluirse cepas que no presenten el gen *cagA*. Otro factor a considerar en un futuro estudio, es la variabilidad que puede existir entre una cepa y otra, adicional a los factores de virulencia específicos; por lo que el uso de cepas isogénicas o mutantes para estudiar el rol de factores de virulencia puntuales, es una de las posibilidades que permitiría analizar aspectos específicos de la patogénesis de *H. pylori* y en este caso específico, determinar si la expresión de *PLAUR* se relaciona o no a

características particulares de la bacteria. Asimismo, el uso de otras líneas celulares, adicionales a las utilizadas en este proyecto, podría facilitar el estudio de este fenómeno.

En el caso del gen *PLAU*, no hay muchos estudios sobre la expresión *in vitro* de éste, o su relación con la presencia de *H. pylori*. Una investigación con células MKN-45 infectadas con la cepa NCTC11637 de *H. pylori* (CagA+) encontró una inducción de *PLAU* 12 veces mayor al valor de referencia, por medio de estimación indirecta de actividad luciferasa (Iwamoto, *et al.*, 2008). Adicionalmente, una investigación realizada por Kenny y colaboradores (2008), reveló que pacientes infectados con *H. pylori* presentaban niveles elevados de uPA en biopsias de tejido gástrico, comparados con los que no presentaban la bacteria. Sin embargo, al ser estudios que utilizan distintas metodologías de cuantificación y distintos modelos de experimentación no pueden ser comparables. Debido a que los resultados de la expresión de *PLAU* en respuesta a la infección por *H. pylori* obtenidos en esta investigación no fueron concluyentes, es necesario llevar a cabo más estudios para conocer cuál es el efecto de *H. pylori* en la expresión del activador de plasminógeno uroquinasa dado que hay muy pocos estudios a la fecha.

En cuanto a *MMP7*, existe mayor evidencia de su inducción en modelos *in vitro* de CG que en el caso de uPA. Un estudio en células AGS co-cultivadas con *H. pylori* 60190 (cagA+ y vacA+) y cepas isogénicas con delección para *cagA*, *cagE* o *vacA*, concluyó que la expresión a nivel proteico de *MMP-7* aumenta de 5 a 7 veces luego de 24 horas de infección con cepas de *H. pylori* Cag+. Éste también reveló que la cepa mutante de *cagE* es la única que no induce la expresión de *MMP7*, demostrando que la inducción de esta proteasa es independiente de *cagA* (Crawford, *et al.*, 2003).

Otro sistema *in vitro* implementado por Wroblewski y colaboradores (2003), utilizó la línea celular AGS y las cepas de *H. pylori* 60190, E5 (cagA+, vacA-) y E6 (cagA+, vacA+) para evaluar la inducción de *MMP-7* en sistema transgénico en el que el promotor de *MMP-7* controla la expresión del gen reportero luciferasa. Este estudio reveló que las cepas E5 y E6 aumentaron la expresión de *MMP-7* de 4 a 5 veces, comparado con las células control (sin infectar). Esto sugiere nuevamente, que la citotoxina CagA no es un factor relevante para producir esta respuesta. De forma similar, un estudio de cinética de expresión del gen *MMP-7* realizado en la línea celular MKN-28 de CG, reportó una

inducción del gen a partir de las 4 horas de co-cultivo con la cepa 7.13 (cagA+) de *H. pylori*. También, se determinó que la expresión relativa a las 4 horas post-infección aumentó alrededor de 4 veces respecto al gen de referencia, alcanzando un pico máximo de expresión a las 8 horas, con un aumento promedio de 13 veces (Odgen, *et al.*, 2008). Adicionalmente, se probaron dos cepas derivadas de la bacteria 7.13, una cagA- y otra cagE-. Estos resultados evidenciaron nuevamente que únicamente las cepas deficientes en cagE fallan en inducir la expresión de MMP7. En la actual investigación, no se encontró una expresión basal del gen que codifica para MMP7 en las líneas AGS y MKN74. Por otro lado, la línea celular MKN45 sí expresó de forma basal MMP7, sin embargo ésta no cambió su expresión en respuesta a *H. pylori*.

Una posible explicación de por qué en otros estudios se encuentra expresión de *PLAU* y *MMP7* en células AGS y en la presente investigación no se observa esta expresión basal, podría ser la variación de muchos factores que pueden diferir entre laboratorios en cuanto a la realización de este tipo de experimentos. Algunos de los factores más relevantes incluyen los reactivos, su almacenaje y gestión, la cantidad de células que se siembran por pozo, la confluencia celular a la hora de realizar la infección, los MOI de infección utilizados en los co-cultivos, el método de cuantificación de la expresión relativa, el número de pasaje en el que se encuentran las células utilizadas para el experimento, el estado fisiológico en el que se encuentran las bacterias, el pipeteo correcto de las muestras, entre otros.

El uso de *H. felis* por ser una especie emparentada capaz de inducir inflamación en modelos *in vivo* de CG, permite determinar si la inducción de los genes en estudio es específica a la especie de la bacteria estudiada. En el presente proyecto, se utilizó *H. felis* para tratar de esclarecer si la inducción de los genes *PLAUR*, *PLAU* y *MMP7* era un fenómeno asociado específicamente a *H. pylori*, o si éste puede ser recapitulado por otras especies del género *Helicobacter*. Los resultados obtenidos sugieren que *H. felis* es capaz de inducir la expresión de *PLAUR* en células AGS. Aunque este hallazgo debe ser verificado con estudios adicionales, no hay a la fecha publicaciones similares que reporten esta inducción para *H. felis*; ya que no hay investigaciones que hayan estudiado la inducción de este gen por parte de *H. felis*.

Pocos estudios han utilizado esta bacteria en experimentos *in vitro*. Conlin y colaboradores (2004) trabajaron un modelo experimental con células NCI-N87 infectadas tanto con *H. pylori* como con *H. felis* durante 48 horas, para determinar si las alteraciones en la expresión de ARNm de los genes relacionados con adhesión celular estudiados en su modelo era un fenómeno generalizado en respuesta a la infección bacteriana o si únicamente eran producidas por *H. pylori*. Los resultados indicaron que *H. felis* produjo cambios significativos en la expresión de la hexoquinasa y el receptor de adenosina A1; moléculas que también se han relacionado con la inducción de apoptosis (Saitoh, *et al.*, 2004; Tsuchiya & Nishizaki, 2015). Esto implica que para algunos genes específicos, *H. felis* es capaz de recapitular fenómenos de inducción que han sido relacionados con la infección por *H. pylori*.

Si bien la cepa CS1 de *H. felis* utilizada en estos experimentos de infección comparte algunos factores de virulencia con *H. pylori*, ésta no cuenta con el gen *vacA*, ni con la isla *cagPAI* en su genoma. El evidente aumento en la expresión del gen *PLAUR* a las 36 horas de co-cultivo con la línea AGS sugiere que la inducción de este gen no es estrictamente dependiente de CagA. En modelos murinos, *H. felis* ha demostrado ser tan carcinogénica o más, al ser comparada con cepas *cag+* de *H. pylori*; donde adicionalmente se ha observado que la inducción de lesiones preneoplásicas es mayor en estos modelos animales que cuando se utiliza *H. pylori* (Houghton & Wang, 2005). Otros estudios *in vivo* en ratones, han demostrado que tanto las bacterias *H. pylori* como *H. felis* son capaces de generar atrofia y metaplasia intestinal, lesiones displásicas de alto grado y carcinomas gástricos invasivos (Houghton & Wang, 2005). Por otra parte, se ha reportado que la infección con *H. felis* genera reacciones inflamaciones más severas (Houghton & Wang, 2005).

Los experimentos de infección con la bacteria *H. pylori* en la línea celular MKN-45 evidenciaron un cambio morfológico celular en tiempos tardíos de la infección. Este fenómeno llamado fenotipo “colibrí”, por la forma característica generada tras el re-arreglo del citoesqueleto, es un efecto de la infección por *H. pylori* bien conocido (Segal, *et al.*, 1996; Backert *et al.*, 2001). El fenotipo colibrí se distingue por una forma celular extremadamente alargada, similar a la observada durante la transición epitelial-

mesenquimal, en la cual se da una disrupción de contactos intercelulares y un aumento de la motilidad celular (Bessède, *et al.*, 2013). Este fenotipo es muy útil a nivel experimental porque evidencia que la infección *in vitro* ha sido exitosa.

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que la infección con cepas de *H. pylori* cagPAI positivas inducen la reorganización del citoesqueleto de actina de la célula hospedera (Segal, *et al.*, 1996), lo que respalda la inducción del fenotipo colibrí observada en el presente proyecto en las células co-cultivadas con la cepa 7.13 y en el caso de las AGS infectadas con la cepa 26695. Se ha encontrado que los niveles de CagA son más altos en el citoplasma de células con el fenotipo colibrí, al compararlas con células que mantienen su forma tras la infección con *H. pylori* (Bessède, *et al.*, 2013). Sin embargo, algunas investigaciones indican que aunque la proteína cagA juega un papel importante en la inducción de este fenotipo, ésta no es suficiente por sí sola. Se requiere de factores bacterianos adicionales para inducir los eventos de bioseñalización que llevan al cambio en la polaridad celular (Backert, *et al.*, 2001).

Varios estudios han demostrado que además de la proteína CagA, ciertos componentes del sistema de secreción tipo 4 (T4SS) juegan un papel determinante en la inducción de este cambio en la morfología celular. Se ha reportado que la activación de la vía JNK, mediadora de los cambios en la actina del citoesqueleto, depende del T4SS pero no de la presencia de la proteína CagA (Backert & Selbach, 2008; Snider, *et al.*, 2008). Esto evidencia la importancia de este sistema de secreción en la inducción del rearrreglo del citoesqueleto asociada al fenotipo colibrí.

La cepa SS1 de *H. pylori* utilizada en el presente estudio es *cagA+*, pero presenta una disfunción en el T4SS que no permite la translocación de CagA al citoplasma (Lee, *et al.*, 1997; Eaton, *et al.*, 2001; Crabtree, Ferrero & Kusters, 2002). El hecho de que en los experimentos realizados en la presente investigación, dicha cepa fue capaz de inducir este fenotipo alargado en las células infectadas, evidencia que la producción de CagA y su translocación al citoplasma celular no son los únicos factores que inducen estos cambios celulares morfológicos. Este hallazgo confirma que otros componentes bacterianos también participan en la inducción del fenotipo colibrí, como lo es sugerido por Snider y colaboradores (2008).

La línea celular MKN-45, al igual que las células AGS, utilizadas en la primera etapa de esta investigación, son células provenientes de adenocarcinomas de tipo difuso (Yokozaki, 2000). A diferencia del subtipo intestinal, la bacteria no está tan estrechamente implicada en la génesis del cáncer de tipo difuso. No obstante, varios estudios han revelado la inducción de la expresión de los genes remodeladores de tejido en estudio por parte de *H. pylori* en ambas líneas celulares. Por otro lado, la ausencia de expresión basal de los genes *PLAU* y *MMP-7* en las células AGS obtenida en la presente investigación, evidencia diferencias existentes entre el modelo aquí empleado y los utilizados en estos estudios, al igual que en los métodos de cuantificación utilizados.

Según los análisis realizados, las células MKN-45 no infectadas con *H. pylori* sí presentan expresión basal para los tres genes aquí estudiados, lo que permite utilizar esta línea para el estudio de la expresión de *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7* en cáncer gástrico. En el presente proyecto se determinó que *PLAU* y *PLAUR* son inducidos simultáneamente cuando la línea celular MKN-45 es co-cultivada con *H. pylori* 7.13. Estudios previos han reportado la expresión de *PLAUR* y *PLAU* en la línea celular MKN-45 (Ding, *et al.*, 2016). Iwamoto y colaboradores (2008) también encontraron que las expresiones de los ARNm de uPA y uPAR en células MKN-45 se vieron inducidos de forma evidente (12 y 3 veces respectivamente) tras la infección con la cepa CagA + NCTC11637; mientras que cepas negativas para CagA no lograron inducir su expresión (Iwamoto, *et al.*, 2005; Iwamoto, *et al.*, 2008). Estos resultados apoyan el uso de esta línea para estudios de expresión de ambos genes.

En el contexto tumoral, la expresión del ligando uPA y su receptor uPAR tienden a ser producidos por células tumorales y estromales, y en algunos casos el mismo tipo de célula expresa ambos (Lund, *et al.*, 2011). La expresión simultánea de uPA y uPAR propicia la conversión del plasminógeno en plasmina, lo cual favorece la remodelación de tejido que ocurre en etapas de invasión y metástasis. Aunque la evaluación de expresión se realizó a nivel de ARNm y no de proteína, esto nos permite conocer el comportamiento de inducción de los dos genes en respuesta a estímulos como lo es la bacteria *H. pylori*. Adicionalmente, la inducción de estos genes en un modelo *in vitro* demuestra que la presencia de la bacteria *H. pylori per se* logra aumentar su expresión de forma significativa;

sin embargo esto no permite concluir que el factor inflamatorio no sea de relevancia para que ésta inducción ocurra, ya que en un modelo *in vivo* se podría potenciar aún más la expresión de estos genes, como podría estar ocurriendo con el gen que no se observó inducido en este modelo.

En cuanto a la expresión del gen *MMP-7*, varios autores han reportado que *H. pylori* es capaz de inducir su expresión en células epiteliales gástricas de forma *in vitro* en las líneas celulares AGS (Crawford *et al.*, 2003; Wroblewski *et al.*, 2003) y MKN-28 (Ogden *et al.*, 2008). Sin embargo, no se encontró estudios que reportaran inducción del gen por parte de esta bacteria en la línea MKN-45; aunque sí se ha reportado la expresión basal de *MMP7* en esta línea celular (Yonemura, *et al.*, 2000). En la presente investigación, el gen *MMP7* fue expresado de forma basal por la línea celular MKN-45, sin embargo no fue inducido por *H. pylori*, lo que coincide con lo encontrado en la literatura.

Se ha reportado una elevada secreción de *MMP-7* en células epiteliales gástricas de pacientes infectados con *H. pylori*, en comparación con pacientes dispépticos negativos para la bacteria (Wroblewski, *et al.*, 2003). De forma similar, en modelos murinos se ha determinado que la expresión de *MMP-7* está relacionada con la inflamación severa desencadenada por la bacteria (Ogden, *et al.*, 2010). Estos resultados en conjunto, sugieren que la respuesta inflamatoria que desencadena la bacteria en los individuos infectados es importante para la expresión del gen *MMP7*, evidenciando la importancia del factor microambiente en el contexto tumoral para la inducción de este gen. Adicionalmente, estudios sobre mecanismos moleculares indican que *cag PAI* está implicada en la inducción de *MMP-7*, y que esta sobre-regulación es el resultado de la fosforilación y redistribución irregular de la catenina p-120, un componente importante de adherencia celular (Ogden, *et al.*, 2008). Según esta evidencia y los resultados obtenidos en el presente estudio, el hecho de que el gen *MMP7* no fuera inducido, podría estar relacionado con la ausencia de respuesta inflamatoria ante la bacteria por ser un modelo *in vitro*, a pesar de que la cepa 7.13 cuenta con la isla *cag PAI* en su genoma y es muy virulenta.

## Conclusiones y Recomendaciones

En conclusión, la expresión de *PLAUR*, *PLAU* y *MMP7* no se vio inducida por la infección con *H. pylori* en la línea celular AGS. Aunque el gen *PLAUR* mostró un nivel de expresión basal en esta línea celular no se observó inducción con ninguna de las dos cepas empleadas de *H. pylori*. Por otro lado, al no haber expresión basal de los genes *PLAU* y *MMP-7* en esta línea celular, no fue posible el estudio de la inducción por parte de las bacterias en este modelo. En cuanto a la infección con *H. felis*, se observó un aumento en la expresión del gen *PLAUR* a las 36 horas de co-cultivo en el modelo inicial con la línea celular AGS; lo que sugiere que la inducción ampliamente reportada de *H. pylori* para este gen no es especie-específica. Es importante tener claro que esta es una investigación preliminar y, por lo tanto, se deben llevar a cabo futuros estudios para confirmar este hallazgo.

En la actual investigación, se propone un modelo *in vitro* utilizando la línea celular MKN-45 y la bacteria *H. pylori* cepa 7.13, para realizar posteriores estudios *in vitro* con los genes *PLAUR*, *PLAU* y *MMP-7*. Este modelo es adecuado para futuras investigaciones, ya que presenta una expresión basal de los tres genes en estudio. Además, resultados preliminares de la implementación de este modelo, sugieren la inducción de los genes *PLAU* y *PLAUR* por la cepa de *H. pylori* 7.13 a las 24 horas de co-cultivo. La inducción de estos genes en un modelo *in vitro* permite concluir que la presencia de la bacteria *H. pylori* *per se* logra aumentar su expresión de forma significativa; sin embargo esto no permite concluir que el factor inflamatorio no sea de relevancia para que ésta inducción ocurra.

El uso de modelos bioinformáticos a partir de datos del transcriptoma de líneas celulares de cáncer gástrico como las empleadas en esta investigación, podría ser una plataforma muy útil para complementar estudios *in vitro*. Específicamente, los estudios *in silico* permitirían predecir redes de regulación, vías de señalización o posibles interacciones entre genes que ayuden a explorar la interrogante de por qué no se encontró aumento en la expresión del gen *MMP7* en el modelo con células MKN-45, cuando los miembros del sistema de activación de plasminógeno sí se vieron inducidos. Adicionalmente, este tipo de estudios contribuirían al entendimiento de la infección con la bacteria y sus efectos a nivel

de expresión génica. De igual forma, el ampliar el conocimiento sobre interacciones génicas a nivel de líneas celulares permitiría evidenciar conexiones importantes que se pueden estar escapando en el estudio de modelos más complejos, como lo son los estudios en pacientes o en modelos *in vivo* experimentales.

La importancia de generar procesos de estandarización de la plataforma *in vitro* de experimentación es fundamental para los estudios de cinética de expresión de genes. La optimización preliminar del modelo a utilizar en una investigación, además de optimizar el tiempo y recursos del proyecto, acerca al investigador a resultados más certeros. Por último, es necesario reconocer que el hecho de que exista literatura que apoye un resultado positivo del modelo, no se traduce en éxito seguro del modelo bajo la implementación propia. Uno de los aportes más importantes de este estudio es precisamente haber explorado diferentes líneas celulares de CG, cepas de *H. pylori* y *H. felis* para determinar las combinaciones más adecuadas para llevar a cabo estudios futuros sobre la posible relación entre la infección por especies del género *Helicobacter* y la expresión de *PLAUR*, *PLAU* y *MMP7*.

## Bibliografía

- Aihara, R., Mochiki, E., Kamiyama, Y., Ohno, T., Asao, T. & Kuwano, H. (2006). Matrilysin expression is a useful marker of submucosal invasion and lymph node metastasis in early stage signet ring cell carcinoma of the stomach. *Journal of Surgical Oncology*, 93, 491–497.
- Alpízar-Alpízar, W., Schnack, B., Sierra, R., Illemann, M., Ramírez, J.A., Arias, A., Durán, S., Skarstein, A., Ovrebo, K., Lund, L.R. & Laerum, O.D. (2010). Urokinase plasminogen activator receptor is expressed in invasive cells in gastric carcinomas from high- and low-risk countries. *International Journal of Cancer*, 126, 405–415.
- Alpízar-Alpízar, W., Christensen, I.B., Santoni-Rugiu, E., Skarstein, A., Ovrebo, K., Illemann, M. & Laerum, O.D. (2012). Urokinase plasminogen activator receptor on invasive cancer cells: a prognostic factor in distal gastric adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*, 131, E329–E336.
- Alpízar-Alpízar, W., Skindersoe, M.E., Rasmussen, L., Kriegbaum, M.C., Christensen, I.J., Lund, I.K., Laerum, O.D., Krogfelt, K.A., Andersen, L.P. & Ploug, M. (2013). *Helicobacter pylori* colonization drives urokinase receptor expression in murine gastric epithelium during early pathogenesis. *Helicobacter*, 18 (Issue supplement S1):85.
- Alpízar-Alpízar, W., Malespín-Bendaña, W., Une, C. & Ramírez-Mayorga, V. (2018). Relevance of the plasminogen activation system in the pathogenesis and progression of gastric cancer. *Revista Biología Tropical*, 66, 28–47.
- Atherton, J. C., Cao, P., Peek, R.M., Tummuru, M.K., Blaser, M.J. & Cover, T.L. (1995). Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 17771–17777.
- Ayraud, S., Janvier, B. & Fauchère, J.L (2002). Experimental colonization of mice by fresh clinical isolates of *Helicobacter pylori* is not influenced by the cagA status and the vacA genotype. *Immunology and Medical Microbiology*, 34, 169–172.

- Backert, S., Moese, S., Selbach, M., Brinkmann, V. & Meyer, T.F. (2001). Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Molecular Microbiology*, 42, 631–644.
- Backert, S. & Selbach, M. (2008). Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 10, 1573–1581.
- Bessède, E., Staedel, C., Acuña, L.A., Nguyen, P.H., Chambonnier, L., Hatakeyama, M., Belleannée, G., Mégraud, F. & Varon, C. (2013). *Helicobacter pylori* generates cells with cancer stem cell properties via epithelial–mesenchymal transition–like changes. *Oncogene*, 33, 4123–4131.
- Blaser, M.J., Perez-Perez, G.I., Kleanthous, H., Cover, T.L., Peek, R.M., Chyou, P.H., Stemmermann, G.N. & Nomura, A. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is Associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach. *Cancer Research*, 55, 2111–2115.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 0, 1–31.
- Burkitt, M.D., Duckworth, C.A., Williams, J.M. & Pritchard, D.M. (2017). *Helicobacter pylori*-induced gastric pathology: insights from *in vivo* and *ex vivo* models. *Disease Models & Mechanisms*, 10, 89–104.
- Cappellani, A., Zhang, A., Di Vita, M., Zanet, E., Veroux, P., Cacopardo, B., Cavallaro, A., Piccolo, G., Lo Menzo, E., Murabito, P. & Berretta, M. (2010). Clinical and biological markers in gastric cancer: update and perspectives. *Frontiers in Bioscience*, S2, 403–412.
- Chung, T.W., Moon, S.K., Chang, Y.C., Ko, J.H., Lee, Y.C., Cho, G., Kim, S.H., Kim, J.G. & Kim, C.H. (2004). Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *The FASEB Journal*, 18, 1670–1681.

- Chung, C., Olivares, A., Torres, E., Yilmaz, O., Cohen, H. & Perez-Perez, G. (2010). Diversity of VacA intermediate region among *Helicobacter pylori* strains from several regions of the world. *Journal of Clinical Microbiology*, 48, 690–696.
- Conlin, V.S., Curtis, S.B., Zhao, Y., Moore, E.D.W., Smith, V.C., Meloche, R.M., Finlay, B.B. & Buchan A.M.J. (2004). *Helicobacter pylori* infection targets adherens junction regulatory proteins and results in increased rates of migration in human gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*, 72, 5181–5192.
- Cover, T.L. & Blanke, S.R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 320–332.
- Crabtree, J. E., Ferrero, R. L. & Kusters, J. G. (2002). The mouse colonizing *Helicobacter pylori* strain SS1 may lack a functional cag pathogenicity island. *Helicobacter* 7, 139-140.
- Crawford, H.C., Krishna, U.S., Israel, D.A., Matrisian, L.M., Washington, M.K. & Peek, R.M. (2003). *Helicobacter pylori* strain – selective induction of matrix metalloproteinase-7 in vitro and within gastric mucosa. *Gastroenterology*, 125, 1125–1136.
- Danesh, P. (1999). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: systematic review of the epidemiological studies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 13, 851–856.
- Dass, K., Ahmad, A., Azmi, A.S., Sarkar, S.H. & Sarkar, F.H., (2008). Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. *Cancer Treatment Reviews*, 34, 122–136.
- De Bernard, M., Arico, B., Papini, E., Rizzuto, R., Grandi, G., Rappuoli, R. & Montecucco, C. (1997). *Helicobacter pylori* toxin VacA induces vacuole formation by acting in the cell cytosol. *Molecular Microbiology*, 26, 665–674.
- De Martel, C., Forman, D. & Plummer, M. (2013). Gastric Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Gastroenterology Clinics of North America*, 42, 219–240.
- Ding, Y., Zhang, H., Lu, A., Zhou, Z., Zhong, M., Shen, D., Wang, X. & Zhu, Z. (2016). Effect of urokinase-type plasminogen activator system in gastric cancer with peritoneal metastasis. *Oncology Letters*, 11, 4208-4216.

- Eaton, K. A., Kersulyte, D., Mefford, M., Danon, S. J., Krakowka, S. & Berg, D. E. (2001). Role of *Helicobacter pylori* cag region genes in colonization and gastritis in two animal models. *Infection and Immunity*, 69, 2902–2908.
- Enno, A., O'Rourke, J. L., Howlett, C. R., Jack, A., Dixon, M. F. & Lee, A. (1995). MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *The American Journal of Pathology*, 147, 217–222.
- Enno, A., O'Rourke, J., Braye, S., Howlett, R. & Lee, A. (1998). Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *The American Journal of Pathology*, 152, 1625–1632.
- Falush D., Wirth T., Linz B., Pritchard J. K., Stephens M., Kidd M., Blaser M. J., Graham D. Y., Vacher S., Perez-Perez G.I., Yamaoka, Y., Mégraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M. & Suerbaum, S. (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science*, 299, 1582–1585.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136, E359–E386.
- Fox, J. G., Beck, P., Dangler, C. A., Whary, M. T., Wang, T. C., Shi, H. N. & Nagler-Anderson, C. (2000). Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces *Helicobacter*-induced gastric atrophy. *Nature Medicine*, 6, 536–542.
- Fox, J. G., Sheppard, B. J., Dangler, C. A., Whary, M. T., Ihrig, M. & Wang, T. C. (2002). Germ-line p53-targeted disruption inhibits *Helicobacter*-induced premalignant lesions and invasive gastric carcinoma through down-regulation of Th1 proinflammatory responses. *Cancer Research*, 62, 696–702.
- Fukase, K., Kato, M., Kikuchi, S., Inoue, K., Uemura, N., Okamoto, S., Terao, S., Amagai, K., Hayashi, S. & Asaka, M. (2008). Effect of eradication of *Helicobacter pylori*

on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label randomised controlled trial. *Lancet*, 372, 392–397.

Gerhard, M., Lehn, N., Neumayer, N., Boren, T., Rad, R., Schepp, W., Miehle, S., Classen, M. & Prinz, C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 12778–12783.

Global Cancer Observatory (GCO). (2018). International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Recuperado de: <https://gco.iarc.fr/>

Graham D. Y. (2015). *Helicobacter pylori* update: gastric cancer, reliable therapy, and possible benefits. *Gastroenterology* 148, 719–731.

Hanahan, D. & Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 646–674.

Heiss, M.M., Simon, E.H., Beyer, B.C., Gruetzner, K.U., Tarabichi, A., Babic, R., Schildberg, F.W. & Allgayer, H. (2002). Minimal residual disease in gastric cancer: evidence of an independent prognostic relevance of urokinase receptor expression by disseminated tumor cells in the bone marrow. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 2005–2016.

Houghton, J.M. & Wang, T.C. (2005). Helicobacter pylori and Gastric Cancer: A New Paradigm for Inflammation-Associated Epithelial Cancers. *Gastroenterology*, 128, 1567–1578.

Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R. & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3, 251–261.

Iwamoto, J., Mizokami, Y., Takahashi, K., Nakajima, K., Ohtsubo, T., Miura, S., Narasaka, T., Takeyama, H., Omata, T., Shimokobe, K., Ito, M., Takehara, H. & Matsuoka, T. (2005). Expressions of urokinase-type plasminogen activator, its receptor and

- plasminogen activator inhibitor-1 in gastric cancer cells and effects of *Helicobacter pylori*. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40, 783–793.
- Iwamoto, J., Mizokami, Y., Takahashi, K., Matsuoka, T. & Matsuzaki, Y. (2008). The Effects of Cyclooxygenase2–ProstaglandinE2 Pathway on *Helicobacter pylori*-Induced Urokinase-Type Plasminogen Activator System in the Gastric Cancer Cells. *Helicobacter*, 13, 174–182.
- Ji, X., Fernandez, T., Burroni, D., Pagliaccia, C., Atherton, J.C., Reyrat, J.M., Rappuoli, R. & Telford, J.L. (2000). Cell specificity of *Helicobacter pylori* cytotoxin is determined by a short region in the polymorphic mid region. *Infection and Immunity*, 68, 3754–3757.
- Ji, F., Chen, Y.L., Jin, E.Y., Wang, W.L., Yang, Z.L. & Li, Y.M. (2005). Relationship between matrix metalloproteinase-2 mRNA expression and clinicopathological and urokinase-type plasminogen activator system parameters and prognosis in human gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 3222–3226.
- Katsios, C. & Roukos, D.H. (2010). Individual genomes and personalized medicine: life diversity and complexity. *Personalized Medicine*, 7, 347–350.
- Kenny, S., Duval, C., Sammut, S. J., Steele, I., Pritchard, D. M., Atherton, J. C., Argent, R. H., Dimaline, R., Dockray, G. J. & Varro, A. (2008). Increased expression of the urokinase plasminogen activator system by *Helicobacter pylori* in gastric epithelial cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 295, G431-441.
- Kessenbrock, K., Plaks, V. & Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, 141, 52–67.
- Kim, H.S., Kim, M.H., Jeong, M., Hwang, Y.S., Lim, S.H., Shin, B.A. Ahn, B.W. & Jung, Y.D. (2004). EGCG Blocks tumor promoter-induced MMP-9 expression via suppression of MAPK and AP-1 activation in human gastric AGS cells. *International Journal of Cancer Research and Treatment*, 24, 747–754.

- Kim, M.H., Yoo, H.S., Chang, H.J., Hong, M.H., Kim, H.D., Chung, I.J., Shin, B.A., Cho, M.J., Ahn, B.W. & Jung, Y.D. (2005). Urokinase plasminogen activator receptor is upregulated by *Helicobacter pylori* in human gastric cancer AGS cells via ERK, JNK, and AP-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333, 874–80.
- Kim, S.S., Ruíz, V.E., Carroll, J.D. & Moss, S.F. (2011). *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Letters*, 305, 228–238.
- Kitoh, T., Yanai, H., Saitoh, Y., Nakamura, Y., Matsubara, Y., Kitoh, H., Yoshida, T. & Okita, K. (2004). Increased expression of matrix metalloproteinase-7 in invasive early gastric cancer. *Journal of Gastroenterology*, 39, 434–440.
- Koskensalo, S., Mrena, J., Wiksten, J.P., Nordling, S., Kokkola, A., Hagström, J. & Haglund, C. (2010). MMP-7 overexpression is an independent prognostic marker in gastric cancer. *Tumor Biology*, 31, 149–155.
- Krakowiak, M.S., Noto, J.M., Piazzuelo, M.B., Hardbower, D.M., Romero-Gallo, J., Delgado, A., Chaturvedi, R., Correa, P., Wilson, K.T. & Peek, R.M. (2015). Matrix metalloproteinase 7 restrains *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and premalignant lesions in the stomach by altering macrophage polarization. *Oncogene*, 34, 1865–1871.
- Kriegbaum, M.C., Persson, M., Haldager, L., Alpízar-Alpízar, W., Jacobsen, B., Gårdsvoll, H., Kjær, A. & Ploug, M. (2011). Rational Targeting of the Urokinase Receptor (uPAR): Development of Antagonists and Non-Invasive Imaging Probes. *Current Drug Targets*, 12, 1711–1728.
- Kuang, R.G., Wu, H.X., Hao, G.X., Wang, J.W. & Zhou, C.J. (2013). Expression and significance of IGF-2, PCNA, MMP-7, and  $\alpha$ -actin in gastric carcinoma with Lauren classification. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 24, 99–108.
- Lambert, A.W., Pattabiraman, D.R. & Weinberg, R.A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168, 670–691.

- Lauren, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 64, 31–49.
- Lee, A., Fox, J.G., Otto, G. & Murphy, J. (1990). A small animal model of human *Helicobacter pylori* chronic gastritis. *Gastroenterology*, 99, 1315–1325.
- Lee, A., Chen, M., Coltro, N., O'Rourke, J., Hazell, S., Hu, P. & Li, Y. (1993). Long-term infection of the gastric mucosa with *Helicobacter* species does induce atrophic gastritis in an animal model of *Helicobacter pylori* infection. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 280, 38–50.
- Lee, A., O'Rourke, J., De Ungria, M.C., Robertson, B., Daskalopoulos, G. & Dixon, M.F. (1997). A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection – introducing the Sydney strain. *Gastroenterology*, 112, 1386–1397.
- Lee, K.H., Shin, S.J., Kim, K.O., Kim, M.K., Hyun, M.S., Kim, T.N., Jang, B.I., Kim, S.W., Song, S.K., Kim, H.S., Bae, S.H. & Ryoo, H.M. (2006). Relationship between E-cadherin, matrix metalloproteinase-7 gene expression and clinicopathological features in gastric carcinoma. *Oncology Reports*, 16, 823–830.
- Li, N., Han, L., Chen, J., Lin, X., Chen, H. & She, F. (2013). Proliferative and apoptotic effects of gastric epithelial cells induced by coccoid *Helicobacter pylori*. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 147–155.
- Linz B., Balloux F., Moodley Y., Manica A., Liu H., Roumagnac P., Falush D., Stamer C., Prugnolle F., van der Merwe S.W., Yamaoka, Y., Graham, D.Y., Perez-Trallero, E., Wadstrom, T., Suerbaum, S. & Achtman, M. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 445, 915–918.
- Liu, D., Aguirre, G. J., Estrada, Y. & Ossowski, L. (2002). EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. *Cancer Cell*, 1, 445–457.

- Louw, J.A., Kidd, M.S., Kummer, A.F., Taylor, K., Kotze, U. & Hanslo, D. (2001). The relationship between *Helicobacter pylori* infection, the virulence genotypes of the infecting strain and gastric cancer in the African setting. *Helicobacter*, 6, 268–273.
- Lovitt, C.J., Shelper, T.B. & Avery, V.M. (2014). Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. *Biology*, 3, 345–367.
- Lund, I.K., Illemann, M., Thurison, T., Christensen, I.J. & Høyer-Hansen, G. (2011). uPAR as Anti-Cancer Target: Evaluation of Biomarker Potential, Histological Localization, and Antibody-Based Therapy. *Current Drug Targets*, 12, 1744–1760.
- Ma, Y.Y. & Tao, H.Q. (2012). Role of Urokinase Plasminogen Activator Receptor in Gastric Cancer: A Potential Therapeutic Target. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 27, 285–290.
- Matysiak-Budnik, T. & Mégraud, F. (2006). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *European Journal of Cancer*, 42, 708–716.
- McClain, M.S., Cao, P., Iwamoto, H., Vinion-Dubiel, A.D., Szabo, G., Shao, Z. & Cover, T.L. (2001). A 12-amino-acid segment present in types 2 but not types 1 *Helicobacter pylori* VacA proteins abolishes cyto-toxin activity and alters membrane channel formation. *Journal of Bacteriology*, 183, 6499–6508.
- Mégraud, F., Bessède, E. & Varon, C. (2015). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 984–990.
- Miehlke, S., Kirsch, C., Agha-Amiri, K., Gunther, T., Lehn, N., Malfertheiner, P., Stolte, M., Ehninger, G. & Bayerdorffer, E. (2000). The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *International Journal of Cancer*, 87, 322–327.
- Mitsiades, N., Yu, W.H., Poulaki, V., Tsokos, M. & Stamenkovic, I. (2001). Matrix metalloproteinase-7-mediated cleavage of Fas ligand protects tumor cells from chemotherapeutic drug cytotoxicity. *Cancer Research*, 61, 577–581.

- Odgen, S.R., Wroblewski, L.E., Weydig, C., Romero-Gallo, J., O'Brien, D.P., Israel, D.A., Krishna, U.S., Fingleton, B., Reynolds, A.B., Wessler, S. & Peek, R.M. (2008). p120 and Kaiso regulate *Helicobacter pylori*-induced expression of matrix metalloproteinase-7. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 4110–4121.
- Odgen, S.R., Noto, J.M., Allen, S.S., Patel, D.A., Romero-Gallo, J., Washington, M.K., Fingleton, B., Israel, D.A., Lewis, N.D., Wilson, K.T., Chaturvedi, R., Zhao, Z., Shyr, Y. & Peek, R.M. (2010). Matrix Metalloproteinase-7 and Premalignant Host Responses in *Helicobacter pylori*- Infected Mice. *Cancer Research*, 70, 30–35.
- Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T. & Hatakeyama, M. (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 1003–1008.
- Okayama, H., Kumamoto, K., Saitou, K., Hayase, S., Kofunato, Y. Sato, Y., Miyamoto, K., Nakamura, I., Ohki, S., Sekikawa, K. & Takenoshita, S. (2009). CD44v6, MMP- 7 and nuclear Cdx2 are significant biomarkers for prediction of lymph node metastasis in primary gastric cancer. *Oncology Reports*, 22, 745–755.
- Palframan, S.L., Kwok, T. & Gabriel, K. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 92.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.P., Chang, Y., Vogelmann, J.H., Orentreich, N. & Sibley, R.K. (1991). *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 325, 1127–1131.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N. & Vogelmann, J.H. (1997). Risk for Gastric Cancer in People with CagA Positive or CagA Negative *Helicobacter pylori* infection. *British Society of Gastroenterology*, 40, 297–301.
- Perkins, N.D. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 49–62.

- Piazuelo, M.B. & Correa, P. (2013). Gastric Cancer: Overview. *Colombia Médica*, 44, 192–201.
- Plummer, M., Franceschi, S., Vignat, J., Forman, D. & de Martel, C. (2014). Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *International Journal of Cancer*, 136, 487–490.
- Rhead, J.L., Letley, D.P., Mohammadi, M., Hussein, N., Mohagheghi, M.A., Hosseini, E.M. & Atherton, J.C. (2007). A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*, 133, 926–936.
- Rugge, M., Fassan, M. & Graham, D.Y. (2015). Epidemiology of Gastric Cancer. In Strong, V.E. (Eds.), *Gastric Cancer: Principles and Practice* (pp. 23-34). Switzerland, Springer International Publishing.
- Sabet, T., Piazuelo, M.B., Shaffer, C.L., Schneider, B.G., Asim, M., Chaturvedi, R., Bravo, L.E., Sicinschi, L.A., Delgado, A.G., Mera, R.M., Israel, D., Romero-Gallo, J., Peek, R.M., Cover, T.L., Correa, P. & Wilson, K.T. (2011). Phylogeographic origin of *Helicobacter pylori* is a determinant of gastric cancer risk. *British Society of Gastroenterology*, 60, 1189–1195.
- Saha, A., Hammond, C.E., Trojanowska, M. & Smolka, A.J. (2008). *Helicobacter pylori*-induced H,K-ATPase alpha-subunit gene repression is mediated by NF-kappaB p50 homodimer promoter binding. *The American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 294, G795–G807.
- Saitoh, M., Nagai, K., Nakagawa, K., Yamamura, T., Yamamoto, S. & Nishizaki, T. (2004). Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochemical Pharmacology*, 67, 2005–2011.
- Salama, N.R., Hartung, M.L. & Müller, A. (2013). Life in the Human Stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 385–399.

- Scorilas, A., Karameris, A., Arnogiannaki, N., Ardavanis, A., Bassilopoulos, P., Trangas, T. & Talieri, M. (2001) Overexpression of matrix-metalloproteinase-9 in human breast cancer: a potential favourable indicator in node-negative patients. *British Journal of Cancer*, 84, 1488–1496.
- Segal, E.D., Falkow, S., and Tompkins, L.S. (1996). *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 1259 – 1264.
- Shirin, H., Sordillo, E.M., Oh, S.H., Yamamoto, H., Delohery, T., Weinstein, L.B. & Moss, S.F. (1999). *Helicobacter pylori* inhibits the G1 to S transition in AGS gastric epithelial cells. *Cancer Research*, 59, 2277–2281.
- Sier, C.F., Kubben, F.J., Ganesh, S., Heerding, M.M., Griffioen, G., Hanemaaijer, R., van Krieken, J.H., Lamers, C.B. & Verspaget, H.W. (1996). Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *British Journal of Cancer*, 74, 413–417.
- Sierra, R., Muñoz, N., Peña, A.S., Biemond, I., Van Duijn, W., Lamers, C.B., Teuchmann, S., Hernandez, S. & Correa, P. (1992). Antibodies to *Helicobacter pylori* and pepsinogen levels in children from Costa Rica: comparison of two areas with different risks for stomach cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 1, 449–454.
- Sierra, R., Une, C., Ramírez, V., González, M.I., Ramírez, J.A., de Mascarel, A., Barahona, R., Salas-Aguilar, R., Páez, R., Avendaño, G., Ávalos, A., Broutet, N. & Mégraud, F. (2006). Association of serum pepsinogen with atrophic body gastritis in Costa Rica. *Clinical and Experimental Medicine*, 6, 72–78.
- Sierra, R., Une, C., Ramírez, V., Alpízar-Alpízar, W., González, M.I., Ramírez, J.A., de Mascarel, A., Cuenca, P., Pérez-Pérez, G. & Mégraud, F. (2008). Relation of atrophic gastritis with *Helicobacter pylori*-CagA<sup>+</sup> and interleukin-1 gene polymorphisms. *World Journal of Gastroenterology*, 14, 6481–6487.

- Sitarz, R., Skierucha, M., Mielko, J., Offerhaus, J.A., Maciejewski, R & Polkowski, P. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Management and Research*, 10, 239–248.
- Smith, H.W. & Marshall, C.J. (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 23–36.
- Snider, J., Allison, C., Bellaire, B., Ferrero, R. & Cardelli, J. (2008). The  $\beta$  1 Integrin Activates JNK Independent of CagA, and JNK Activation Is Required for *Helicobacter pylori* CagA+-induced Motility of Gastric Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283, 13952–13963.
- Soleyman-Jahi, S., Nedjat, S., Abdirad, A., Hoorshad, N., Heidari, R. & Zendehtdel, K. (2015). Prognostic Significance of Matrix Metalloproteinase-7 in Gastric Cancer Survival: A Meta-Analysis. *PLoS One*, 10, e0122316.
- Tang, Y., Zhu, J., Chen, L., Zhang, S. & Lin, J. (2008). Associations of matrix metalloproteinase-9 protein polymorphisms with lymph node metastasis but not invasion of gastric cancer. *Clinical Cancer Research*, 14, 2870–2877.
- Tsuchiya, A. & Nishizaki, T. (2015). Anticancer effect of adenosine on gastric cancer *via* diverse signaling pathways. *World Journal of Gastroenterology*, 21, 10931–10935.
- Valastyan, S. & Weinberg, R.A. (2011). Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*, 147, 275–292.
- Van Doorn, N.E., Namavar, F., Sparrius, M., Stoof, J., van Rees, E.P., van Doorn, L.J. & Vandenbroucke-Grauls, C.M. (1999). *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infection and Immunity*, 67, 3040–3046.
- Vargo-Gogola, T., Fingleton, B., Crawford, H.C. & Matrisian, L.M. (2002). Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) selects for apoptosis resistant mammary cells *in vivo*. *Cancer Research*, 62, 5559–5563.

- Varon, C., Dubus, P., Mazurier, F., Asencio, C., Chambonnier, L., Ferrand, J., Giese, A., Senant-Dugot, N., Carlotti, M. & Mégraud, F. (2012). *Helicobacter pylori* Infection Recruits Bone Marrow-Derived Cells That Participate in Gastric Preneoplasia in Mice. *Gastroenterology*, 142, 281–291.
- Waas, E.T., Lomme, R.M., DeGroot, J., Wobbes, T. & Hendriks, T. (2002). Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, 86, 1876–1883.
- Wang, F., Meng, W., Wang, B. & Qiao, L. (2014). *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Letters*, 345, 192–202.
- Wroblewski, L.E., Noble, P.J.M., Pagliocca, A., Pritchard, D.M., Hart, C.A., Campbell, F., Dodson, A.R., Dockray, G.J. & Varro1, A. (2003). Stimulation of MMP-7 (matrilysin) by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells: role in epithelial cell migration. *Journal of Cell Science*, 116, 3017–3026.
- Wroblewski, L.E., Peek, R.M. & Wilson, K.T. (2010). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer: Factors That Modulate Disease Risk. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 713–739.
- Xia, X., Zhifang, L., Ming, F., Han, Y., Xiuming, L., Xinpeng, L., Xianxi, L., Chunyan, C. & Jihui, J. (2012). *Helicobacter pylori* CagA induces ornithine decarboxylase upregulation via Src/MEK/ERK/c-Myc pathway: implication for progression of gastric diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 237, 435–441.
- Yamashita, K., Azumano, I., Mai, M. & Okada, Y. (1998). Expression and tissue localization of matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) in human gastric carcinomas. Implications for vessel invasion and metastasis. *International Journal of Cancer*, 79, 187–94.
- Yeh, Y.C., Sheu, B.S., Cheng, H.C., Wang, Y.L., Yang, H.B. & Wu, J.J. (2010). Elevated serum matrix metalloproteinase-3 and -7 in H. pylori-related gastric cancer can be biomarkers correlating with a poor survival. *Digestive Diseases and Sciences*, 55, 1649–1657.

- Yokozaki, H. (2000). Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathology International*, 50, 767–777.
- Yonemura, Y., Endou, Y., Fujita, H., Fushida, S., Bandou, E., Taniguchi, K., Miwa, K., Sugiyama, K. & Sasaki, S. (2000). Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Gastric Cancer*, 3, 63-70.
- Yu, W., Kim, J. & Ossowski, L. (1997). Reduction in surface urokinase receptor forces malignant cells into a protracted state of dormancy. *Journal of Cell Biology*, 137, 767–777.