



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

**ROL DE LA MICROBIOTA DEL JUGO GÁSTRICO EN LA
RESPUESTA INMUNE INNATA DE MUCOSA EN LA INFECCIÓN
PEDIÁTRICA POR *H. PYLORI***

POR
CAROLL DAFFNER HERNÁNDEZ VARGAS

Tesis presentada a la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de
Chile para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Médicas

Profesores guía:
Dra. Carolina Serrano Honeyman y Dr. Paul Harris Diez

Enero 2019
Santiago, Chile

Dedicatoria

*A mi familia; mis padres Patricia y Mario, mis hermanos Betsabeth y David y a mi
compañero de vida Felipe.*

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer al Programa de Doctorado en Ciencias Médicas, de la Pontificia Universidad Católica, por escogerme entre tantos postulantes para continuar generando conocimiento a través de las clases y las unidades de investigación llevadas a cabo en su programa y por supuesto por el financiamiento que me entregaron.

En cuanto a financiamiento respecta, agradecimientos CONICYT por brindarme la Beca Doctorado Nacional 2016 #21160563, la cual me permitió una dedicación exclusiva al programa de doctorado, me permitió realizar una pasantía en el extranjero y en conjunto con el proyecto FONDECYT de Inicio #11140232 de la Dra. Carolina Serrano pude llevar a cabo los experimentos desarrollados en esta tesis.

Por su puesto, agradecer al Dr. Paul Harris, quien desde el momento en que me conoció me impulsó a visualizar mi futuro académico/laboral y construir el camino para llegar a él.

A mis tutores el Dr. Paul Harris y la Dra. Carolina Serrano, muchas gracias por guiarme en el desarrollo de mi tesis y por el apoyo brindado durante el aprendizaje que esta conlleva. Especialmente a la Dra. Serrano quisiera agradecerle todo el apoyo que me dio en todos los trámites involucrados con la pasantía en el extranjero y en la pasantía propiamente tal. Nunca olvidaré las largas conversaciones acerca de la vida y del futuro. Una de las cosas que he aprendido en el laboratorio es de la importancia del trabajo en equipo por lo que estoy tremendamente agradecida de todas las personas que han sido parte del Laboratorio de Infección e Inmunología Gastrointestinal, dirigido por Dr. Harris y la Dra. Serrano, especialmente de Andrea Villagrán, Macarena Vera, Camila Palma, Miguel León y Mauricio Sandoval, de quienes valoro muchísimo su colaboración en cada uno de los roles que cumplían en el laboratorio.

También quisiera agradecer a los investigadores y grupos de investigación que aportaron de alguna manera en mi camino del doctorado. Entre ellos, a todo el grupo de bellas personas que conocí en el Laboratorio de Virología Molecular, el cual es liderado por el Dr. Marcelo López Lastra. Al equipo de investigación del Dr. José Manuel Santos, por

permitirme el acceso a utilizar su equipo de QPCR real time y por su puesto al Dr. Hugo Tobar, por facilitarme el uso, inclusive diario, del real time. Agradezco también al Dr. Corvalán, por facilitarnos la línea celular AGS utilizada en esta tesis.

De manera especial, quisiera agradecer al Dr. Phillip Smith y la Dra. Lesley Smythies, quienes me recibieron en su laboratorio durante mi pasantía en la Universidad de Alabama en Birmingham, Estados Unidos. Ambos grandes investigadores, sumamente generosos en compartir sus conocimientos, experiencia y material de laboratorio sin miramiento alguno. Gracias, no sólo por su apoyo en la investigación, sino por todos los momentos que compartí con ustedes durante cuatro meses en Estados Unidos, sin duda una de las mejores experiencias de mi vida.

Ya de índole personal, quisiera agradecer a mi familia, a mis padres Patricia y Mario por enseñarme el significado de perseverancia y esfuerzo, por su apoyo y amor incondicional. A mi hermano David, quien también me enseñó una palabra, resiliencia. A mi hermana menor Betsabeth, por ser mi gran apoyo, amiga y por todos los cariños y ánimos que me dio cuando los necesité.

Quisiera también agradecer a Felipe Carvajal, con quien ya son casi tres años de amor, con quien he compartido las alegrías y los ratos grises que se viven en esta carrera, juntos nos hemos apoyado y hemos logrado salir adelante sintiéndonos orgullosos el uno del otro al finalizar esta etapa académica. Junto con ello quisiera también agradecer a quienes forman parte de mi otra o nueva familia, sus padres, gracias por el apoyo y por siempre estar pendiente de los pasos que damos.

Muchas gracias también a los amigos, las niñas y los niños, por el apoyo, el oportuno consejo y por a veces sólo escuchar.

Para finalizar esta sección, doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta este punto, por darme las fuerzas cuando lo necesité y por darme el amor y apoyo de mi familia y de las maravillosas personas que me rodean.

Tabla de contenidos

Dedicatoria	i
Agradecimientos.....	ii
Tabla de contenidos.....	iv
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Resumen	xiv
Introducción	1
1. Historia natural de la infección por <i>H. pylori</i>	1
2. Respuesta inmune innata mucosal y su inducción por la infección con <i>H. pylori</i>	3
2.1. Reconocimiento mediante receptores TLRs	4
2.2. Mediadores inmunes	7
2.3. Moléculas efectoras.....	8
2.4. Proteínas formadoras de uniones estrechas en la barrera de células epiteliales	9
3. Microbiota gástrica y <i>H. pylori</i>	13
Hipótesis	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Materiales y métodos	18
I. Materiales	18
1. Reactivos	18
II. Metodología	20
1. Diseño experimental.....	20
2. Donantes de jugo gástrico y muestras de jugo gástrico	21
2.1. Remoción bacteriana del jugo gástrico	22

2.2. Caracterización de la microbiota del jugo gástrico	22
2.3. Secuenciación del gen <i>16S rDNA</i>	23
2.4. Análisis bioinformático	23
3. Ensayos <i>in vitro</i> en la línea celular AGS	24
3.1. Cultivo bacteriano de <i>H. pylori</i>	24
3.2. Cultivo de células AGS	25
3.3. Curso temporal dosis de jugo gástrico	25
3.4. Células AGS co-cultivadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i>	25
4. Ensayos <i>in vitro</i> en células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides	26
4.1. Generación de medio condicionado para el cultivo de organoides	26
4.1.1. Medio condicionado para el cultivo de organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de organoides	27
4.2. Donantes de biopsias gástricas de pacientes pediátricos.....	27
4.3. Generación de organoides gástricos a partir de biopsias gástricas de pacientes pediátricos.....	28
4.4. Obtención de un cultivo en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides.....	29
4.4.1. Determinación de confluencia de monocapa.....	30
4.5. Caracterización de la expresión génica en tejido, organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells organoides	30
4.6. Ensayo <i>in vitro</i> de monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides estimuladas con el jugo gástrico y jugo gástrico filtrado de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i>	30
4.7. Ensayo de infección primaria de <i>H. pylori</i> en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides.....	31
5. Técnicas de biología celular y molecular	32
5.1. Extracción de DNA genómico desde la muestra de jugo gástrico	32

5.1.2. Cuantificación bacteriana a través del gen <i>16S rDNA</i>	32
5.2. Viabilidad celular	33
5.2.1. Viabilidad celular en células AGS. Ensayo MTT.....	33
5.2.2. Viabilidad celular en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides. Ensayo de ATP	33
5.3. Expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata	34
5.3.1. Extracción de RNA	34
5.3.1.1. Extracción de RNA de células AGS	34
5.3.1.2. Extracción de RNA de biopsias gástricas, organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides	34
5.3.2. Síntesis de cDNA.....	35
5.3.3. Cuantificación por QPCR real time de la expresión génica	35
5.3.3.1. Cuantificación de la expresión de genes estructurales en tejido, organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells organoides	36
5.3.3.2. Cuantificación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata	37
5.4. Secreción de citoquinas pro-inflamatorias	39
5.5. Detección de las proteínas formadoras de uniones estrechas por inmunofluorescencia	40
5.5.1. Cuantificación de parámetros morfológicos de la expresión de ZO-1 en monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides..	41
6. Análisis estadístico.....	42
Resultados	43
I. Caracterización de los pacientes y las muestras de jugo gástrico	43
Composición de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i>	45
Remoción bacteriana del jugo gástrico	50
Curva tiempo de incubación y dosis de jugo gástrico.....	52

II. Descripción y caracterización del modelo de monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides gástricos.....	53
Curva de confluencia de las monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells organoides gástricos.....	53
Caracterización de genes estructurales en tejido, cultivo de organoides y monocapa de células epiteliales derivadas de organoides.....	55
Expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata en tejido, organoides y monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides	57
III. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i> sobre la viabilidad celular en los modelos <i>in vitro</i> de células epiteliales gástricas	59
Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad celular en la línea celular AGS.....	59
Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad celular en el cultivo primario de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides.....	60
IV. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i> sobre la integridad de la barrera y función de las células epiteliales gástricas	61
1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i> sobre la expresión de receptores de reconocimiento en un modelo <i>in vitro</i> de células epiteliales gástricas	62
1.1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los receptores TLRs en la línea celular AGS	62
1.2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los receptores TLRs en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides	63
2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i> sobre la expresión de los mediadores inflamatorios y moléculas efectoras en un modelo <i>in vitro</i> de células epiteliales gástricas.....	65

2.1 Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los mediadores inflamatorios en un modelo de línea celular AGS	65
2.2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los mediadores inflamatorios en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides	67
2.3. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de β -defensinas en un modelo de línea celular AGS.....	70
2.4. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de β -defensinas en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides	71
3. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i> sobre la expresión de las proteínas formadoras de uniones estrechas, en un modelo <i>in vitro</i> de células epiteliales gástricas.....	72
3.1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de ZO-1, Claudina-2 y Claudina-4, en un modelo de línea celular AGS.....	72
3.2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de ZO-1, Claudina-2 y Claudina-4, en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides	75
3.3. Distribución de ZO-1 en células epiteliales gástricas estimuladas con el jugo gástrico de niños infectados y no infectados con <i>H. pylori</i>	77
4. Efecto del desafío con <i>H. pylori</i> en la integridad de la barrera epitelial en células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides, pre-incubadas con la microbiota del jugo gástrico de niños no infectados con <i>H. pylori</i>	83
4.1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la distribución de ZO-1 durante el desafío con <i>H. pylori</i>	83
Discusión	85
Conclusión	99
Referencias	100
Anexo 1	117

Aprobación del Proyecto 14-165 y del Consentimiento Informado por el Comité Ético Científico Medicina UC.	117
Anexo 2	119
Aprobación del Proyecto de Tesis por el Comité Ético Científico Medicina UC ..	119

Índice de Tablas

Tabla 1. Reactivos	18
Tabla 2. Secuencia de partidores de amplificación del gen <i>16S rDNA</i>	32
Tabla 3. Programa de amplificación del gen <i>16S rDNA</i> por PCR real time	32
Tabla 4. Secuencia de partidores de genes estructurales.....	36
Tabla 5. Programas de PCR real time utilizados en la cuantificación de la expresión de genes estructurales	37
Tabla 6. Secuencia de partidores de genes involucrados en la respuesta inmune innata	37
Tabla 7. Programas de PCR real time utilizados en la cuantificación de genes involucrados en la respuesta inmune innata.....	39
Tabla 8. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia para la detección de las proteínas formadoras de uniones estrechas	41
Tabla 9. Características generales de los pacientes donantes de las muestras de jugo gástrico	44

Índice de Figuras

Figura 1: Enfermedades asociadas a la infección por <i>H. pylori</i>	2
Figura 2: Respuesta inmune innata inducida por la infección por <i>H. pylori</i> en las células epiteliales gástricas.....	3
Figura 3: <i>H. pylori</i> interactúa con los TLRs modulando la señalización de la respuesta inmune innata.	5
Figura 4: Organización de las proteínas que conforman las uniones estrechas en las células epiteliales gástricas.	11
Figura 5: Composición diferencial de la microbiota gástrica de acuerdo al estado de infección por <i>H. pylori</i>	13
Figura 6: Estructura de la microbiota del jugo gástrico de niños y adultos.....	15
Figura 7: Análisis de α -diversidad de las secuencias de las muestras de jugo gástrico..	45
Figura 8: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de phylum.	46
Figura 9: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de clase.....	47
Figura 10: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de orden.	48
Figura 11: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de familia.	49
Figura 12: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de género.	50
Figura 13: Efectividad de la remoción bacteriana desde las muestras de jugo gástrico.	51
Figura 14: Dosis y tiempo respuesta de las muestras de jugo gástrico en células AGS.	52
Figura 15: Curso temporal de la formación de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas desde stem cells de organoides.	54
Figura 16: Comparación de la expresión de genes estructurales en tejido, organoides y monocapa de células epiteliales diferenciadas de organoides gástrico.	56
Figura 17: Diferenciación de organoides a células epiteliales en el cultivo de monocapa.	57

Figura 18: Expresión de TLRs en tejido, cultivo de organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de organoides gástrico.	58
Figura 19: Expresión de β -defensinas en tejido, cultivo de organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de organoides gástrico.	59
Figura 20: Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad de células AGS.	60
Figura 21: Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad celular en el cultivo primario de células epiteliales diferenciadas de organoides.	60
Figura 22: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de los receptores TLRs en células AGS.	63
Figura 23: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de los receptores TLRs en el cultivo en monocapa de células epiteliales derivadas de organoides.	64
Figura 24: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en células AGS.	66
Figura 25: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en cultivo en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides.	69
Figura 26: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las β -defensinas en células AGS.	70
Figura 27: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las β -defensinas en el cultivo en monocapa de células epiteliales diferenciadas de organoides.	71
Figura 28: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las proteínas formadoras de uniones estrechas en células AGS.	73
Figura 29: Distribución de las proteínas formadoras de uniones estrechas en células AGS.	74

Figura 30: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las proteínas formadoras de uniones estrechas en un cultivo de monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides.....	76
Figura 31: Distribución de las proteínas formadoras de uniones estrechas en cultivo de monocapa de células epiteliales gástricas derivadas de organoides.....	77
Figura 32: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre la distribución de ZO-1.....	78
Figura 33: Parámetros morfológicos de clasificación de distribución de ZO-1 en cultivo de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides.....	79
Figura 34: Cuantificación de los parámetros morfológicos de distribución de ZO-1 en cultivo de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides.....	81
Figura 35: Microscopía Confocal de monocapa de células epiteliales que presenta estructura de ZO-1 en forma de anillo.	82
Figura 36: Efecto del jugo gástrico en la infección primaria por <i>H. pylori</i> sobre la distribución de ZO-1 en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides.	84
Figura 37: Diagrama de la distribución de ZO-1 en la barrera de células epiteliales.....	94
Figura 38: Modelo de infección de <i>H. pylori</i> y su interacción con la microbiota gástrica.	97

Resumen

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es una bacteria colonizadora del estómago humano, cuya adquisición temprana en la niñez, está asociada con una modificación en la composición de la microbiota del estómago. Esta tesis estudió el rol de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la estructura y función inmune innata que ocurre a nivel de la barrera de células epiteliales gástricas, planteando como hipótesis que la microbiota del jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*, altera la integridad de la barrera y la respuesta inmune de las células epiteliales gástricas.

Se utilizaron cultivos *in vitro* de la línea celular gástrica AGS y un cultivo primario de monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides gástricos pediátricos, los cuales fueron estimulados con el jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori*. En estos dos modelos se evaluó los posibles sitios de acción de la microbiota, como los receptores tipo TLRs, proteínas formadoras de uniones estrechas y el efecto sobre factores inmunes como citoquinas y β -defensinas. Adicionalmente, en el cultivo de monocapa de células epiteliales diferenciadas de organoides, se evaluó distintos patrones de distribución de la proteína formadora de unión estrecha zónula ocludens 1 (ZO-1), que incluyeron quiebres en la estructura de la barrera de células epiteliales, inmuno-tinción de ZO-1 difusa, débil, puntiforme y formación de estructuras en forma de anillos. También, en este modelo se estudió la primo infección por *H. pylori* por medio de un ensayo de desafío con la bacteria en células pre-incubadas con la microbiota del jugo gástrico de niños no infectados, evaluando el efecto sobre los patrones de distribución de ZO-1.

En el modelo de células AGS, se encontró que el jugo gástrico de niños no infectados indujo una disminución de la expresión de mRNA de claudina-2 (Cldn-2) y de la β -defensina-1 (hBD-1) en comparación a las células sin tratar. Por otro lado, el jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* produjo un aumento de la expresión de mRNA del receptor TLR-2. Tanto en células AGS como en monocapa de células epiteliales el jugo gástrico ejerció un aumento en la secreción de IL-8 y TNF- α de manera

dependiente de la presencia del componente bacteriano e independiente del estatus de infección por *H. pylori*. En las monocapas de células epiteliales, la microbiota del jugo gástrico de ambos grupos, indujo la expresión de la β -defensina-2 (hBD-2), mientras que el jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* indujo la expresión de IL-8 y TNF- α y un aumento en el porcentaje de células que presentan estructuras en forma de anillo de ZO-1, lo cual es dependiente de la presencia del componente bacteriano. El análisis de las estructuras en forma de anillo de ZO-1, sugirió la formación de un poro entre la unión célula-célula, lo cual podría modificar la función de la barrera de células epiteliales.

Finalmente, el ensayo de primo-infección por *H. pylori* mostró que el jugo gástrico de niños no infectados disminuye la alteración estructural de la barrera de célula epiteliales producida por infección temprana de *H. pylori*.

En conclusión, la microbiota del jugo gástrico de niños sanos previene el efecto inducido por la infección temprana por *H. pylori*, estimulando la respuesta inmune innata y disminuyendo la alteración estructural de la barrera de célula epiteliales. Sin embargo, si los mecanismos de defensa son sobrepasados y se establece la infección por *H. pylori*, la microbiota del jugo gástrico asociada a la infección estimula la respuesta inmune innata para hacerla más efectiva, pero altera la integridad de la barrera de las células epiteliales gástricas, lo que podría tener un rol en el daño asociado a la infección. De este modo, el jugo gástrico de niños no infectados por *H. pylori*, podría ser un posible blanco terapéutico para modular la respuesta inmune y disminuir alteraciones en la estructura de la barrera en las células epiteliales gástricas en presencia de *H. pylori*, sin la necesidad de erradicar la bacteria de su nicho.

Introducción

1. Historia natural de la infección por *H. pylori*

H. pylori es una bacteria microaerofílica, del tipo Gram negativo, tiene forma de bacilo espiralado y posee 4 a 7 flagelos polares (1). Esta bacteria coloniza el estómago de aproximadamente el 50% de la población mundial (2). En Chile, la prevalencia de infección es del 73% en adultos (3) y un 56% en niños de nivel socioeconómico bajo (4). La adquisición de *H. pylori* ocurre en la infancia y se ha demostrado que en niños infectados por la bacteria las cepas de *H. pylori* tienen un origen intrafamiliar (5). Entre los factores que propician la infección, se encuentran el hacinamiento, la calidad del agua para el consumo doméstico, la falta de servicios higiénicos, pertenecer a regiones con mayores niveles de ruralidad, bajo ingreso familiar y bajo nivel educacional (6).

El daño asociado a la infección por *H. pylori* depende de la presencia de factores de virulencia propios de la bacteria y de mecanismos inmunes que buscan la erradicación bacteriana. En general, la población infectada con esta bacteria presenta gastritis crónica leve asintomática. Sin embargo, el 10-15% de los infectados desarrolla úlceras gastroduodenales, 0,1% desarrolla adenocarcinoma gástrico y < 0,01% del total de los infectados llega a tener linfoma de tipo MALT (**Figura 1**) (7,8). Es por esto último, que *H. pylori* es clasificada como un carcinógeno clase 1 por la International Agency for Research on Cancer (IARC) (9).

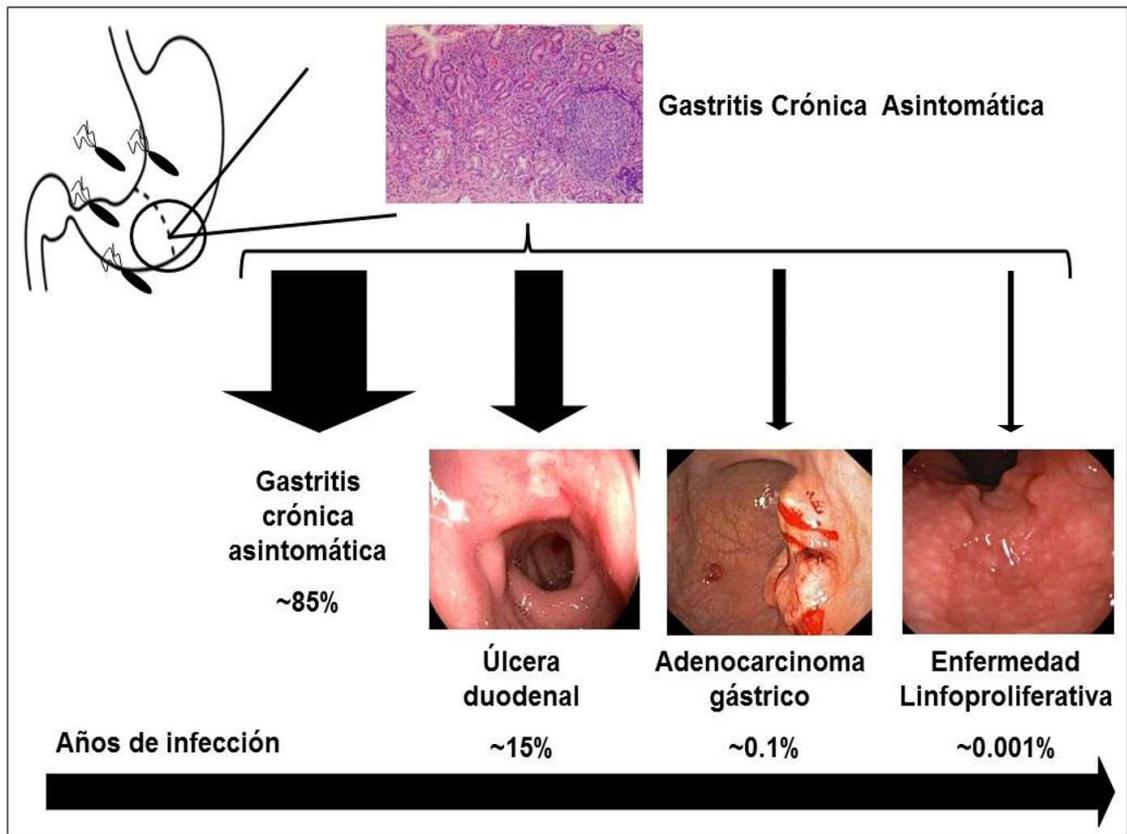


Figura 1: Enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori*.

La histopatología de pacientes infectados pone en evidencia el reconocimiento inmune en la mucosa gástrica, representada por la infiltración de células mono y polimorfonucleares (7). Además, se produce un incremento de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IL-6 (10,11). A su vez, el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa está asociada con una respuesta efectora de células tipo Th1 y células del tipo Th17, caracterizadas por la secreción de las citoquinas INF- γ e IL-17, respectivamente (11,12). Por otro lado, *H. pylori* es capaz de inducir una respuesta del tipo regulatoria (Treg), la cual se caracteriza por la secreción de citoquinas TGF- β e IL-10 (13,14). Esta respuesta se expresa de manera diferencial entre adultos y niños, dado que, los niños infectados con *H. pylori* poseen una menor infiltración de células mono y

polimorfonucleares, un menor número de folículos linfoides y ulceración en comparación a los adultos infectados con *H. pylori* (15,16), presentando de éste modo un menor daño en la mucosa gástrica comparado con adultos infectados.

2. Respuesta inmune innata mucosal y su inducción por la infección con *H. pylori*

Una vez que *H. pylori* llega al estómago, debe enfrentarse ante la primera línea de defensa formada por la barrera de células epiteliales, las cuales participan de manera activa en la respuesta inmune innata desempeñando diferentes funciones. Entre las funciones de las células epiteliales, se encuentra el **reconocimiento** de diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los receptores tipo Toll (TLR), los cuales se encuentran en la superficie de las células epiteliales y en el citoplasma asociados a endosomas. Una vez activados estos receptores, se generará una cascada de señalización que desemboca en la secreción de **mediadores inmunes** y **moléculas efectoras**. Además, la estrecha interacción entre las células epiteliales adyacentes les permite actuar como **barrera** epitelial, impidiendo el paso de bacterias y moléculas desde el lumen hacia la lámina propia (**Figura 2**).

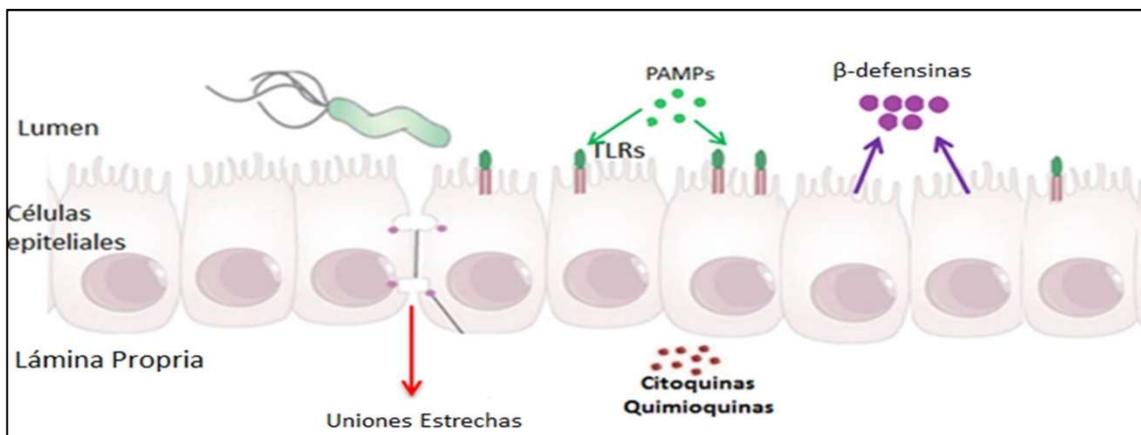


Figura 2: Respuesta inmune innata inducida por la infección por *H. pylori* en las células epiteliales gástricas.

2.1. Reconocimiento mediante receptores TLRs

Los TLRs son glicoproteínas de transmembrana, expresadas en la superficie de macrófagos, células dendríticas y células epiteliales (17). La interacción entre los TLRs y los PAMPs desencadena una cascada de señales intracelulares, que producen una expresión coordinada de genes involucrados en la respuesta innata. Esta expresión coordinada conduce a la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias, moléculas antimicrobianas, moléculas involucradas en el reclutamiento de células presentadoras de antígenos y moléculas co-estimuladoras que iniciarán la activación de la respuesta inmune adaptativa (18,19).

Las células epiteliales gástricas expresan los TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9, los cuales interactúan con lipoproteínas, lipopolisacáridos, flagelina y motivos CpG no metilados en el DNA, respectivamente (18). Estos receptores han sido involucrados en la expresión de genes pro-inflamatorios inducidos por la infección de *H. pylori* en líneas celulares epiteliales (**Figura 3**). Los TLR2, TLR4 y TLR5 se encuentran además expresados en las biopsias gástricas de pacientes infectados con *H. pylori* (20–23).

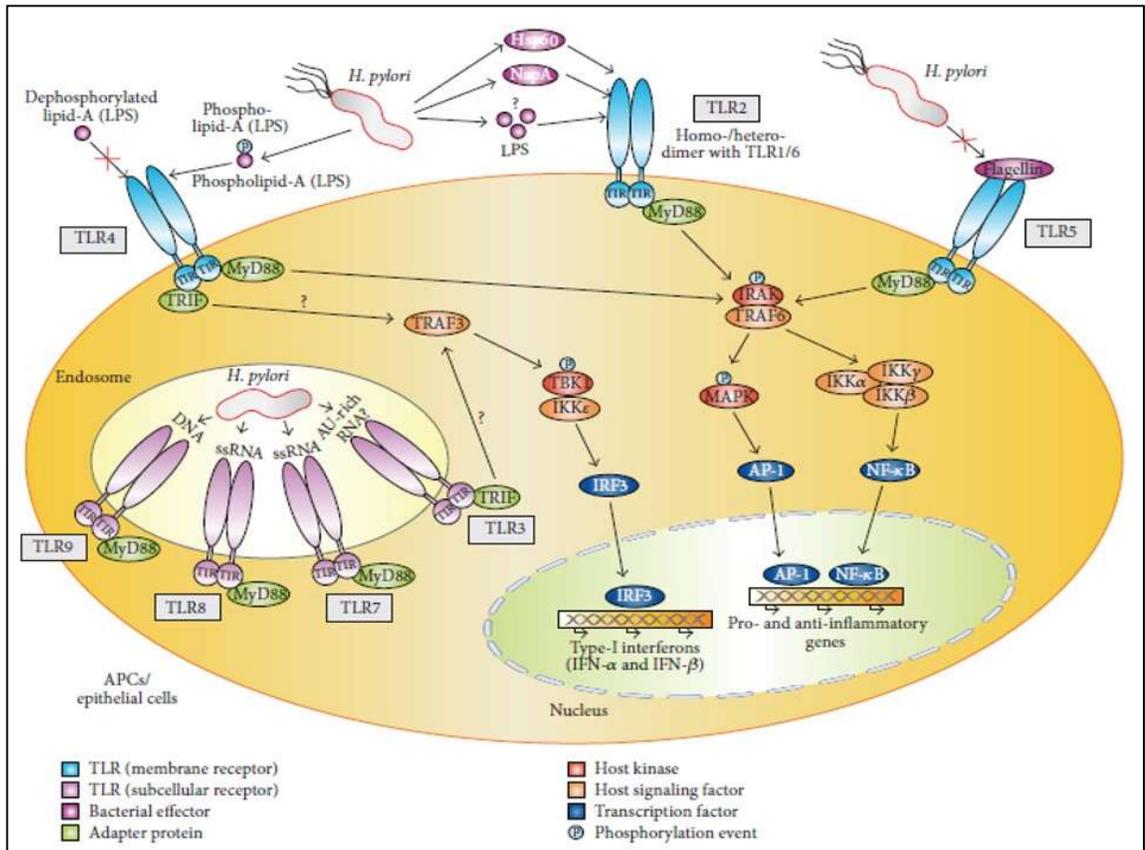


Figura 3: *H. pylori* interactúa con los TLRs modulando la señalización de la respuesta inmune innata (Pachathundikandi et al., *BioMed Research International*, 2015).

Para dilucidar la función de los TLRs asociada a la infección con *H. pylori* se han realizado diversos estudios *in vitro*, principalmente utilizando la línea de epitelio gástrico MKN45 y transfectando de manera estable estos receptores en células HEK293. En estos, se ha demostrado que el reconocimiento de *H. pylori* por los TLRs activa NF-κB e induce la expresión de las quimioquinas IL-8, MIP3α y GROα (24).

Sin embargo, resulta bastante controversial identificar de manera exacta el PAMP de *H. pylori* que actúa como ligando del receptor TLR2. Smith y cols., utilizando líneas estables de células HEK293/TLR2 observaron que el LPS de *H. pylori* es un ligando de TLR2 (24), mientras que el grupo de Mandell, utilizando el mismo modelo de estudio, encontraron que la bacteria completa es capaz de activar el receptor TLR2, mientras que

el reconocimiento del LPS de *H. pylori* sería mediado por TLR4 (25). Por otro lado, las cepas de *H. pylori* que poseen el factor de virulencia *cagA* (antígeno A asociado a la citotoxina de *H. pylori*) generan una potente activación del receptor TLR2, produciendo una mayor secreción de IL-8 y TNF- α en comparación a las cepas con la mutante isogénica *cagA* (26). También se ha demostrado que la proteína de shock térmico de *H. pylori* Hsp60, es un fuerte activador de TLR2 (27).

Estudios realizados en células AGS y MKN45, muestran que la infección con *H. pylori* aumenta la expresión de TLR4 y secreción de IL-8. Sin embargo, TLR4 requiere de la proteína MD2 para mediar el reconocimiento del LPS de *H. pylori* sobre la superficie celular (28–30).

La infección por *H. pylori* en líneas de células epiteliales también activa NF- κ B a través de TLR5 produciendo la expresión de quimioquinas (24). Esta respuesta ocurre a través de un incremento de la actividad de p38 y las quinasas ERK y MAPK, además de la fosforilación del factor ATF2 (31). A pesar de que esta respuesta pro-inflamatoria es mediada por TLR5, la flagelina de *H. pylori* no juega un rol determinante, pues la infección de células AGS con la mutante *flaA* no reduce de manera significativa la secreción de IL-8 e incluso la proteína recombinante purificada FlaA induce débilmente la activación de p38 y la secreción de IL-8, demostrando de éste modo que, el débil reconocimiento de la flagelina de *H. pylori* a través de TLR5, es un importante proceso de evasión inmune por parte de la bacteria (32).

El receptor TLR9 es intracelular y reconoce motivos específicos CpG no-metilados de bacterias (33). El mecanismo por el cual *H. pylori* activa el receptor TLR9 es mediante la introducción de su DNA utilizando el sistema de secreción tipo IV (SST4) (34). Este receptor al ser activado, desencadena una cascada de señalizaciones que incluye las vías de NF- κ B y MAPK (33,35). En el contexto de infección por *H. pylori*, se ha demostrado en neutrófilos, que tanto la bacteria como el DNA de *H. pylori* induce la expresión del mRNA de IL-8 mediante la activación de TLR9, sin embargo el DNA bacteriano no es suficiente para inducir la secreción de la citoquina (36). Por otro lado, en células AGS infectadas con *H. pylori*, la activación de TLR9 produciría un aumento de la expresión

de COX-2 de manera dependiente de NF- κ B, lo cual estaría relacionado a un aumento en los procesos de invasión y angiogénesis (37).

2.2. Mediadores inmunes

Los mediadores involucrados en la respuesta inmune innata, son principalmente las citoquinas y quimioquinas, las cuales son proteínas reguladoras liberadas por células del sistema inmune y funcionan como mediadores intercelulares para iniciar y coordinar las respuestas inmunes (38).

En el modelo de infección por *H. pylori*, IL-8 es la citoquina canónica de estudio para evaluar la respuesta ante la bacteria y sus PAMPs (39). En cultivos *in vitro* de células epiteliales gástricas, *H. pylori* induce la expresión y secreción de IL-8 mediado por el reconocimiento de la bacteria por los TLRs (26), por adhesión de *H. pylori* a las células (40), así como también por la traslocación del factor de virulencia CagA y de peptidoglicano a través del sistema de secreción tipo IV (41).

En biopsias de pacientes infectados con *H. pylori*, se han encontrado altos niveles de IL-8, así como también de IL-6 y TNF- α , las cuales están asociadas a la gastritis inducida por la infección con la bacteria. La citoquina TNF- α se encuentra en altas concentraciones en pacientes que presentan gastritis activa e infiltración de neutrófilos, mientras que la citoquina IL-6 se encuentra en altas concentraciones tanto en pacientes con gastritis activa e inactiva (42). TNF- α además está involucrada en la activación del proceso apoptótico mediado por la bacteria (43).

Por su parte, IL-6 es una citoquina producida por células tipo linfoides y no linfoides incluyendo macrófagos activados, fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales (44). Ensayos *in vitro* realizados en esplenocitos, neutrófilos, monocitos y mastocitos, han demostrado que la proteína activadora de neutrófilos (HP-NAP) de *H. pylori* induce la expresión y secreción de IL-6 mediante la activación del TLR2 (45–47), mientras que el DNA de la bacteria induce la secreción de la citoquina mediada por el reconocimiento vía TLR9 (48).

En conjunto, el resultado de la secreción de estas citoquinas inducidas por la infección por *H. pylori*, activará el reclutamiento de neutrófilos, eosinófilos, monocitos, células dendríticas y macrófagos (49,50) las cuales estarán involucradas en la activación de células efectoras, las cuales mediarán el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa.

2.3. Moléculas efectoras

Otra de las moléculas secretadas por activación de la respuesta inmune innata, son las defensinas. Estas moléculas son pequeños péptidos catiónicos producidas por neutrófilos y células epiteliales, que forman un poro en la membrana bacteriana, llevándola a su destrucción (51). Se consideran una barrera importante en las superficies de mucosas por su actividad microbicida y citotóxica contra bacterias (52), hongos (53) y virus (54).

En el estómago y en el colon, las β -defensinas (hBD) se encuentran mayormente representadas. Estos péptidos además presentan actividad quimiotáctica para células dendríticas inmaduras y células T de memoria a través del receptor de quimioquina CCR6, promoviendo así la respuesta inmune adaptativa mediante el reclutamiento de estas células en el sitio de la invasión microbiana (55).

Estudios *in vitro* han demostrado que β -defensina 1 (hBD1) se expresa de manera constitutiva en las líneas celulares AGS y MKN7 y aumenta ante la infección por *H. pylori* (56) vía NF- κ B de manera dependiente de la islole de patogenicidad *cagA-PAI* (57). En biopsias gástricas, hBD1 se expresa de manera constitutiva en la mucosa gástrica normal (56), mientras que en los pacientes infectados con *H. pylori*, los resultados obtenidos resultan ser controversiales. El grupo de Bajaj-Elliott y cols., indican que los pacientes infectados con la bacteria expresan mayores niveles de hBD1 que los individuos no infectados, mientras que Patel y cols., reportaron que los pacientes infectados con *H. pylori* presentaron menores niveles de expresión que su contraparte (57), indicando además, que estos bajos niveles de hBD1 se encontrarían asociados a altos niveles de colonización bacteriana e inflamación (57), sugiriendo que ésta vía podría promover la sobrevivencia y persistencia bacteriana en el nicho gástrico.

En cuanto a hBD2, estudios en las líneas celulares AGS y MKN7 revelan que la infección con *H. pylori* produce un incremento en su expresión de manera dosis dependiente (58–60). Del mismo modo, en biopsias gástricas tanto de adultos como de niños infectados con gastritis generada por *H. pylori*, se observa un aumento en la expresión de hBD2 (58,61).

Al igual que hBD2, la β -defensina hBD3, no se expresa de manera constitutiva en las células epiteliales gástricas. Sin embargo, la infección con *H. pylori* induce su expresión mediante el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR en etapas tempranas de la infección, de manera dependiente del sistema de secreción tipo IV de *H. pylori* y de manera independiente de CagA o peptidoglican proveniente de *H. pylori* (62). De este modo, tanto la hBD2 como hBD3 poseen un efecto anti proliferativo sobre *H. pylori* en ensayos *in vitro*, mientras que hBD1 resultó ser menos activa (59).

Interesantemente, la β -defensina hBD4 tiene una actividad antimicrobiana en contra de bacterias del tipo Gram-negativo como Gram-positivo (63). En biopsias gástricas de individuos sanos, se observó que hBD4 se expresa en bajos niveles, mientras que biopsias provenientes de pacientes con gastritis infecciosa y gastritis no inducida por la infección con *H. pylori*, los niveles de expresión de hBD4 se encontraban significativamente aumentados. Tanto en biopsias de pacientes infectados, como en líneas celulares epiteliales infectadas con *H. pylori cagA(+)*, se observaron mayores niveles de expresión de hBD4 en comparación a la infección con cepas *cagA(-)*, bacterias no viables o con medio condicionado (64).

2.4. Proteínas formadoras de uniones estrechas en la barrera de células epiteliales

Las células epiteliales gástricas se agrupan de manera continua y estrecha formando una barrera de células, la cual es fundamental en la defensa del hospedero ante la invasión de agentes patogénicos. Entre las funciones de la barrera epitelial se encuentran impedir el paso de toxinas, sustancias alimenticias y microbiota, desde el lumen gástrico hacia la cara basolateral y circulación sistémica. En la barrera epitelial se pueden encontrar

uniones celulares que participan en la adhesión y comunicación célula a célula, entre ellas las uniones estrechas, adherentes, de comunicación y desmosomas (65).

Las uniones estrechas son un complejo multiproteico compuesto por proteínas de transmembrana y citoplasmáticas que forman una estructura continua alrededor de la porción lateral de las células epiteliales cercanas a la superficie luminal (66). Son consideradas de las uniones celulares más importantes ya que juegan un rol fundamental en la función de barrera, polaridad celular y vías de señalización celular (65).

Las proteínas formadoras de las uniones estrechas además tienen como función la regulación de la permeabilidad paracelular, efectuada a través de dos vías, conocidas como la vía del “poro” y de la “fuga”. Por un lado, la vía del “poro”, principalmente regulada por proteínas claudinas, permite el movimiento de pequeñas moléculas ($< 4 \text{ \AA}$) con discriminación de carga a través de las uniones estrechas junto con el agua. Por medio de esta vía pasa la mayor parte de la corriente eléctrica por el epitelio, lo cual se mide a través de la resistencia transepitelial (TER) y regula la magnitud de la permeabilidad (67). Por otra parte, la vía de la “fuga” permite el flujo de moléculas de mayor tamaño ($> 4 \text{ \AA}$) a través de las uniones estrechas sin carga selectiva (67).

En las células epiteliales gástricas, las proteínas formadoras de uniones estrechas son las proteínas de transmembrana ocludina, molécula adhesiva de la unión A (JAM-A) y claudinas (68–70), así como también las proteínas periféricas de andamiaje Zonula-occludens (ZO) 1, 2 y 3 (69) (**Figura 4**).

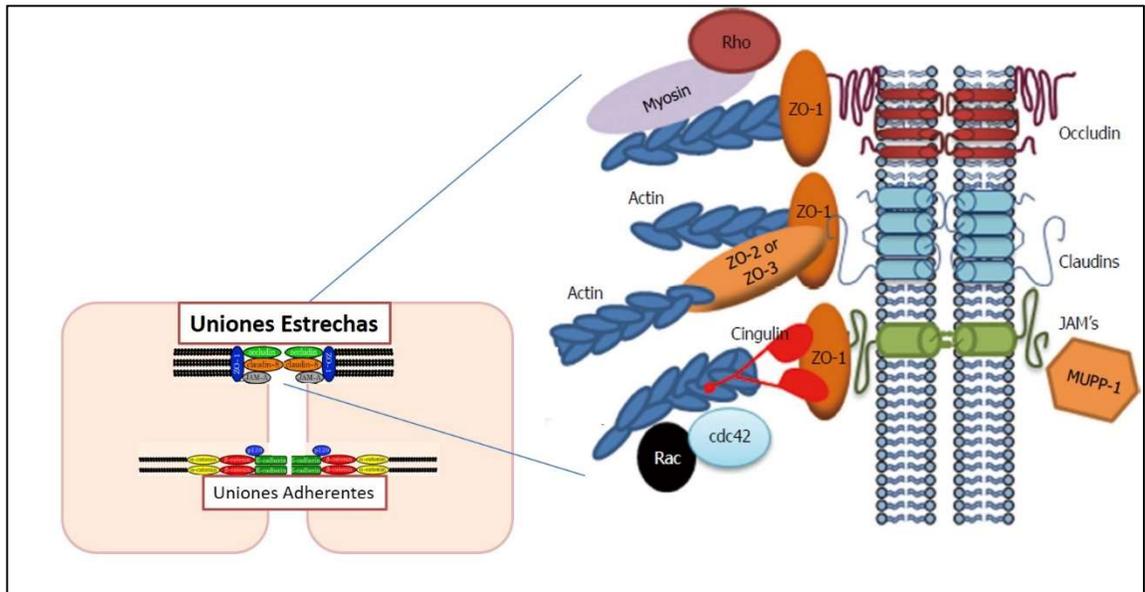


Figura 4: Organización de las proteínas que conforman las uniones estrechas en las células epiteliales gástricas (Adaptación de Caron et al., WJG, 2015).

Las claudinas son el mayor constituyente de las uniones estrechas, están formadas por cuatro dominios transmembranas y existen 24 miembros de la familia de las claudinas que se expresan en un patrón tejido-específico (65). Las ocludinas también están formadas por cuatro dominios transmembrana (65). Estudios realizados en células epiteliales carentes de ocludinas, demostraron desarrollar una robusta y eficiente unión estrecha, por lo que ocludina jugaría el rol de proteína accesoria en la formación de las uniones estrechas (71). Finalmente, la Zonula-occludens 1, 2 y 3, son proteínas asociadas a la membrana que conectan las uniones estrechas al citoesqueleto (72). Por su parte ZO-1, conecta la ocludina de la unión estrecha con el citoesqueleto de actina (71).

Utilizando biopsias gástricas de pacientes infectados y no infectados con *H. pylori*, montadas en una cámara que mide permeabilidad, se demostró que la infección con *H. pylori* produce una disminución de la resistencia transepitelial y un incremento de la permeabilidad, reflejado en el incremento en el flujo de sucrosa (73,74).

Estudios *in vitro* en la línea celular epitelial gástrica NCI-N87, indican que la exposición a *H. pylori* produce una reducción de la resistencia transepitelial y un incremento de la permeabilidad paracelular en el tiempo, sin una reducción en la viabilidad celular pero con un incremento asociado en la secreción de las citoquinas IL-8, IL-6, INF- γ , IL-1 β , TNF- α e IL-10 y la reorganización de las proteínas ZO-1 y claudina-1 (75). Las células AGS forman una monocapa confluyente que expresa ZO-1 y las claudinas-2, -4, -6, -7 y -9, pero pierden la habilidad de formar uniones estrechas funcionales cuando crecen en monocapas (76,77). La infección con *H. pylori* cepas *cagA*(+) lleva a un severo daño de las uniones estrechas, dispersión celular y fenotipo migratorio (78), además de aumentar la expresión de claudina-2 (76). Uno de los mecanismos propuestos que propicia la disrupción de las uniones estrechas y el quiebre de la barrera epitelial, es la asociación de la proteína CagA no fosforilada al sitio de unión entre ZO-1 y JAMA, causando así un incompleto ensamblaje de la unión estrecha (79). Tanto en estudios realizados *ex vivo*, en biopsias gástricas de pacientes infectados con la bacteria, como en estudios *in vitro*, utilizando distintas líneas celulares epiteliales polarizadas en co-cultivo por alrededor de 24 horas con la bacteria, se demostró que la serino- proteasa de *H. pylori*, HtrA, promovería el clivaje de las proteínas formadoras de uniones estrechas ocludina y claudina-8, así como también de la proteína de las uniones adherentes E-cadherina, disrumpiendo así la estabilidad de la barrera epitelial, incrementado la permeabilidad paracelular, lo que permitiría la transmigración de *H. pylori* desde la superficie apical a la membrana basolateral (80).

En biopsias gástricas de niños infectados con *H. pylori*, se encontraron bajos niveles de expresión de ZO-1, mientras que los niveles de expresión de claudina-4 se encontraban aumentados en comparación a los individuos no infectados con la bacteria (81). Los niveles de expresión de claudina-4 se han visto aumentados en pacientes con cáncer gástrico (82,83), por lo que se considera que juega un rol importante en la carcinogénesis gástrica.

3. Microbiota gástrica y *H. pylori*

Hasta el descubrimiento de *H. pylori* por Warren y Marshall (84), el estómago era considerado un sitio estéril por poseer un ambiente ácido e inhóspito para la colonización bacteriana. Posteriormente, utilizando técnicas de microbiología clásica, fue posible cultivar bacterias pertenecientes al phylum Firmicutes, Proteobacterias y Bacteroides desde el jugo gástrico (85). Actualmente, las investigaciones de la microbiota son independientes de cultivo, a través del uso de las distintas plataformas de secuenciación masiva, como metagenómica y la secuenciación de las regiones hipervariables del gen *16S rRNA*. Es así, como se ha determinado que la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica, se relaciona con una composición diferencial de la microbiota gástrica, siendo asociada con un incremento relativo de la abundancia de bacterias pertenecientes al phylum Proteobacteria, Spirochetes y Acidobacteria, y con una disminución en la abundancia de Actinobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes (86) (Figura 5).

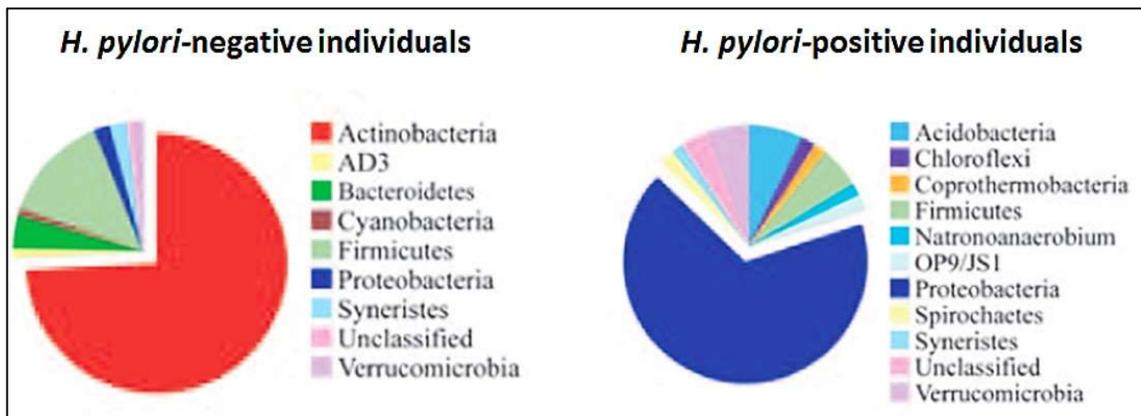


Figura 5: Composición diferencial de la microbiota gástrica de acuerdo al estado de infección por *H. pylori* (Adaptado de Maldonado-Contreras et al., *The ISME Journal*. 2011).

Esta alteración en la composición y diversidad de la microbiota no solo ha sido observada a nivel de estómago, sino que además la presencia de la bacteria es capaz de modificar la carga microbiana en el tracto gastrointestinal a nivel distal. Un estudio realizado en jerbos mongolianos demostró diferencias en la abundancia relativa bacteriana a lo largo del tracto gastrointestinal después de ser inoculados con *H. pylori*, lo cual sugiere que la presencia de *H. pylori* altera la composición de la microbiota indígena en el intestino (87). Así mismo, ensayos en modelos murinos, demostraron que luego de la infección de *H. pylori*, las especies bacterianas normalmente restringidas al tracto intestinal inferior, como *Bacteroides*, *Prevotella spp.*, *Clostridium*, *Eubacterium spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Streptococci spp.* y *Escherichia coli*, estaban presentes en las muestras de estómago, mientras que en los ratones sin infectar *Lactobacillus spp.* fue la especie predominante en las muestras de estómago (88). El mecanismo por el cual *H. pylori* modifica la microbiota no es claro, sin embargo, una de las teorías es que elimina a las bacterias por inducción de péptidos antimicrobianos como hBD2 (89).

En niños, la comunidad de bacterias comensales es alterada durante la infección de *H. pylori* (90), pues los niños infectados presentan menores abundancias en especies del phylum de Actinobacterias y especies de los géneros *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Neisseriaceae*, *Granulicatella* y *Rothia* en comparación a los niños no infectados (90).

En comparación con los adultos infectados por *H. pylori*, los niños infectados presentan una mayor diversidad microbiana, con una baja abundancia de Firmicutes y gran abundancia de Proteobacterias del tipo no-Helicobacter (**Figura 6**). Además, la mucosa gástrica de los niños infectados por *H. pylori* resulta ser más tolerogénica, lo cual contribuye a reducir el daño característico producido por la infección por *H. pylori* en adultos, razón por la cual resulta interesante estudiar la microbiota de los pacientes pediátricos (90).

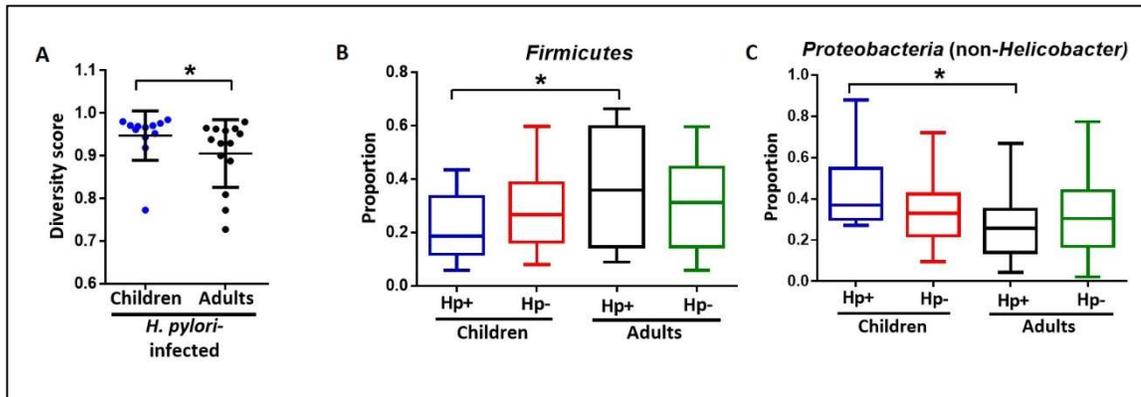


Figura 6: Estructura de la microbiota del jugo gástrico de niños y adultos. A) Diversidad microbiana presente en el jugo gástrico de niños y adultos infectados por *H. pylori*. Abundancia relativa de bacterias del phylum B) Firmicutes y C) Proteobacterias en el jugo gástrico de niños y adultos. (Adaptado de Brawner *et al.*, *Mucosal Immunology*. 2017).

Múltiples trabajos han estudiado la interacción de la microbiota intestinal con las células epiteliales del intestino (91,92), demostrando el rol fundamental que la microbiota ejerce tanto en la estructura como en la función inmune de las células epiteliales del intestino. Sin embargo, a nivel de estómago, el rol de la microbiota en el cross-talk existente con las células epiteliales gástricas ha sido menos estudiado, particularmente en el contexto de coinfecciones crónicas como *H. pylori*. Por lo cual es necesario determinar de qué manera la microbiota presente en el estómago contribuye a la respuesta inmune innata generada ante la infección con *H. pylori*.

Hipótesis

La microbiota del jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*, altera la integridad de la barrera y la respuesta inmune de las células epiteliales gástricas.

Objetivo General

Determinar si la microbiota del jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*, pero no de los no infectados, altera la integridad de la barrera y función de las células epiteliales gástricas.

Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la expresión de receptores de reconocimiento en un modelo *in vitro* de células epiteliales gástricas.

1.1. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los receptores TLRs en un modelo de línea celular AGS.

1.2. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los receptores TLRs en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides.

2. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la expresión de mediadores inflamatorios y moléculas efectoras en un modelo *in vitro* de células epiteliales gástricas.

2.1. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de IL-6, IL-8, TNF- α y β -defensinas en un modelo de línea celular AGS.

2.2. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de IL-6, IL-8, TNF- α y β -defensinas en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides.

3. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la expresión de proteínas formadoras de uniones estrechas, en un modelo *in vitro* de células epiteliales gástricas.

3.1. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de ZO-1, Claudina-2 y Claudina-4, en un modelo de línea celular AGS.

3.2. Determinar el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de ZO-1, Claudina-2 y Claudina-4, en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides.

3.3. Evaluar la distribución de ZO-1 en células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides, estimuladas con el jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori*.

4. Evaluar el efecto del desafío con *H. pylori* en la integridad de la barrera epitelial en células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides, pre-incubadas con la microbiota del jugo gástrico de niños no infectados con *H. pylori*.

4.1. Evaluar si el desafío con *H. pylori*, altera la distribución de ZO-1 en presencia de la microbiota de niños no infectados con *H. pylori*.

Materiales y Métodos

I. Materiales

1. Reactivos

Los reactivos que fueron utilizados en el desarrollo de esta tesis se describen en la **Tabla 1**

Tabla 1. Reactivos

Reactivo	Fabricante
Ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA)	USBiological
Advanced DMEM/F12, medio de cultivo	Invitrogen
AffinityScript QPCR cDNA synthesis kit	Agilent Technologies
Anti-h/mE-cadherine affinity purified goat IgG	R&D Systems
Bacto [®] Agar	BD Bioscience
Brilliant II SYBRGreen QPCR Master mix	Agilent Technologies
Brucella, medio de cultivo	BD Bioscience
BSA 1mg/ml	New England BioLabs
CampyGen 2.5L	Thermo Scientific
CellTiter-Glo Luminescent kit, ensayo ATP	Promega
Cloroformo	Merck
Colagenasa tipo I	Invitrogen
DAPI	ThermoFisher Scientific
DENT	Oxoid
DMEM, medio de cultivo	Corning
DMEM/F12 con HEPES, medio de cultivo	Sigma
DMEM High glucosa, medio de cultivo	Sigma
Dodecilsulfato sódico (SDS)	USBiological

Donkey anti-goat 488, anticuerpo secundario	Invitrogen
Donkey anti-rabbit Cy3, anticuerpo secundario	BioLegend
DPBS	Corning
EDTA	Invitrogen
Etanol	Merck
Extracto de Levadura	BD Bioscience
Factor Y-27632, inhibidor ROCK	Tocris
Factor SB-431542, inhibidor TGFBR1	Tocris
Fungizona	Corning
G418	Sigma
Gentamicina	Gibco
Glicerol	Winkler
Goat anti-mouse 594 IgG1, anticuerpo secundario	Invitrogen
Goat anti-mouse IgG1 488, anticuerpo secundario	Invitrogen
Goat IgG anti-human ST6Gal-1	R&D Systems
HCL	Merck
Higromicina	InvivoGen
Human IL-6 ELISA Ready Set-Go	ThermoFisher Scientific
Human IL-8 ELISA Kit II	BD Biosciences
Human TNF ELISA Kit II	BD Biosciences
Isopropanol	Merck
Kit, RNA Easy mini kit	QIAGEN
L-glutamina 2mM	Sigma
Matrigel	BD Biosciencias
Metanol	Merck
Mouse anti-Claudin-4	Invitrogen
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)	Tocris
Paraformadehído	Merck

Penicilina/Estreptomicina	Sigma
Piruvato de sodio	Hiclone
Purified mouse anti-human ZO-1	BD Biosciencias
QIAamp DNA mini kit (50)	QIAGEN
Rabbit anti- Claudin-2	Invitrogen
Ribonucleasa A (RNAsa A)	USBiological
RNAlater	Invitrogen
RNeasy Mini Kit	QIAGEN
RPMI-1640, Medio de cultivo celular	Corning
Suero de Caballo	Corning
Suero Fetal Bovino	Biological Industries
Suero Fetal Bovino	Sigma
Test rápido de ureasa	Ecifarma
Tripsina 2.5%	Invitrogen
Trizol	Invitrogen
Tween-20	Sigma
ZR Fecal DNA Miniprep	ZIMO Research

II. Metodología

1. Diseño experimental

El objetivo de esta tesis es evaluar el efecto de la microbiota gástrica del jugo gástrico proveniente de pacientes pediátricos infectados y no infectados con *H. pylori*. Para ello, usando un modelo de línea celular epitelial y en un cultivo primario de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides, se evaluó la expresión de diferentes genes involucrados en la respuesta inmune innata, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la distribución de proteínas que están directamente relacionadas con la estabilidad de la barrera epitelial.

2. Donantes de jugo gástrico y muestras de jugo gástrico

Participaron en este estudio 8 pacientes pediátricos derivados a endoscopia digestiva alta por su médico tratante. Como criterio de inclusión se consideraron pacientes pediátricos <17 años. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaban alguna enfermedad inmuno mediada previamente diagnosticada, el uso de antibióticos, inhibidores de la bomba de protones y tratamiento con productos probióticos, durante el mes previo a la endoscopia. El procedimiento endoscópico se llevó a cabo en la Unidad de Endoscopia ubicada en el Centro de Especialidades Médicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Previo al procedimiento, los padres de los participantes y los niños mayores de 7 años firmaron el correspondiente consentimiento y asentimiento informado respectivamente, aprobado por el Comité de Ética de la Pontificia Universidad Católica de Chile, n°14-165 (**Anexo 1 y 2**). El estatus de infección de *H. pylori* del paciente se determinó mediante un test rápido de ureasa (Pronto Dry, Ecifarma), usando una biopsia de antro obtenida durante la endoscopia.

La muestra de jugo gástrico se obtuvo al comienzo del procedimiento endoscópico, mediante un sistema de aspiración conectado al endoscopio, éste fue recibido y almacenado en un contenedor estéril. El pH del jugo gástrico se midió con tiras indicadoras de pH (Merck).

Las muestras fueron divididas en dos alícuotas de igual volumen. Una de las alícuotas se almacenó en 2 criotubos con 1,5 ml de jugo gástrico en glicerol 10% y un criotubo con 500 µl de jugo gástrico en RNAlater. Para determinar la contribución del componente soluble del jugo gástrico, la alícuota de jugo gástrico remanente se filtró pasando la muestra por un poro de 0,22 µm (EDLAB) y se guardó en 2 criotubos en alícuotas de 1,5 ml de jugo gástrico filtrado en glicerol 10% y un criotubo con 500 µl de jugo gástrico filtrado en RNAlater (Invitrogen).

2.1. Remoción bacteriana del jugo gástrico

Con el objetivo de evaluar la efectividad de la remoción bacteriana desde la muestra de jugo gástrico, se generó una curva estándar que da cuenta de la cantidad de bacterias presentes en las diluciones seriadas de un cultivo bacteriano de *H. pylori*, cuantificadas mediante citometría de flujo. La cantidad de *16S rDNA* presente en cada dilución fue cuantificada a través de QPCR real time, de este modo se obtuvo una aproximación de la cantidad de bacterias de acuerdo con la cantidad de *16S rDNA* presente en la muestra de jugo gástrico.

De este modo, se realizó un ensayo con dos muestras de jugo gástrico de pacientes no infectados con *H. pylori*. Las muestras fueron divididas en dos alícuotas en donde una de ellas fue filtrada por un poro de 0,22 μm (EDLAB) (**Figura 13A**) y fue cuantificada por QPCR real time del gen *16S rDNA* asociándole un número de bacterias/ml de jugo gástrico.

En un ensayo similar, a las muestras de jugo gástrico se le agregó 250 μl de cultivo bacteriano de *H. pylori*, el cual contenía 2×10^{10} bacterias. Estas fueron divididas en dos alícuotas, en donde una de ellas se filtró con un poro de 0,22 μm (EDLAB) (**Figura 13C**). Posteriormente por análisis de QPCR real time del gen *16S rDNA*, se cuantificó el número de bacterias/ml de jugo gástrico.

En ambos experimentos se analizó la cantidad de bacterias recuperadas en el jugo gástrico filtrado con respecto a su alícuota sin filtrar.

2.2. Caracterización de la microbiota del jugo gástrico

A partir de las muestras de jugo gástrico y jugo filtrado guardadas en RNAlater (Invitrogen) se extrajo el DNA genómico utilizando el kit ZR Fecal DNA Miniprep (ZYMO Research) (**Sección 5.1**). Posteriormente, 6 de las 8 muestras de DNA fueron secuenciadas a través de la plataforma Illumina y la población microbiana fue analizada por medio de la herramienta QIIME. La secuenciación de las muestras se realizó en la Universidad de Alabama en Birmingham, EEUU.

2.3. Secuenciación del gen *16S rDNA*

La amplificación por PCR Barcoded de la región hipervariable V4 del gen *16S rRNA* fue realizada utilizando primers previamente diseñados por Caporaso y cols. (93). Los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa, y el DNA fue aislado, purificado y cuantificado (94,95). Todas las muestras fueron amplificadas utilizando barcodes, y 101 lecturas de un solo extremo de base fueron secuenciadas usando la plataforma Illumina. Las lecturas de secuencia se generaron en formato FASTQ (95).

2.4. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático se realizó como se describe en el trabajo de Brawner y cols. (90). Brevemente, la calidad de los archivos FASTQ fueron evaluados utilizando FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), y la calidad del filtrado se evaluó utilizando FASTX toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Debido a la baja calidad de las bases hacia los extremos 3' de la lectura, 11 bases fueron recortadas desde el extremo 3' para todas las lecturas, haciendo que la longitud de lectura sea de 251 bases. Cualquier lectura con un promedio de calidad de base (Q) score < 20 fue descartada. Además, cualquier lectura con más del 10% de las bases con un score de Q < 30 fue descartada. El número total de lecturas fue de 440532 con una media de 73422 lecturas por muestra. El resto de los pasos se realizaron con la herramienta Quantitative Insight into Microbial Ecology (QIIME), versión 1.9 y Perl scripts desarrollado internamente. Las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas operacionales (OTU) utilizando el programa de agrupamiento UCLUST a un umbral de similitud de 100% (95). Los OTUs, con un total de lecturas contadas a través de todas las muestras ≤ 10 lecturas, fueron consideradas raras y fueron filtradas (96). Las asignaciones taxonómicas (al nivel de género) para todas las OTU se realizaron utilizando el Ribosomal Database Project classifier (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17586664?dopt=AbstractPlus>), disponible en QIIME contra la base de datos Greengenes (v13_8). Las OTUs, en las cuales la

abundancia total de lectura en todas las muestras fue <0,0005%, fueron consideradas raras y fueron filtradas (97) (98). Las OTUs se agruparon para resumir la abundancia de taxones en diferentes niveles jerárquicos de clasificación (phylum, clase, orden, familia, género). Alineamientos de múltiples secuencias de las OTUs fueron realizadas con PyNAST (99). La alfa diversidad fue analizada usando los índices de Simpson, Shannon y Chao, implementado en QIIME, y la beta diversidad (entre la diversidad de muestras) entre diferentes muestras se midió usando el análisis Unifrac.

3. Ensayos *in vitro* en la línea celular AGS

3.1. Cultivo bacteriano de *H. pylori*

Se cultivó *H. pylori* cepa 43504, en placas de Agar-Brucella suplementadas con 7% de suero de caballo (Donor Horse Serum, Corning) y 1X de DENT (Vancomicina 10 µg/ml, Trimetoprim 5 µg/ml, Cefsulodina 5 µg/ml Amfotericina B 5 µg/ml) (Oxoid™), a 37°C en cámara de anaerobiosis (BD GasPak™ EZ Container Systems, BD Diagnostics) con sobres de generación de atmósfera microaerofílica (CampyGen™2.5L, Thermo Scientific), por 2-3 días.

Para los ensayos de infección de células con *H. pylori*, se cosecharon 2 placas de cultivo, se resuspendieron en 3 ml de caldo brucella, del cual 1ml fue usado para medir la absorbancia en un espectrofotómetro a 600nm. A partir de la densidad óptica obtenida, se calculó el número de bacterias/ml utilizando una curva de crecimiento establecida para esta bacteria.

Se centrifugó 1 ml de cultivo bacteriano por 5 min. a 8000 rpm y con el pellet se prepararon las diluciones a utilizar con el medio de cultivo celular correspondiente, sin antibióticos.

En los ensayos de infección en células AGS, se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 50 bacterias por células y el co-cultivo se incubó por 24 horas. Mientras que en el cultivo en monocapa de células epiteliales derivadas de organoides se desafió con

un MOI de 30 por un periodo de 7 horas. En ambos modelos, la multiplicidad de infección fue determinada por ensayos previos de dosis respuesta ante la infección por la bacteria.

3.2. Cultivo de células AGS

Las células AGS ATCC©CRL-1739™, fueron gentilmente donadas por el Dr. Alejandro Corvalán, Pontificia Universidad Católica de Chile. Estas células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Corning), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biological Industries), penicilina (100 unidades/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml). Se incubaron a 37°C, en una atmósfera 5% CO₂ y 95% de humedad.

3.3. Curso temporal dosis de jugo gástrico

Para evaluar la dosis de jugo gástrico a utilizar y el tiempo de incubación de los tratamientos, se realizó una curva dosis respuesta. Dado que las muestras de jugo gástrico son sumamente heterogéneas, ya que presentan distinta viscosidad, textura y color, se decidió no sólo considerar la cantidad de bacteria, que por lo demás es relativamente similar entre las muestras (en el orden de 10¹¹ bacterias/ml de jugo gástrico), sino también considerar la presencia del componente no bacteriano en el jugo gástrico. Se evaluaron dosis de 50 y 100 µl de muestra de jugo gástrico en un cultivo de células AGS por 6, 12 y 24 horas. Como respuesta a la dosis se realizó un ensayo de viabilidad celular descrito en la **sección 5.2.1.**

3.4. Células AGS co-cultivadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado de niños infectados y no infectados con *H. pylori*

Se sembraron 50.000 células AGS por pocillo en placas de 24 pocillos, se incubaron por 24 horas, alcanzando un 50% de confluencia. Posteriormente fueron estimuladas con 100 µl de jugo gástrico y jugo gástrico filtrado, provenientes de niños infectados y no infectados con *H. pylori*, en medio de cultivo sin antibióticos, por 24 horas. Como

control se co-cultivó las células AGS con *H. pylori* en una multiplicidad de infección de 50 bacterias por células. Posterior a los tratamientos, se evaluó la viabilidad celular, la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata a través de RT-QPCR real time. Se analizó los genes que codifican para las proteínas formadoras de uniones estrechas (ZO-1, Cldn-2 y Cldn-4), receptores TLRs (TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9), citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α) y moléculas antimicrobianas β -defensinas (hBD1, hBD2, hBD3 y hBD4). Mediante ELISA, se determinó la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α). Además, se evaluó la estructura de la barrera epitelial, mediante inmunofluorescencia para las proteínas formadoras de uniones estrechas ZO-1, Cldn-2 y Cldn-4. Los protocolos correspondientes a estos ensayos se describen en la sección correspondiente a técnicas de biología celular y molecular (**Sección 5**).

4. Ensayos *in vitro* en células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides

4.1. Generación de medio condicionado para el cultivo de organoides

Los organoides fueron cultivados en un medio condicionado generado a partir del cultivo de células L-WRN (100), las cuales se caracterizan por secretar factores (Wnt-3, R-espondina y nogina) que activan la señalización canónica de la vía Wnt, la cual es requerida para la auto-renovación de las stem cells (101).

Para generar el medio condicionado se creció 1 vial de células L-WRN (Laboratorio Dr. Smith, Universidad de Alabama en Birmingham, EEUU) en una botella T150 con 25 ml de medio de cultivo L-cell (DMEM high glucosa suplementado con 1x penicilina/estreptomina y 10% de suero fetal bovino) durante toda la noche.

Al día siguiente el medio fue reemplazado por 25 ml de medio L-cell suplementado con 125 μ l de higromicina y 250 μ l de G418 y se creció hasta alcanzar confluencia.

Posteriormente, se lavaron las células con PBS-EDTA y se tripsinizaron con 300 μ l de tripsina-EDTA por 3-5 minutos a 37°C. Las células se expandieron a 6 botellas T150 en medio L-cell y se creció hasta alcanzar confluencia.

Las células fueron cultivadas con medio primario (medio Advanced DMEM/F12 suplementado con 1x de L-glutamina, 1x penicilina/estreptomicina y 20% suero fetal bovino). Al día siguiente, el medio de cada botella fue recolectado en falcon de 50 ml y fue centrifugado a 2500 RPM por 8 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue colectado en una botella de 1 L y se guardó a 4°C. A cada botella con células, se les cambió medio primario fresco. Este procedimiento se repitió cada 24 horas por 4 días.

4.1.1. Medio condicionado para el cultivo de organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de organoides

Luego del cuarto día, el medio condicionado obtenido se alicuotó en tubos falcon y se diluyó a un 50% utilizando medio primario, el cual fue suplementado con gentamicina (1 μ l/ml), fungizona (10 μ l/ml), 10 μ M del factor Y-27632 (inhibidor ROCK; Tocris Bioscience) y 10 μ M del factor SB-431542 (inhibidor TGFBR1; Tocris Bioscience). El inhibidor de ROCK, Y276321, mejora la viabilidad celular y el inhibidor del receptor tipo I de TGF- β , SB431542, mejora el crecimiento de esferoides inhibiendo la activación basal de TGF- β (102).

Para el crecimiento de las células epiteliales en monocapa se preparó 10% del medio condicionado anteriormente descrito en 90% de medio condicionado primario y se suplementó con 1 μ l/ml del factor Y-27632.

4.2. Donantes de biopsias gástricas de pacientes pediátricos

Participaron en este estudio pacientes pediátricos derivados a endoscopía digestiva alta por su médico tratante. Como criterio de inclusión se consideraron pacientes pediátricos de 3 a 10 años. Se excluyeron aquellos pacientes que presentaban alguna enfermedad inmuno mediada previamente diagnosticada, que hayan utilizado antibióticos,

inhibidores de la bomba de protones y tratamiento con productos probióticos, durante el mes previo a la endoscopia. Además, se excluyeron todos los pacientes pediátricos infectados con *H. pylori*. El procedimiento endoscópico se llevó a cabo en el Children's Hospital en Birmingham, Alabama (EEUU). Previo al procedimiento, los padres de los participantes y los niños mayores de 7 años firmaron el correspondiente consentimiento y asentimiento informado respectivamente, aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Alabama en Birmingham. Durante el procedimiento se tomaron 4 biopsias de antro, una de las cuales fue utilizada para determinar el estatus de infección de *H. pylori* del paciente mediante un test rápido de ureasa, una segunda biopsia fue guardada en RNAlater (Invitrogen) para la determinación de expresión génica y las dos restantes se utilizaron para generar el cultivo de organoides.

4.3. Generación de organoides gástricos a partir de biopsias gástricas de pacientes pediátricos

Los organoides fueron generados a partir de 2 biopsias gástricas provenientes de un paciente pediátrico. Las biopsias fueron recolectadas en medio de almacenamiento (medio DMEM suplementado con 1% penicilina/estreptomicina, 1% fungizona, 2mM de L-glutamina, 1mM de piruvato de sodio) y fueron procesadas de manera inmediata, según el protocolo desarrollado por Stappenbeck y cols. (103), el cual se describe a continuación.

Con el objetivo de aislar las criptas gástricas, las biopsias fueron cortadas con bisturí en trozos pequeños y digeridos con una solución de 2 mg/ml de colagenasa tipo I (Invitrogen) y 50 µg/ml de gentamicina en buffer de lavado (DMEM/F12 con HEPES suplementado con 1x L-glutamina, 1x Penicilina/Estreptomicina y 10% de suero fetal bovino), durante 30 minutos. Posteriormente se detuvo la reacción utilizando buffer de lavado. Se filtró la mezcla a través de un poro de 70µm (Falcon). El filtrado fue colectado y se centrifugó a 150 g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y en frío se agregó la cantidad necesaria de matrigel (BD Biosciences) según el número de pocillos,

considerando 15 μ l de matrigel por pocillo. En una placa de 24 pocillos, se sembraron 15 μ l/pocillo de la mezcla, la placa se volteó hacia abajo y fue incubada durante 15 minutos en esta posición a 37°C. Luego se volteó la placa a la posición normal y se agregó 450 μ l de medio condicionado básico. El medio de cultivo se cambió día por medio y diariamente las placas fueron observadas al microscopio, para visualizar el crecimiento de las células individuales hasta convertirse en esferas de organoides gástricos.

4.4. Obtención de un cultivo en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides

El cultivo en monocapa de células epiteliales derivadas de organoides gástricos, fue generado partir del protocolo perfeccionado por la Dra. Lesley Smythies y el Dr. Phillip Smith, de la Universidad de Alabama en Birmingham, Alabama (EEUU). El protocolo se describe a continuación.

De un cultivo de abundante de organoides (20 pocillos aproximadamente), se descartó el medio condicionado y se agregó 500 μ l/pocillo de PBS-EDTA para remover el matrigel del fondo de la placa. Se juntó el contenido de los pocillos, se centrifugó por 5 minutos a 150 g y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se tripsinizó por 2 minutos, se agregó buffer de lavado para detener la reacción y se filtró a través de un poro de 40 μ m. El filtrado se centrifugó por 5 minutos a 150 g.

En este momento se preparó la cámara en donde las células fueron sembradas, agregando 250 μ l por pocillo de una solución fría de matrigel-DPBS (1:30) incubando por 20-30 minutos a 37°C en una cámara con humedad.

Luego de centrifugar el cultivo, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 500 μ l de medio condicionado 5%. Las células fueron contadas mediante una cámara de Neubauer y se calculó entre 4×10^4 y $1,2 \times 10^5$ células por pocillo para una cámara de 8 pocillos (LabTek #154534, Thermocientific Nunc), las cuales fueron sembradas en 250

μl de medio condicionado 5%. El medio se cambió diariamente hasta agregar los tratamientos.

4.4.1. Determinación de confluencia de monocapa

Se sembraron las monocapas en triplicado según el protocolo anteriormente descrito. La cuantificación de confluencia fue obtenida por el análisis de 4 fotografías (con un aumento del 20x) por réplica, por día (del día 0 al día 4). Se cuantificó el área utilizada por las células a través del software NIS-Elements BR y se determinó el porcentaje de confluencia de acuerdo al área total capturada.

4.5. Caracterización de la expresión génica en tejido, organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells organoides

Con el objetivo de evaluar si existe un cambio en la expresión génica al pasar de un tipo de muestra a otra, se comparó en las biopsias, organoides y monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides, proveniente del mismo paciente, los niveles de expresión de genes característicos de epitelio gástrico. Los partidores y programas utilizados se encuentran descritos en la **sección 5.3.3.1**. Además, se evaluó la expresión basal de algunos genes involucrados en la respuesta inmune innata, cuyos partidores y programas se describen en la **sección 5.3.3.2**.

4.6. Ensayo *in vitro* de monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides estimuladas con el jugo gástrico y jugo gástrico filtrado de niños infectados y no infectados con *H. pylori*

Monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides, fueron cultivadas en cámaras de 8 pocillos por 24 horas, alcanzando un 50% de confluencia. Posteriormente fueron estimuladas con 35 μl de jugo gástrico y jugo gástrico filtrado, provenientes de niños infectados y no infectados con *H. pylori*, por 24 horas. El volumen

de jugo gástrico fue calculado de manera proporcional a la superficie de cultivo dada por la cámara de 8 pocillos (LabTek #154534, Thermocientific Nunc) utilizada.

Se evaluó la viabilidad celular, la expresión de genes a través de RT-QPCR real time, incluyendo los genes que codifican para las proteínas formadoras de uniones estrechas (ZO-1, Cldn-2 y Cldn-4), receptores TLRs (TLR2 y TLR4), citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α) y moléculas antimicrobianas β -defensinas (hBD1 y hBD2). Mediante ELISA, se determinó la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF- α). Además, en este modelo se evaluó las proteínas asociadas a la barrera epitelial, mediante inmunofluorescencia para las proteínas formadoras de uniones estrechas ZO-1, Cldn-2 y Cldn-4. Específicamente para evaluar ZO-1, se hicieron los ensayos en triplicado y se capturaron 10 fotografías por réplica, por tratamiento. Estas fueron analizadas mediante el software NIS-Elements BR. Se contabilizaron el total de células, contando los núcleos dados por la tinción de DAPI y se calculó el porcentaje de diferentes parámetros morfológicos establecidos.

4.7. Ensayo de infección primaria de *H. pylori* en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides

Para simular la primo-infección por *H. pylori*, se utilizaron monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides, en cámaras de 8 pocillos por 24 horas, alcanzando un 50% de confluencia. Las monocapas fueron pre-estimuladas con 35 μ l de jugo gástrico y jugo gástrico filtrado, provenientes de niños no infectados con *H. pylori*, por 24 horas. Se desafió con *H. pylori* en una multiplicidad de infección de 30 bacterias/célula durante 7 horas. Posteriormente se evaluó la distribución de ZO-1 por medio de inmunofluorescencia, como proteína asociada a la barrera epitelial, tal como se describe en la **Sección 5.5**.

5. Técnicas de biología celular y molecular

5.1. Extracción de DNA genómico desde la muestra de jugo gástrico

Se tomaron 200 µl de la muestra de jugo gástrico en RNAlater y se extrajo el DNA genómico (total) utilizando el kit ZR Fecal DNA Miniprep (ZYMO Research), según las indicaciones del fabricante. La concentración de DNA obtenido se midió por Nanodrop.

5.1.2. Cuantificación bacteriana a través del gen *16S rDNA*

Se tomaron 2µl de DNA de jugo gástrico y se realizó un QPCR con partidores universales para el gen *16S rDNA* de la **Tabla 2**. La cuantificación se realizó utilizando el kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) en el equipo Mx3000P qPCR System de Stratagen, utilizando el programa de la **Tabla 3**.

Tabla 2. Secuencia de partidores de amplificación del gen *16S rDNA*

Gen	Partidor	Secuencia	Ref.
16S rDNA	926F	AAACTCAAAGGAATTGACGG	(104)
	1062R	CTCACRRCACGAGCTGAC	

Tabla 3. Programa de amplificación del gen *16S rDNA* por PCR real time

T° de alineamiento de los partidores	Nombre de los partidores	Programa			
52°C	16S rDNA	95°	95°	52°	72°
		8'	30"	30"	30"
40 ciclos					

5.2. Viabilidad celular

5.2.1. Viabilidad celular en células AGS. Ensayo MTT

La viabilidad celular se midió luego de 24 horas de incubación de células AGS con los respectivos tratamientos. A cada pocillo se agregó 0,5 mg/ml de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazoliumbromide. Tocris Biosciences) y se incubó por 2 horas a 37°C. El producto que da cuenta de la actividad metabólica genera cristales de formazán (de color violeta), los cuales se disolvieron en alcohol isopropílico con 0,04% de HCl. La absorbancia de la tinción soluble se midió a 550 nm y se realizó una corrección a 620 nm (105,106). Se utilizó como control de muerte celular, células AGS tratadas por 5 minutos con metanol y se consideró como blanco el medio de cultivo sin células. La viabilidad celular fue calculada como el porcentaje de densidad óptica obtenida en relación a las células AGS sin tratar.

5.2.2. Viabilidad celular en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides. Ensayo de ATP

Las monocapa de células epiteliales fueron tratadas 24 horas post siembra y la viabilidad celular fue evaluada luego de 24 horas de incubación con los respectivos tratamientos, utilizando el kit CellTiter-Glo® Luminescent (Promega). La placa fue puesta por 30 minutos a temperatura ambiente para equilibrar. Se agregó la misma cantidad de volumen del reactivo CellTiter-Glo que el volumen de cultivo y se mezcló por 2 minutos en un shaker orbital a temperatura ambiente. Luego de 10 minutos, se transfirió 100 µl de la mezcla en cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo blanco (Costar: 3917). La luminiscencia fue leída en 0.25-1 seg/pocillo con una ganancia de 150. Se utilizó como control de muerte celular, una monocapa de células epiteliales tratadas por 5 minutos con metanol y se consideró como blanco el medio de cultivo sin células. La viabilidad celular fue calculada como el porcentaje de luminiscencia obtenida en relación a las células sin tratar.

5.3. Expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata

5.3.1. Extracción de RNA

5.3.1.1. Extracción de RNA de células AGS

Al remanente celular del ensayo en células AGS, se agregó 300 µl de Trizol (Invitrogen) por pocillo, se raspó el pocillo con la punta de la micropipeta y se recogió el homogeneizado en un tubo y se guardó a -80°C hasta su procesamiento.

Para extraer el RNA, el tubo con la mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 60 µl de cloroformo y se agitó durante 15 segundos, se incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C. Luego de formarse las 3 fases de separación, se tomó la fase inorgánica (superior) para obtener el RNA y se agregó 150 µl de alcohol isopropílico. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Se removió el sobrenadante y se agregó 300 µl de etanol al 75%. Se mezcló brevemente por vortex y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se secó a temperatura ambiente por 5-10 minutos y se resuspendió el pellet de RNA total en 30 µl de agua libre de nucleasas. La absorbancia se determinó a 260 y 280 nm.

5.3.1.2. Extracción de RNA de biopsias gástricas, organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides

La extracción de RNA de las biopsias gástricas, organoides y monocapas de células epiteliales derivadas de organoides, se realizó con el kit de extracción RNeasy Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Brevemente, las biopsias gástricas fueron puestas en un nuevo tubo con 600 µl de buffer RLT y se homogenizó utilizando un homogeneizador a motor, luego se centrifugó el lisado por 3 minutos a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf.

Mientras que los cultivos de organoides como las monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides, se les removió el sobrenadante y al remanente celular se le agregó 250 µl por pocillo de buffer RLT y se congeló a -20°C hasta su uso. Para extraer el RNA de las muestras, se agregó 250 µl de etanol 70% al lisado y se mezcló por pipeteo. Luego se transfirió 700 µl de mezcla a una columna incluida en el kit y se centrifugó 15 segundos a 8000 g y se descartó el filtrado. Después en la columna se agregó 700 µl de Buffer RW1, se centrifugó por 15 segundos a 8000 g y se descartó el filtrado, luego se agregó 500 µl de Buffer RPE, se centrifugó 15 segundos a 8000 g y se descartó el filtrado. Finalmente, la columna se depositó en un nuevo tubo eppendorf y se agregó 30 µl de agua libre de nucleasas para eluir el RNA y se centrifugó por un minuto a 8000 g. La absorbancia se determinó a 260 y 280 nm.

5.3.2. Síntesis de cDNA

A partir de los RNA obtenidos, se sintetizó el cDNA utilizando el kit AffinityScript QPCR cDNA Synthesis (Agilent Technologies). La reacción se realizó con 10 µl de master mix 2X, 1,5 µl de Oligo DT (0,1 µg/µl), 1,5 µl de random primer (0,1 µg/µl), 1 µl de AffinityScript RT/ RNase y 6 µl de RNA (0,3 µg). Se usó el programa: 25°C por 5 minutos, 42°C por 5 minutos, 55°C por 40 minutos y 95°C por 5 minutos.

5.3.3. Cuantificación por QPCR real time de la expresión génica

La cuantificación del mRNA se realizó utilizando el kit Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies) en el equipo Mx3000P QPCR System de Stratagen. La expresión relativa de cada gen se normalizó a partir de la expresión del gen GAPDH.

5.3.3.1. Cuantificación de la expresión de genes estructurales en tejido, organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells organoides

Los partidores y los programas utilizados para la amplificación se encuentran en la **Tabla 4** y **Tabla 5**, respectivamente.

Tabla 4. Secuencia de partidores de genes estructurales

Gen	Partidor	Secuencia	Ref.
LGR5	FW	AGAACACTGACTCTGAATGGT	*
	RV	TAAGACAGATCTAGCACTTGGAG	
CDH1	FW	AATCACATCCTACACTGCCC	*
	RV	TAGCAACTGGAGAACCATTGTC	
MUC5AC	FW	GGGAACTTCAACAGCATCCAG	*
	RV	CTGAGCATACTTCTCATTCTCCA	
GAST	FW	AGAGACCTGAGAGGCACCAG	*
	RV	CAGAGCCAGTGCAAAGATCA	
GAPDH	FW	AACCTGCCAAATATCATGAC	*
	RV	GTTGTCATACCAGGAAATGAG	

* Secuencia de partidores diseñados con el programa PerlPrimer

Tabla 5. Programas de PCR real time utilizados en la cuantificación de la expresión de genes estructurales

T° de alineamiento de los partidores	Nombre de los partidores	Programa		
55°C	Lgr5	95°	95°	55°
	CDH1	10'	30''	1'
57°C	GAST	95°	95°	57°
	MUC5AC	10'	30''	1'
60°C	GAPDH	95°	95°	60°
		10'	30''	1'
40 ciclos				

5.3.3.2. Cuantificación de la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata

Los partidores y los programas utilizados para la amplificación se encuentran en la **Tabla 6** y **Tabla 7**, respectivamente.

Tabla 6. Secuencia de partidores de genes involucrados en la respuesta inmune innata

Gen	Partidor	Secuencia	Ref.
IL-6	FW	AGATGTCTGAGGCTCATTCTG	*
	RV	CTTGTTACATGTCTCCTTTCTCAG	
IL-8	FW	TTGGCAGCCTTCCTGATTCT	*
	RV	AATTCTCAGCCCTCTTCAAAAAC	
TNF- α	FW	CTCTTCTCCTTCCTGATCGT	*
	RV	GAGGGTTTGCTACAACATGG	

TLR-2	FW	CTGGTAGTTGTGGGTTGAAGC	*
	RV	GAATGGAGTTTAAAGATCCTGAGC	
TLR-4	FW	TTTATCCAGGTGTGAAATCCAG	*
	RV	GATGCTAGATTTGTCTCCACAG	
TLR-5	FW	CTAGGACAACGAGGATCATGG	*
	RV	ATAGTTGAAGCTCAGCAGGA	
TLR-9	FW	GGACCTCGAGTGTGAAGCAT	*
	RV	GATTCAGTGAGTGTCCCCAGG	
hBD-1	FW	AGATGGCCTCAGGTGGTAACTTT	(107)
	RV	GGGCAGGCAGAATAGAGACATT	
hBD-2	FW	TGATGCCTCTTCCAGGTGTTT	(107)
	RV	GGATGACATATGGCTCCACTCTT	
hBD-3	FW	TCTGCCTTACCATTGGGTTC	(62)
	RV	CACGCTGAGACTGGATGAAA	
hBD-4	FW	TGTCGCAGCCAAGAATACAGA	(64)
	RV	AGCTCTCATCCCATTTTCTCAA	
ZO-1	FW	AAGAAGGATGTTTATCGTCGC	*
	RV	GCTCAGCTCTGTTCTTATTAGG	
Claudina-2 (Cldn-2)	FW	GAAAGACCATAGCACCAAGCGA	*
	RV	AGCAGTGCAGCTATCACTCAGA	
Claudina-4 (Cldn-4)	FW	AAACAGGTTTGGGCAGTGGT	*
	RV	TCCCAGGCTCATTAGTGTCCTT	
GAPDH	FW	AACCTGCCAAATATCATGAC	*
	RV	GTTGTCATACCAGGAAATGAG	

* Secuencia de partidores diseñados con el programa PerlPrimer

Tabla 7. Programas de PCR real time utilizados en la cuantificación de genes involucrados en la respuesta inmune innata

T° de alineamiento de los partidores	Nombre de los partidores	Programa			
55°C	ZO-1	95°	95°	55°	
	TNF- α	10'	30''	1'	
56°C	hBD-1	95°	95°	56°	72°
	hBD-2	10'	30''	1'	30''
	hBD-3				
	hBD-4				
58°C	Cldn-2	95°	95°	58°	72°
	Cldn-4	10'	30''	30''	30''
60°C	TLR-2	95°	95°	60°	72°
	TLR-4	10'	30''	30''	1'
	TLR-5	95°	95°	60°	
	TLR-9	10'	30''	1'	
	IL-8				
	GAPDH				
4-Step qPCR	IL-6	95°	95°	60°	80°
		10'	30''	1'	30''
40 ciclos					

5.4. Secreción de citoquinas pro-inflamatorias

A partir de los ensayos en células AGS y las monocapas de células epiteliales estimuladas con el jugo gástrico y jugo gástrico filtrado de niños infectados y no infectados con *H. pylori*, se evaluó la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8 y TNF- α , utilizando los kit comercial Human IL-6 ELISA Ready Set-Go de

ThermoFisher Scientific, Human IL-8 ELISA KitII (BD Biosciences), y Human TNF ELISA KitII (BD Biosciences) respectivamente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregó 50 µl de solución diluyente por pocillo y 100 µl de la solución estándar o de muestra, se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se aspiró la solución y se realizaron 5 lavados con solución de lavado y se agregó la solución que contiene el anticuerpo secundario unido a peroxidasa (Working Detector) 100 µl por pocillo y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa 7 veces, se agregó 100 µl de solución sustrato TMB One-Step y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se agregó 50 µl de solución Stop y se leyó en el espectrofotómetro a 450 nm con una corrección a 570 nm.

5.5. Detección de las proteínas formadoras de uniones estrechas por inmunofluorescencia

Una vez finalizado los tratamientos, las células fueron lavadas con PBS y fijadas en 2% de paraformaldehído (PFA) por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron lavadas con una solución PBS-Tween 0,05% (PBST) por 5 minutos cada lavado. Se permeabilizó con una solución 0,5% Triton X-100 en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBST. Posteriormente, las células se bloquearon con 1% BSA en PBST (solución de bloqueo) por 30 minutos y se incubaron con el anticuerpo primario (**Tabla 8**) diluido en la solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas 3 veces con PBST y se incubaron con el anticuerpo secundario (**Tabla 8**) conjugado a un fluoróforo, preparado en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS y los núcleos se tiñeron con DAPI por 7 minutos. Finalmente se lavó 3 veces con PBS, se agregó solución de montaje y se puso la cubierta para tapar el portaobjeto. Una vez que la cubierta estaba seca, se sellaron los bordes con esmalte de uña, se esperó por una hora para que éste secase y posteriormente las inmunofluorescencias fueron

observadas a través de un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U, acoplado a una cámara digital para registrar las imágenes.

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia para la detección de las proteínas formadoras de uniones estrechas

Proteína a detectar	Anticuerpo primario (dilución)	Anticuerpo secundario (dilución)
ZO-1	Purified mouse anti-human ZO-1 (1:50), BD	Goat anti-mouse 594 IgG1 (1:100), Invitrogen
E-cadherina	Anti-h/mE-cadherine affinity purified goat IgG (1:40), R&D Systems	Donkey anti-goat 488 (1:400), Invitrogen
Claudina-2	Rabbit anti- Claudin-2 (1:100), Invitrogen	Donkey anti-rabbit Cy3 (1:500), BioLegend
Claudina-4	Mouse anti-Claudin-4 (1:50), Invitrogen	Goat anti-mouse IgG1 488 (1:100), Invitrogen
ST6Gal-1	Goat IgG anti-human ST6Gal-1 (1:100), R&D Systems	Donkey anti-goat 488 (1:400), Invitrogen

* Se utilizó como marcador de núcleo DAPI (1:1000), Invitrogen y como marcador de actina Faloidina (1:500), Invitrogen.

5.5.1. Cuantificación de parámetros morfológicos de la expresión de ZO-1 en monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides

El ensayo se realizó en triplicado, se capturaron 10 imágenes por réplica y por tratamiento, utilizando las herramientas del software NIS-Elements BR. Se contaron el número de células totales en las imágenes (determinado por el número de núcleos dados por la tinción de DAPI, en azul) y se calculó el porcentaje de células que presentan los

parámetros que incluyen quiebres en la estructura de la barrera de células epiteliales, inmuno-tinción de ZO-1 difusa y/o débil, apariencia puntiforme y formación de estructuras en forma de anillos.

6. Análisis estadístico

El análisis realizado para evaluar las características generales de los pacientes fue test exacto de Fisher para las variables categóricas y el test no paramétrico de Mann-Whitney U para las variables continuas.

Las diferencias entre los grupos en los distintos ensayos se evaluaron mediante ANOVA de una vía, utilizando test a *posteriori* de comparaciones múltiples de Bonferroni. Todos los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Como condición previa al desarrollo experimental de los objetivos propuestos en esta tesis, fue necesario caracterizar las muestras de jugo gástrico (I. Caracterización de los pacientes y las muestras de jugo gástrico). Además, se caracterizó tanto el desarrollo del modelo de monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells, como también la expresión génica de éste (II. Descripción y caracterización del modelo de monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides gástricos). Posterior a la descripción de las muestras y del modelo de estudio, evaluamos el efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad celular de ambos modelos, en células AGS y en monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides (III. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la viabilidad celular en los modelos *in vitro* de células epiteliales gástricas), para finalmente responder a los objetivos planteados en ésta tesis (IV. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la integridad de la barrera y función de las células epiteliales gástricas), evaluando el efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la integridad de la barrera y función de las células epiteliales gástricas.

I. Caracterización de los pacientes y las muestras de jugo gástrico

Las muestras de jugo gástrico provienen de 4 niños no infectados y 4 niños infectados con *H. pylori*, de un promedio de edad de $13,5 \pm 4,5$ y $12,2 \pm 2,7$ años ($p=0,60$), respectivamente (Tabla 9). Durante la semana previa de la endoscopia, el 75% de los pacientes de cada grupo presentó dolor abdominal, el 50% de los niños no infectados presentaron vómitos mientras que en el grupo de los niños infectados con *H. pylori* el 25% de ellos presentaron vómitos y diarrea. Al ajustar el índice de masa corporal (IMC) de los niños con respecto a su edad y sexo (108), se encontró que el 50% de ellos en cada grupo se encontraba dentro de los parámetros normales, mientras que el 50%

presentaban sobrepeso o índice de obesidad. Como era de esperarse, los niños no infectados tuvieron una endoscopia digestiva alta normal (75%, p=0,11) y un caso de esofagitis, mientras que en el grupo de los niños infectados con *H. pylori* el 50% presentaron esofagitis (p=0,99) y el otro 50% presentó gastropatía inespecífica (p=0,46) (Tabla 9).

Tabla 9. Características generales de los pacientes donantes de las muestras de jugo gástrico

	<i>H. pylori</i> negativo n=4	<i>H. pylori</i> positivo n=4	<i>p</i>
Sexo femenino	4 (100%)	1 (25%)	0,12
Edad	13,5 ± 4,5	12,2 ± 2,7	0,60
IMC	24,3 ± 8,9	21,5 ± 4,9	0,70
Normal, n (%)	2 (50)	2 (50)	1,00
Sobre peso y obesidad, n (%)	2 (50)	2 (50)	1,00
Síntomas, n (%)			
Dolor abdominal	3 (75)	3 (75)	1,00
Vómito	2 (50)	1 (25)	0,99
Diarrea	0 (0)	1 (25)	0,99
Conclusión EDA, n (%)			
Normal	3 (75)	0 (0)	0,11
Gastropatía inespecífica	0 (0)	2 (50)	0,46
Esofagitis	1 (25)	2 (50)	0,99
pH del jugo gástrico	1,63 ± 0,25	1,63 ± 0,25	0,92

Composición de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori*

Las muestras de jugo gástrico de niños infectados (JG Hp(+)) y no infectados (JG Hp(-)) con *H. pylori*, se estudiaron mediante secuenciación (Figura 7). El análisis de α -diversidad, observado por la curva de rarefacción (Figura 7A), demuestra que las muestras son similares y comparables entre sí, arrojando entre 20.000 a 25.000 secuencias por muestra con un número similar de especies observadas. Además, los parámetros de α -diversidad, que evalúan la riqueza de especies en relación a la abundancia de éstas, indican que no existen diferencias significativas entre las muestras al ser evaluados mediante los índices de Chao (Figura 7B), Shannon (Figura 7C) y Simpson (Figura 7D).

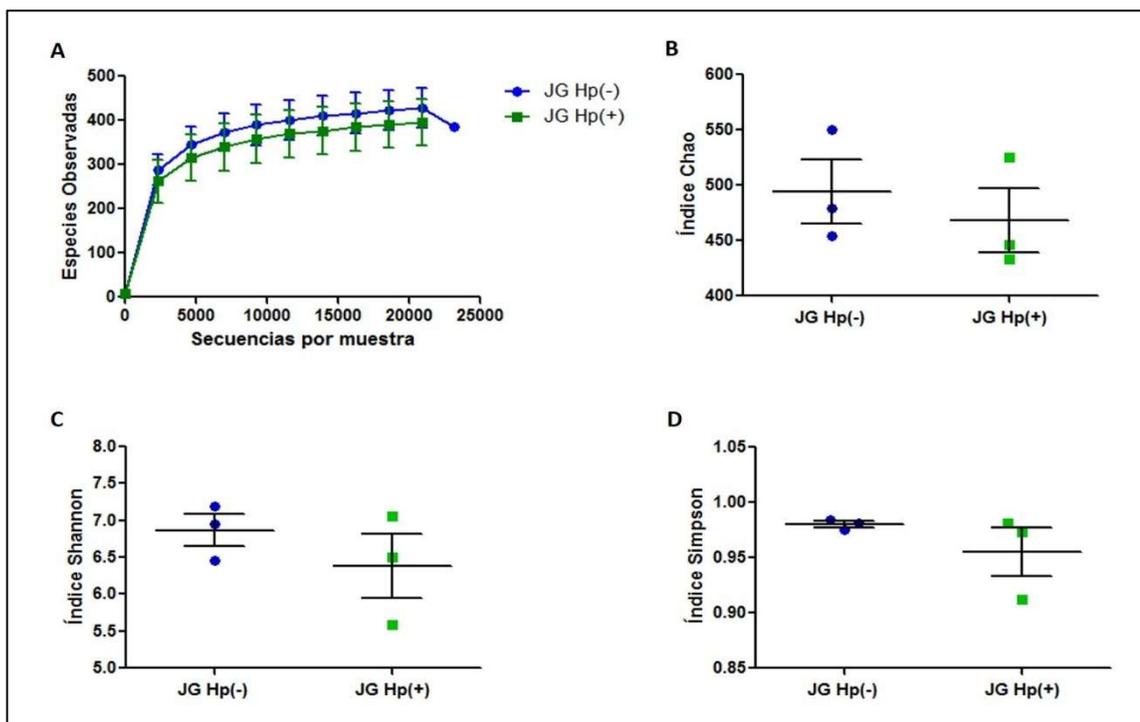


Figura 7: Análisis de α -diversidad de las secuencias de las muestras de jugo gástrico. A) Curva de rarefacción de las especies observadas, B) índice Chao, C) índice Shannon, D) índice Simpson.

La comunidad bacteriana presente en las muestras de jugo gástrico fue analizada en los diferentes niveles taxonómicos. Los phylum bacterianos mayormente representados fueron bacterias del phylum Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Tenericute y Verrucomicrobia. Los jugos gástricos provenientes de niños infectados con *H. pylori*, poseen una menor abundancia de bacterias pertenecientes al phylum Actinobacteria ($p=0,0034$) y Firmicutes ($p=0,0358$) y una mayor abundancia de Proteobacterias ($p= 0,0421$) en comparación a los jugos gástricos de niños no infectados con *H. pylori* (Figura 8).

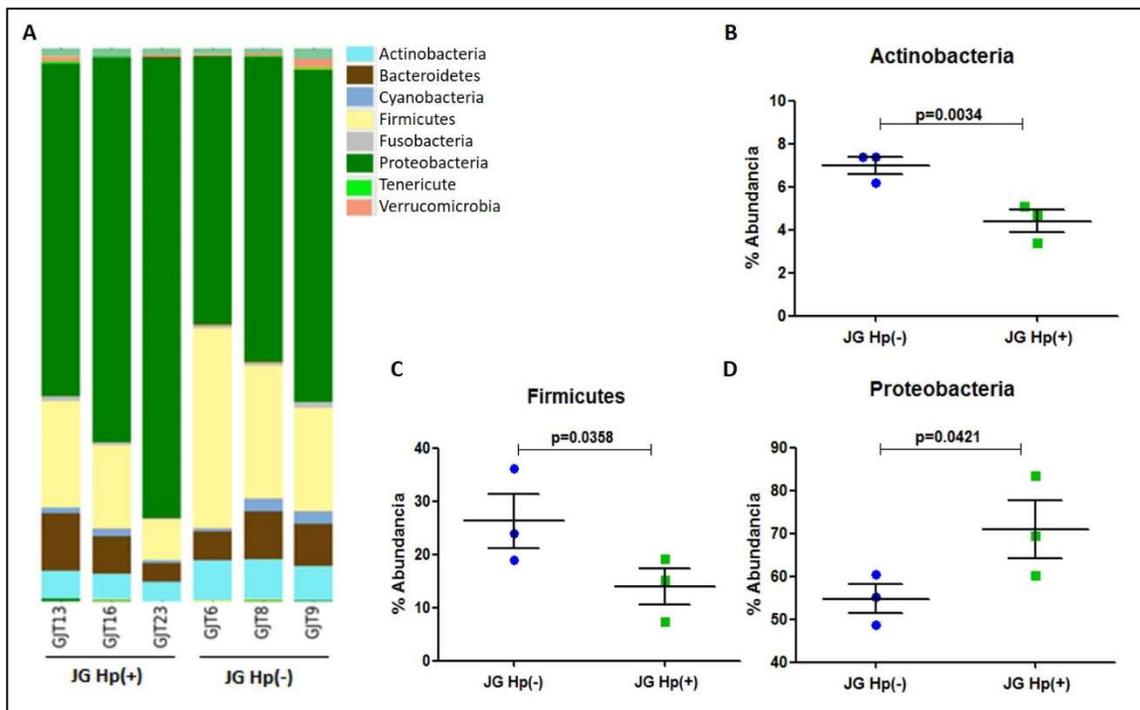


Figura 8: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de phylum. A) Abundancia relativa de las muestras de jugo gástrico de niños no infectados (JG Hp(-)) y jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)). Porcentaje de abundancia de bacterias del phylum B) Actinobacteria, C) Firmicutes y D) Proteobacteria.

A nivel de clase, las comunidades bacterianas mayormente representadas fueron bacterias del tipo Actinobacteria, Bacteroidia, Bacilli, Clostridia, Alphaproteobacteria,

Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria y Gammaproteobacteria. Entre estas, se encontró que los jugos gástricos provenientes de niños infectados presentaban una menor proporción de Actinobacteria ($p=0,0039$), Clostridia ($p=0,0342$) y Deltaproteobacteria ($p=0,0099$) en comparación a su contraparte (**Figura 9**).

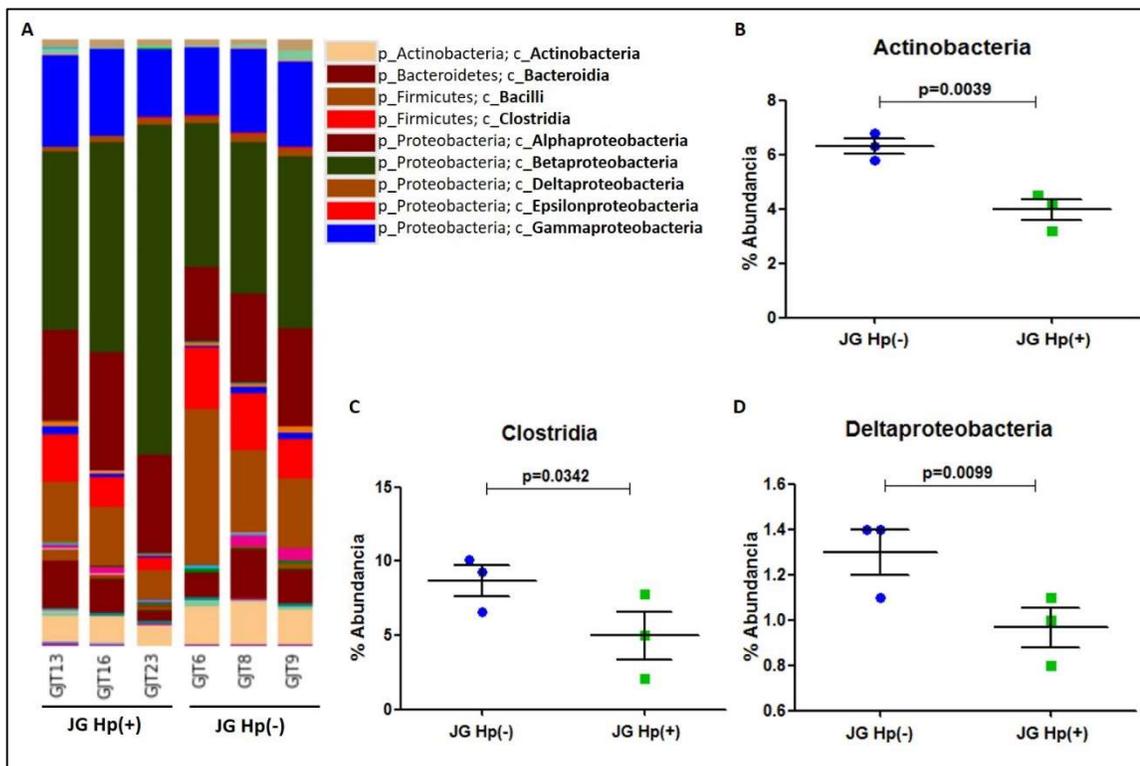


Figura 9: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de clase. A) Abundancia relativa de las muestras de jugo gástrico de niños no infectados (JG Hp(-)) y jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)). Porcentaje de abundancia de bacterias de la clase B) Actinobacteria, C) Clostridia y D) Deltaproteobacteria.

Las bacterias pertenecientes al orden Pseudomonales, Burkholderiales, Caulobacterales, Lactobacillales, Bacillales, Bacteroidales, Clostridiales y Actinomycetales se encuentran mayormente representadas en la población presente en las muestras de jugo gástrico. Al comparar la composición por estatus de infección, se encontró que los jugos gástricos de

niños infectados con *H. pylori*, poseen una menor abundancia de bacterias del orden Actinomycetales ($p= 0,013$) y Clostridiales ($p= 0,0342$), en comparación a las muestras de jugos gástricos de niños no infectados (**Figura 10**).

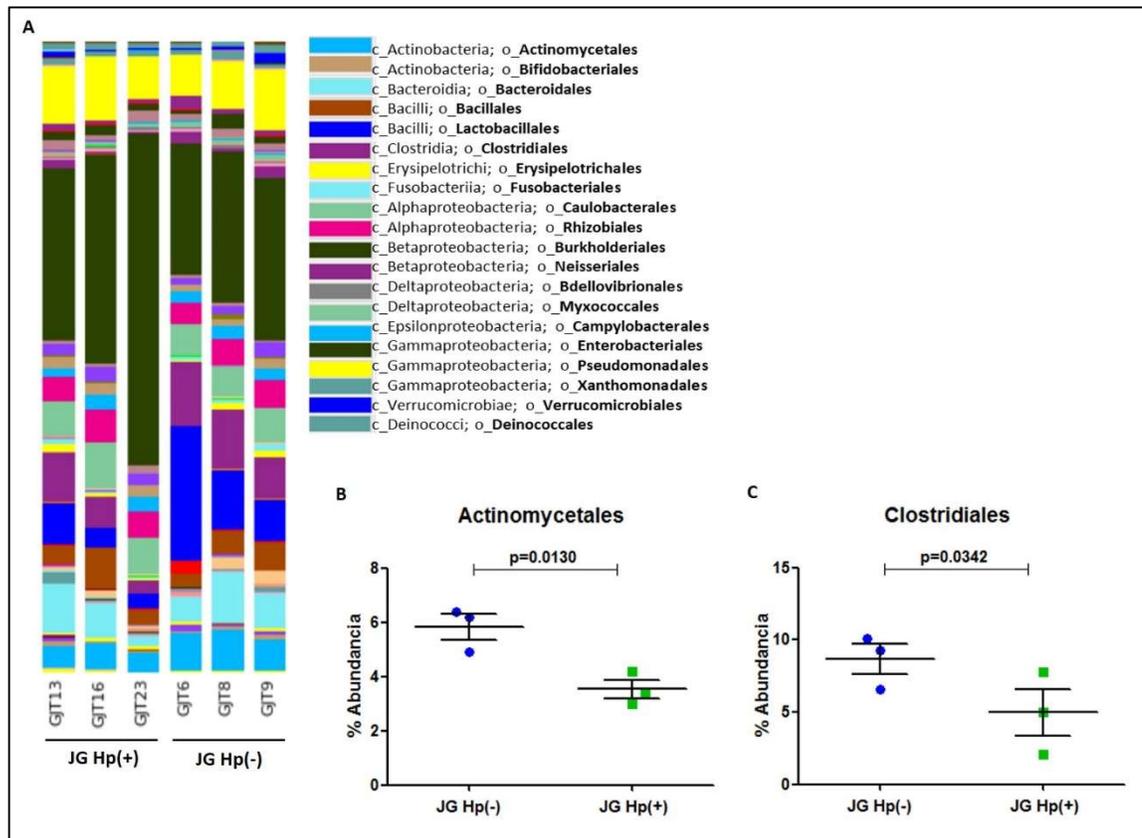


Figura 10: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de orden. A) Abundancia relativa de las muestras de jugo gástrico de niños no infectados (JG Hp(-)) y jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)). Porcentaje de abundancia de bacterias del orden B) Actinomycetales y C) Clostridiales.

Mientras que a nivel taxonómico de familia, los componentes bacterianos mayormente representados son Moraxellaceae, Oxalobacteraceae, Comamonadaceae, Streptococcaceae, Lactobacillaceae, Staphylococcaceae, Actinomycetaceae y Rhodospirillaceae ($p= 0,0371$), siendo esta última más abundantes en las muestras de

jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* en comparación a la muestras de jugo gástrico de los niños no infectados con la bacteria (**Figura 11**).

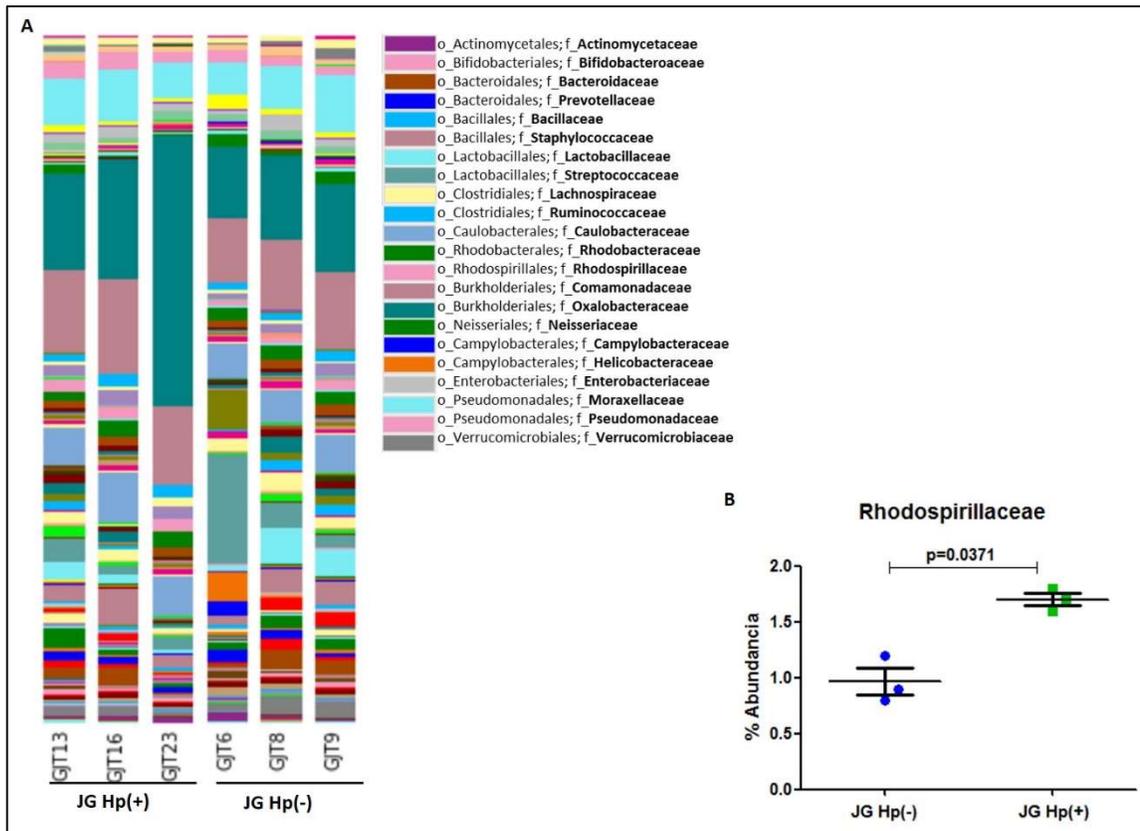


Figura 11: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de familia. A) Abundancia relativa de las muestras de jugo gástrico de niños no infectados (JG Hp(-)) y jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)). B) Porcentaje de abundancia de bacterias de la familia Rhodospirillaceae.

A nivel taxonómico de género, se encontraron mayormente representadas las bacterias del género *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Veillonella* y *Agrobacterium*. Sin embargo, sólo *Limnohabitans* se encuentra en una proporción significativamente mayor en los jugos gástricos de niños infectados con *H. pylori* en comparación a su contraparte (**Figura 12**).

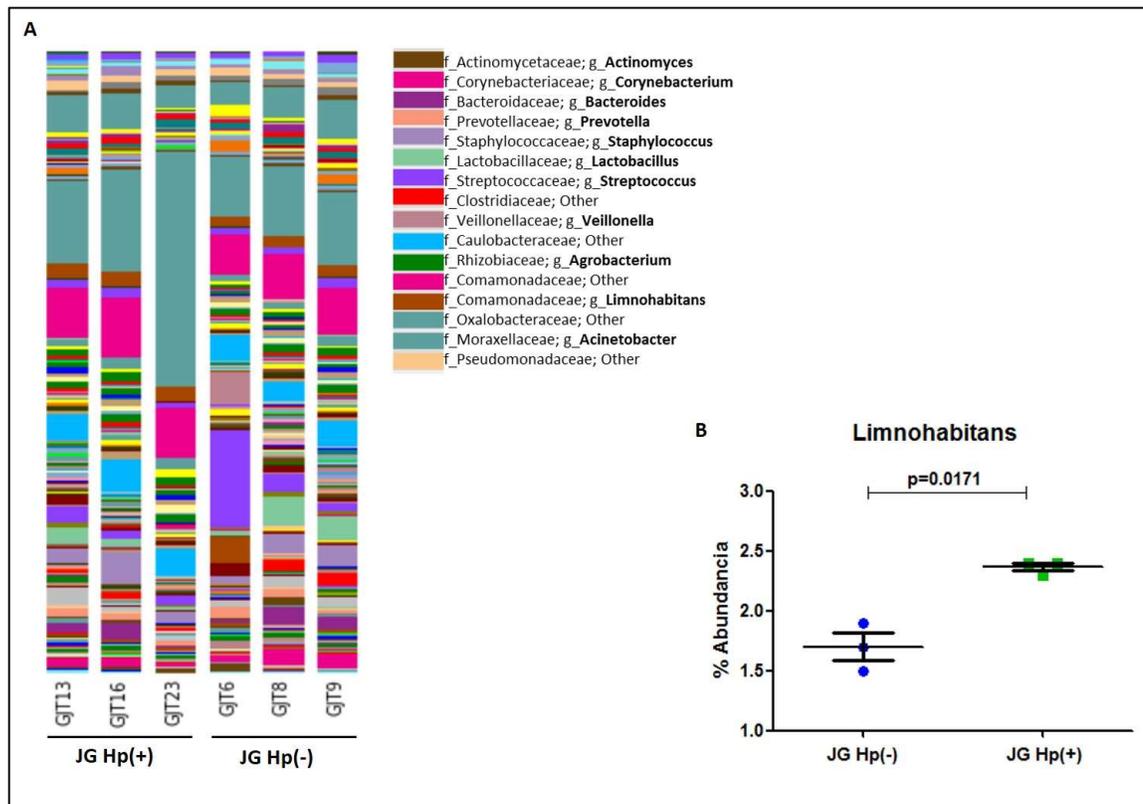


Figura 12: Composición bacteriana de las muestras de jugo gástrico a nivel de género. A) Abundancia relativa de las muestras de jugo gástrico de niños no infectados (JG Hp(-)) y jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)). B) Porcentaje de abundancia de bacterias del género *Limnohabitans*.

Remoción bacteriana del jugo gástrico

La efectividad de la remoción bacteriana (**Figura 13**), se evaluó con un ensayo en donde determinamos la cantidad de bacterias/ml de jugo gástrico mediante el análisis de QPCR real time del gen *16S rDNA* (**Figura 13B** y **Figura 13D**) antes y después del proceso de filtrado. Analizamos una alícuota de jugo gástrico de manera directa y una alícuota a la cual se le agregó una cantidad conocida de *H. pylori* (2×10^{10} bacterias). Determinamos que la remoción bacteriana a través del proceso de filtración fue efectiva, ya que tanto sin, como con adicionar *H. pylori* a la muestra de jugo gástrico, se logró eliminar entre

99,98-99,95% de las bacterias respectivamente, pasando por el filtro sólo el 0,002-0,005% de éstas o el material genético equivalente (Figura 13E).

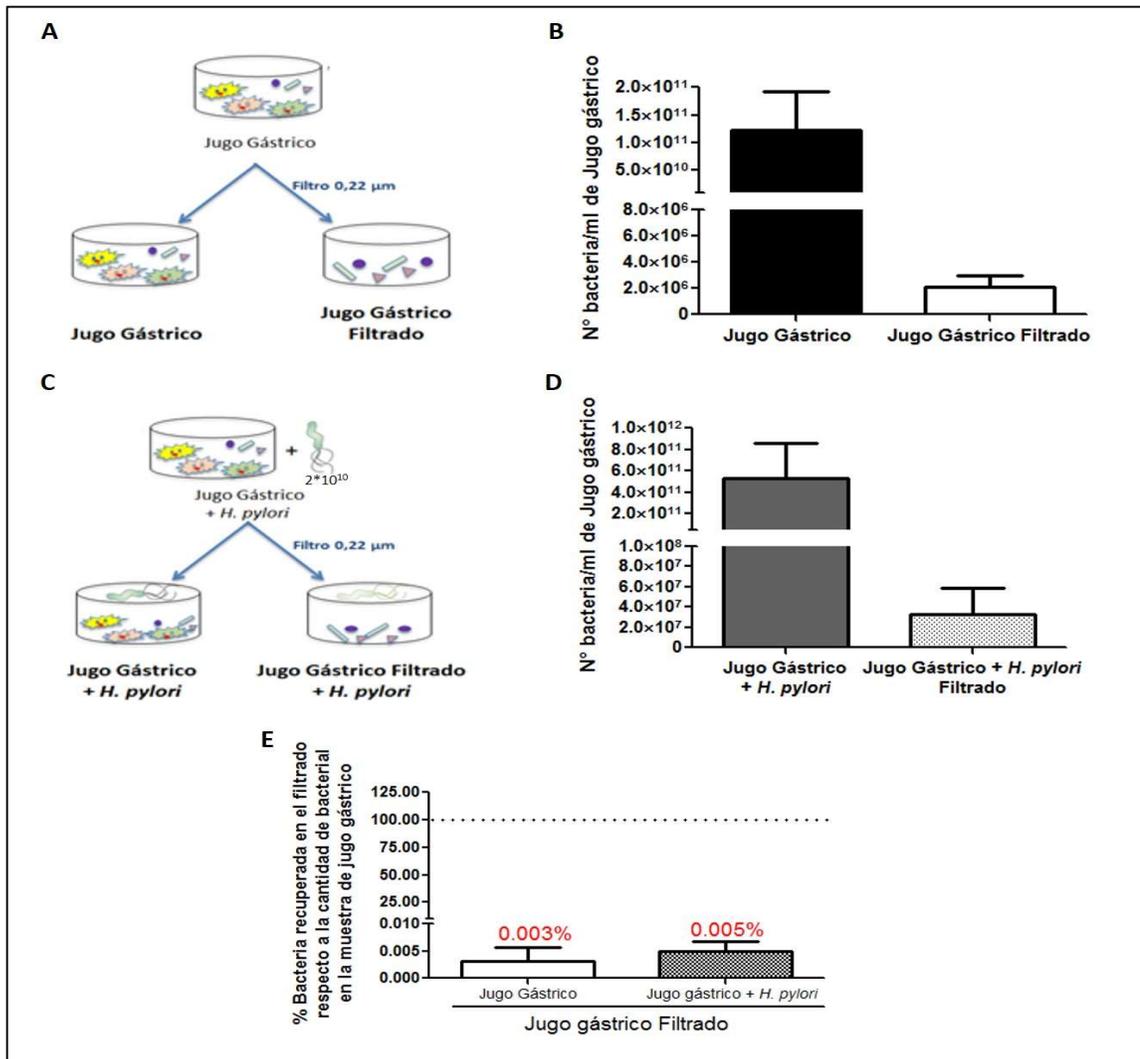


Figura 13: Efectividad de la remoción bacteriana desde las muestras de jugo gástrico. A y C) Esquema de los ensayos de remoción de bacterias desde las muestras de jugo gástrico y en presencia de 2×10^{10} bacterias de *H. pylori*, respectivamente. B y D) Cuantificación por QPCR real time del gen *16S rDNA* de las muestras de jugo gástrico y jugo gástrico filtrado en ausencia y presencia de *H. pylori*. E) Porcentaje de recuperación bacteriana en el jugo gástrico filtrado con respecto a su alícuota sin filtrar.

Curva tiempo de incubación y dosis de jugo gástrico

Para evaluar la dosis de jugo gástrico a utilizar y el tiempo de incubación de los tratamientos, se realizó una curva dosis respuesta, en donde se utilizó 50 y 100 μ l de jugo gástrico, por 6, 12 y 24 horas. El ensayo de viabilidad celular (**Figura 14**) arrojó que 50 μ l de jugo gástrico y jugo filtrado disminuía significativamente la viabilidad de las células AGS en aproximadamente un 60% en comparación a las células sin tratar, independiente del tiempo de incubación (**Figura 14A**), mientras que al utilizar 100 μ l de muestra, se obtuvo una disminución no significativa de la viabilidad celular, de alrededor del 40% en comparación al control (**Figura 14B**).

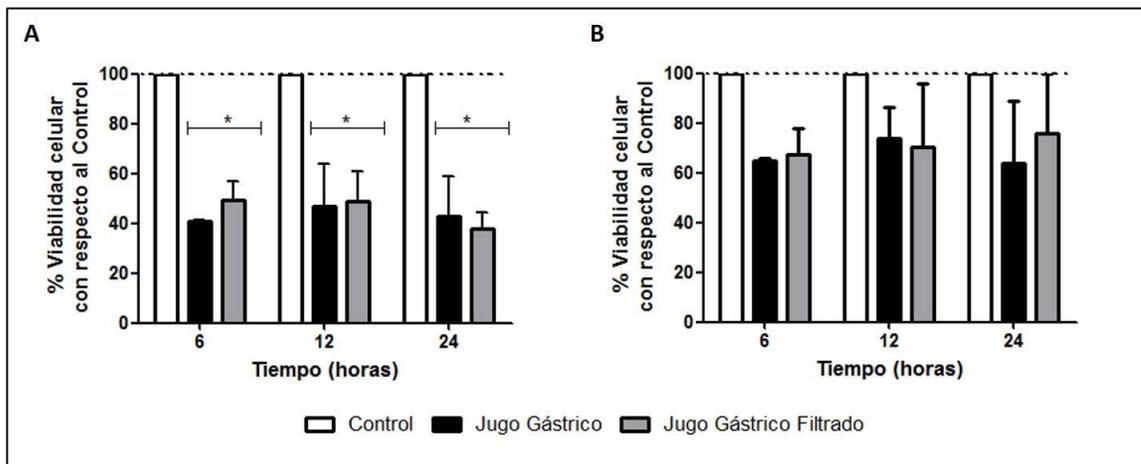


Figura 14: Dosis y tiempo respuesta de las muestras de jugo gástrico en células AGS. Ensayo de viabilidad en células AGS estimuladas con A) 50 μ l y B) 100 μ l de jugo gástrico (JG, barras negras) y jugo gástrico filtrado (JGF, barras grises) por 6, 12 y 24 horas de incubación, (n=2).

Dado el resultado anterior, los posteriores ensayos en células AGS se realizaron utilizando 100 μ l de jugo gástrico o jugo gástrico filtrado con 24 horas de incubación, en placas de 24 pocillos.

II. Descripción y caracterización del modelo de monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides gástricos

El cultivo de células AGS, ha sido históricamente un modelo *in vitro* clásico para el estudio de la patogenicidad por *H. pylori*. Sin embargo, las células AGS son células de adenocarcinoma gástrico, células inmortalizadas y por lo tanto modificadas genéticamente. Actualmente se ha desarrollado un nuevo modelo para estudiar respuestas epiteliales, el cual consiste en monocapas de cultivo primario humano de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides gástricos, las cuales son un modelo más cercano a la fisiología de la mucosa gástrica.

Curva de confluencia de las monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells organoides gástricos

Para generar monocapas de células epiteliales (**Figura 15**), el cultivo de organoides con un alto número de esferoides de tamaño deseado (**Figura 15C**), fue procesado de acuerdo al protocolo descrito en la sección de metodología (**Sección 4.4.1**) (**Figura 15A**). Con el objetivo de determinar el tiempo ideal para el tratamiento de las monocapas de las células epiteliales, por medio del análisis de microscopía se cuantificó la confluencia diaria (**Sección 2.5.5.**) de este cultivo (**Figura 15C-G**). Se determinó que al día 1 post siembra de la monocapa se obtuvo un 50-60% de confluencia del cultivo (**Figura 15D y B**) y al día 3 post siembra se alcanzó el 100% de confluencia del cultivo (**Figura 15G y B**), la cual comienza a disminuir por muerte celular a partir del día 4 (**Figura 15H y B**). Determinándose de este modo, que luego de 24 horas post siembra es el tiempo indicado para tratar las células de modo tal de evaluar el efecto del tratamiento cuando éstas alcancen entre un 80-100% de confluencia.

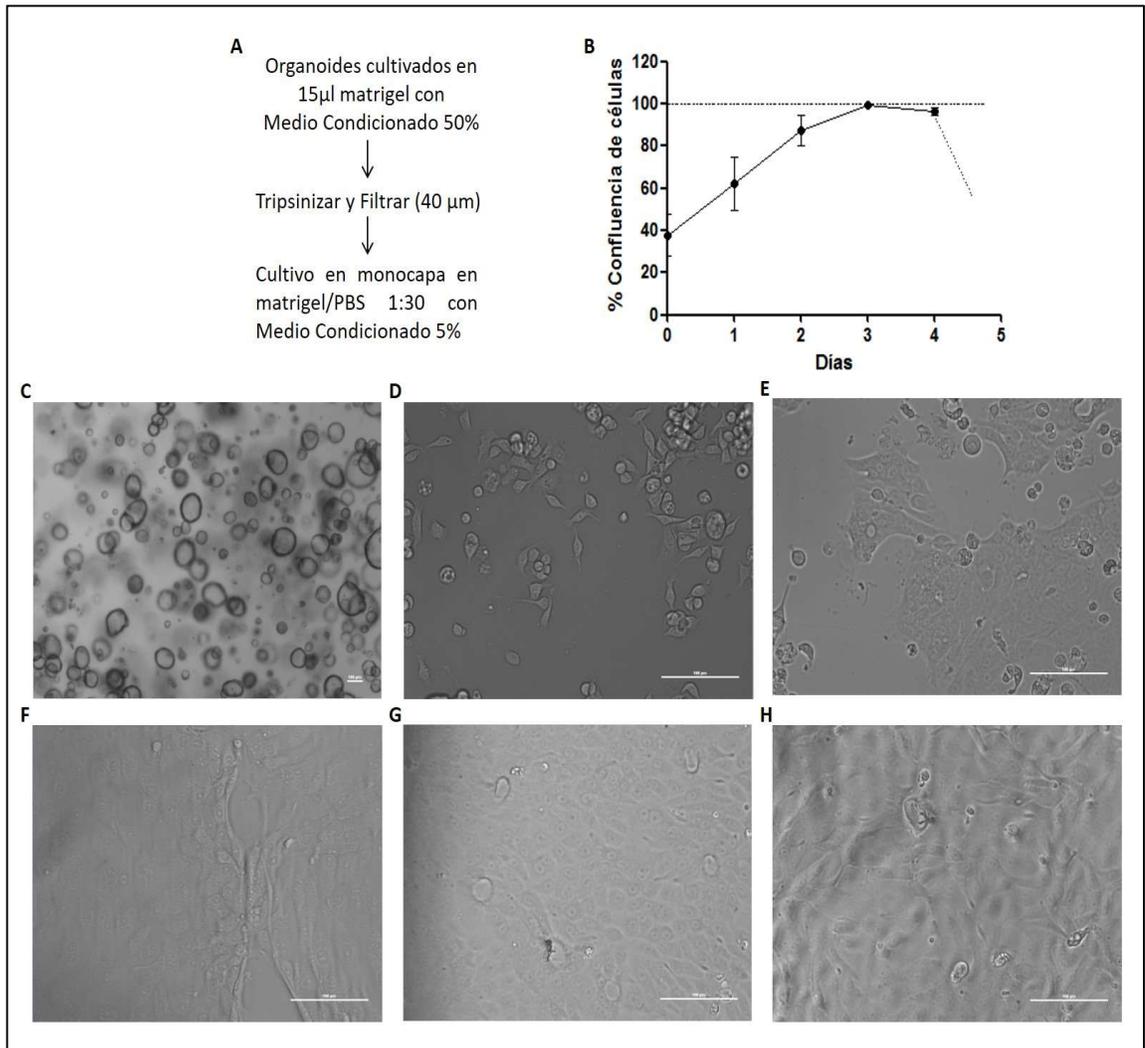


Figura 15: Curso temporal de la formación de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas desde stem cells de organoides. A) Esquema de generación de monocapa desde organoides. B) Porcentaje de confluencia diaria del cultivo en monocapa. C) Cultivo de organoides gástricos del cual se generó la monocapa de células epiteliales (aumento 4x). Monocapa de células epiteliales gástricas generada de organoides, D) al día 0 luego de 4 horas post siembra. Cultivo de células epiteliales en monocapa E) al día 1 post siembra, F) al día 2 post siembra, G) al día 3 post siembra y H) al día 4 post siembra. De C - H microscopías con aumento 20X.

Caracterización de genes estructurales en tejido, cultivo de organoides y monocapa de células epiteliales derivadas de organoides

Para determinar diferencias en los marcadores de diferenciación de células epiteliales, se evaluaron cambios en la expresión de genes de las biopsias gástricas, organoides y cultivo primario de monocapa de células epiteliales diferenciadas de las stem cells de organoides proveniente del mismo individuo (**Figura 16**). Al comparar los niveles de expresión de LGR5, un marcador de células tipo stem, se obtuvo altos niveles en el cultivo de organoides en comparación a las biopsias del cual proviene y a la monocapa generada a partir de este cultivo, lo que indicaría que los organoides poseen alta abundancia de células tipo stem (**Figura 16A**). En biopsias gástricas, los niveles de expresión de GAST (gastrina) son superiores en comparación a los bajos niveles expresados por organoides y las monocapas (**Figura 16B**). Al evaluar la expresión de MUC5AC (**Figura 16C**), encontramos que estos eran mayores en las monocapas de células epiteliales en comparación a los organoides gástricos y que eran similares a los encontrados a las biopsias gástricas. Finalmente, se encontró que en el cultivo de monocapas, la expresión tanto de CDH1 (**Figura 16D**), marcador de células epiteliales (E-cadherina) y el gen que codifica para una de las proteínas formadoras de uniones estrechas ZO-1 (**Figura 16E**), los niveles de expresión son altos en comparación a la expresión en organoides y biopsias gástricas, esto probablemente se debe a las fuertes interacciones célula-célula que posee la monocapa de las células epiteliales.

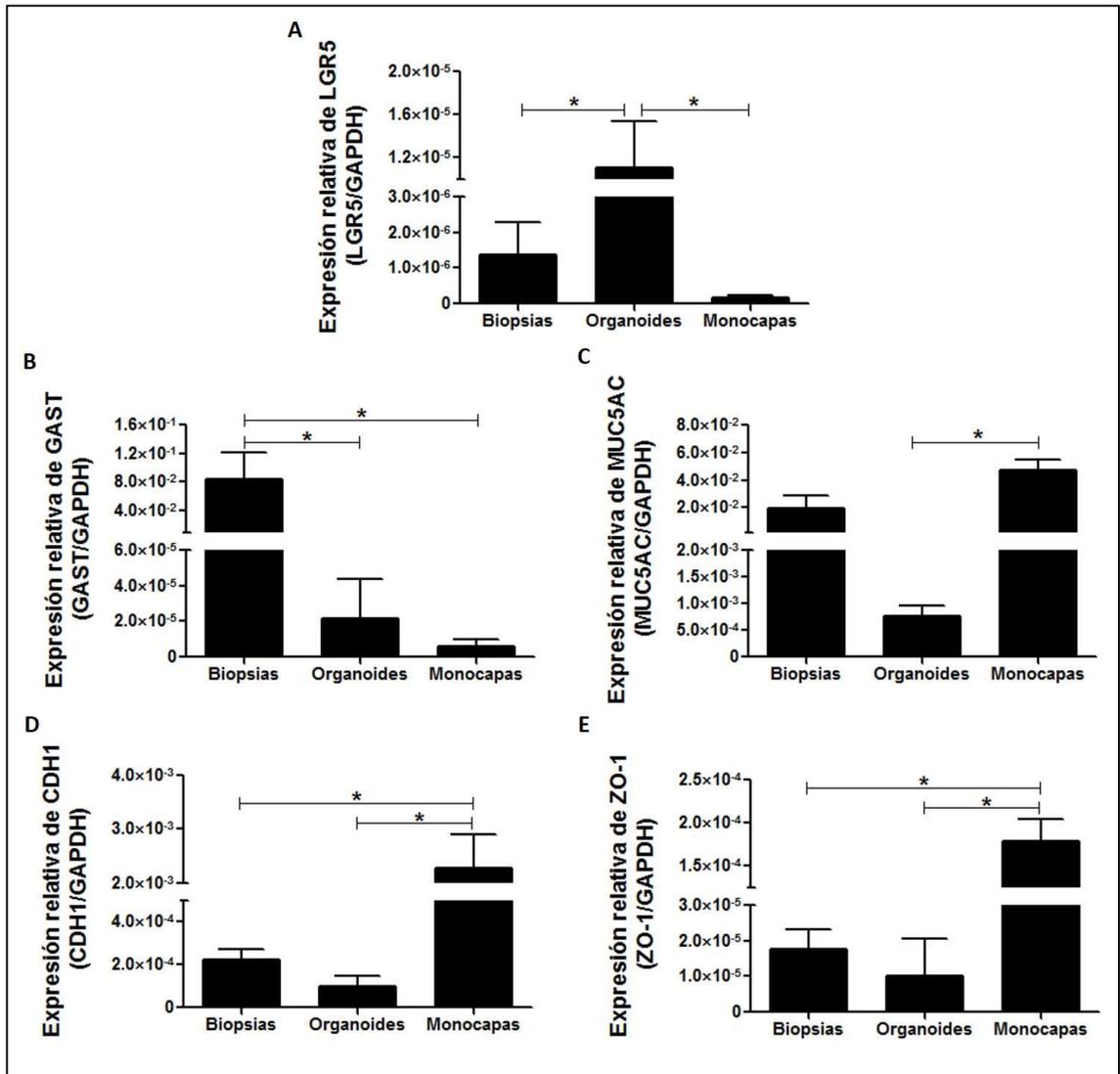


Figura 16: Comparación de la expresión de genes estructurales en tejido, organoides y monocapa de células epiteliales diferenciadas de organoides gástrico. Niveles de expresión de mRNA de A) LGR5, B) GAST, C) MUC5AC, D) CDH1 y E) ZO-1, (n=4).

De este modo, el cultivo de organoides está formado por un cultivo de células tipo stem no diferenciado, el cual al momento de realizar el cultivo en monocapa a partir del cultivo de organoides, se va diferenciando y va perdiendo la expresión de los marcadores de célula tipo stem LGR5 (Figura 17A) y ST6Gal-1 (Figura 17B, C).

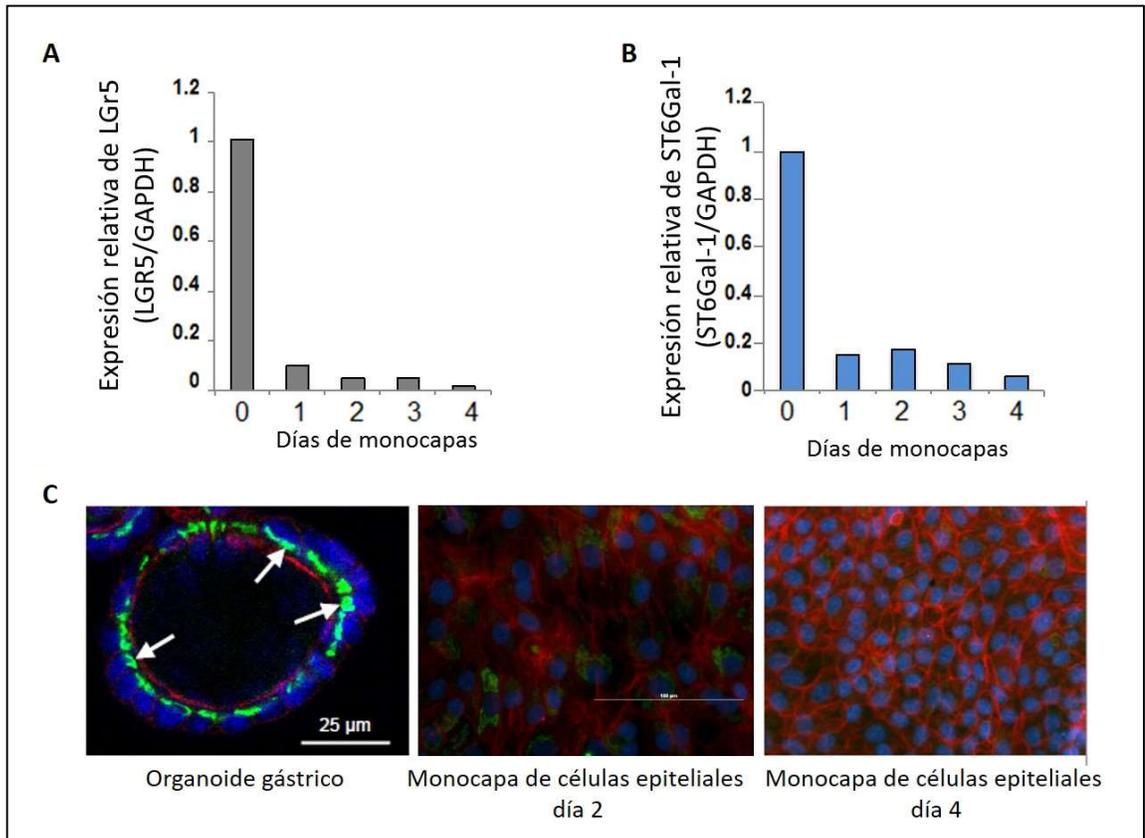


Figura 17: Diferenciación de organoides a células epiteliales en el cultivo de monocapa. A) Expresión de mRNA de LGR5 y B) ST6Gal-1 desde el día 1 al 4 del cultivo en monocapa y comparado con el cultivo de organoides del cual proviene el cultivo en monocapa. C) Presencia de la proteína ST6Gal-1(en verde) en organoides y monocapa de células epiteliales al día 2 y 4 de cultivo. En rojo marcador de citoesqueleto faloidina y en azul marcador de núcleo DAPI.

Expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata en tejido, organoides y monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides

Para evaluar la expresión en biopsias, organoides y monocapas de células epiteliales diferenciados de stem cells de organoides, de genes involucrados en la respuesta inmune

innata, se evaluó la expresión de los receptores TLRs (**Figura 18**) y de β -defensinas (**Figura 19**) en los cultivos provenientes de la misma biopsia gástrica.

En cuanto a los receptores, se encontró que los niveles de expresión del TLR-4 (**Figura 18B**) eran mayores en monocapas en comparación los niveles de expresión en biopsias y en el cultivo de organoides. Mientras que la expresión de los TLR-2 (**Figura 18A**) y TLR-5 (**Figura 18C**) eran similares entre los tres tipos de muestras. Sin embargo, al evaluar los niveles de expresión del TLR-9 (**Figura 18D**) estos sólo se pudieron detectar en el cultivo de monocapa.

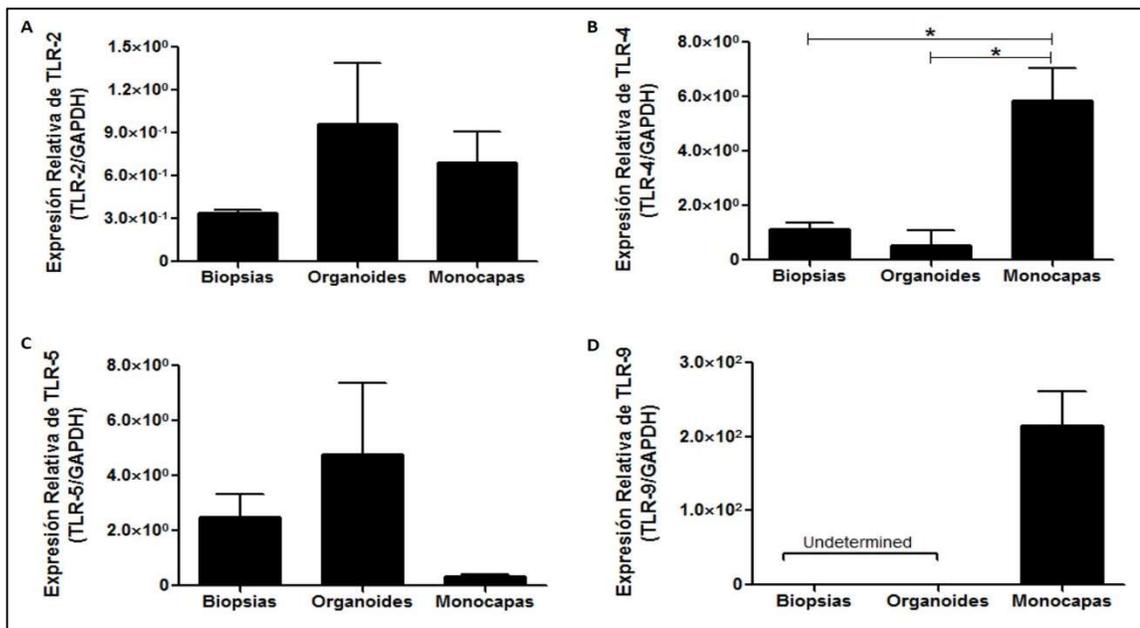


Figura 18: Expresión de TLRs en tejido, cultivo de organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de organoides gástrico. Expresión de mRNA de A) TLR-2, B) TLR-4, C) TLR-5 y D) TLR-9.

Al evaluar los niveles de expresión de las β -defensinas, encontramos que la hBD-1 (**Figura 19A**) la cual está reportado que se expresa de manera constitutiva en biopsias gástricas, se encuentra en altos niveles sólo en las biopsias, mientras que al evaluar

hBD-2 (**Figura 19B**), la cual es una β -defensina inducible, se encuentra expresada de manera similar en los tres tipos de muestras.

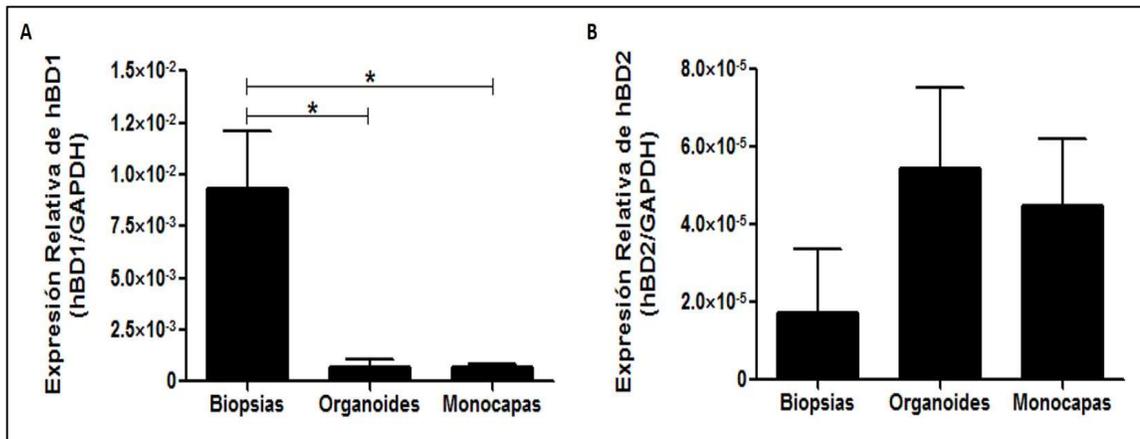


Figura 19: Expresión de β -defensinas en tejido, cultivo de organoides y monocapas de células epiteliales diferenciadas de organoides gástrico. Expresión de mRNA de A) hBD-1 y B) hBD-2.

III. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la viabilidad celular en los modelos *in vitro* de células epiteliales gástricas

Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad celular en la línea celular AGS

Se evaluó el efecto del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la viabilidad celular de las células AGS y se obtuvo una disminución de la viabilidad de un 50% y 38,7%, respectivamente con respecto a las células AGS sin tratar. Del mismo modo, el tratamiento con *H. pylori*, indujo una disminución en la viabilidad celular de un 25,7% con respecto a las células AGS sin tratar. (**Figura 20**).

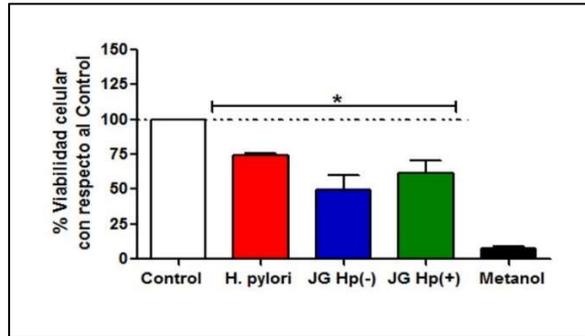


Figura 20: Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad de células AGS. Células tratadas con jugo gástrico proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) en azul) y jugo gástrico proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)) en verde). Controles: células AGS sin tratar (barra blanca); control con *H. pylori* (barra roja) y control de muerte celular, células AGS tratadas con metanol durante 5 minutos (barra negra).

Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad celular en el cultivo primario de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides

El ensayo de viabilidad en las monocapas de células epiteliales gástricas demostró que los jugos gástricos no ejercen efecto sobre la viabilidad celular con respecto al control de monocapa de células epiteliales sin tratar, lo cual ocurre de manera independiente del estatus de infección de los jugos gástricos (Figura 21).

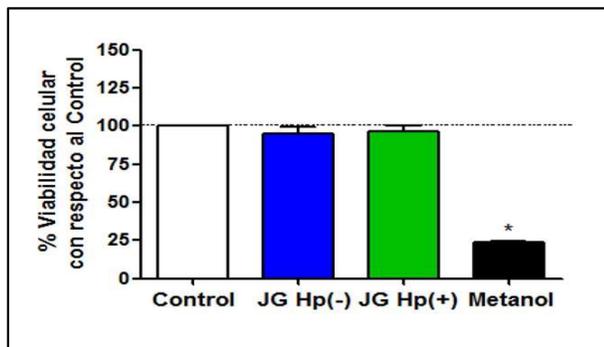


Figura 21: Efecto del jugo gástrico sobre la viabilidad celular en el cultivo primario de células epiteliales diferenciadas de organoides. Monocapa de células epiteliales gástricas tratadas con jugo

gástrico proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) en azul) y jugo gástrico proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+) en verde). Control, monocapa de células epiteliales sin tratar (barra blanca). Control de muerte celular, monocapa de células epiteliales tratadas con metanol durante 5 minutos (barra negra).

Una vez que confirmamos en las muestras utilizadas en esta tesis, que la composición de la microbiota del jugo gástrico es diferencial entre las muestras de jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* (**I.** Caracterización de los pacientes y las muestras de jugo gástrico), caracterizamos el modelo de monocapas de células epiteliales diferenciadas de organoides (**II.** Descripción y caracterización del modelo de monocapas de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides gástricos) y luego de determinar que las muestras de jugo gástrico afectan diferencialmente la viabilidad de las células de nuestros modelos de estudios (**III.** Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la viabilidad celular en los modelos *in vitro* de células epiteliales gástricas), se procedió, en la siguiente sección (**IV.** Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la integridad de la barrera y función de las células epiteliales gástricas), a evaluar el efecto de la microbiota del jugo gástrico en los modelos *in vitro* propuestos, de acuerdo a los objetivos específicos planteados que llevarán a responder nuestra hipótesis.

IV. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la integridad de la barrera y función de las células epiteliales gástricas

Se evaluó el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la integridad de la barrera epitelial a través de la expresión y distribución de las proteínas formadoras de uniones estrechas y sobre la función de éstas evaluando la expresión de los receptores TLRs y

secreción de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras. Esto fue realizado utilizando el modelo clásico de estudio de respuesta inmune innata epitelial, la línea celular AGS y utilizando el nuevo modelo de monocapa de células epiteliales derivada de organoides, el cual posee mayor proximidad al estado fisiológico.

1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la expresión de receptores de reconocimiento en un modelo *in vitro* de células epiteliales gástricas

Tanto en el modelo de células AGS como en el modelo de monocapa de células epiteliales, se evaluó la expresión de los receptores TLRs, principalmente los receptores TLR-2, TLR-4, TLR-5 y TLR-9.

1.1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los receptores TLRs en la línea celular AGS

Células AGS fueron estimuladas con jugo gástrico y su respectivo filtrado proveniente de niños infectados y no infectados con *H. pylori*. Se evaluó la expresión de mRNA de los receptores TLRs (**Figura 22**) y se observó que el jugo gástrico y el jugo gástrico filtrado de niños infectados con *H. pylori* indujeron un aumento en la expresión de TLR2 (**Figura 22A**) en comparación a las células sin tratar. Como control, se utilizó la infección con *H. pylori*, el cual mostró altos niveles de inducción de los TLR2 (**Figura 22A**), TLR-4 (**Figura 22B**) y TLR-9 (**Figura 22D**). Tanto el jugo gástrico como su filtrado proveniente de niños no infectados e infectados con *H. pylori*, indujeron niveles similares de TLR-4 (**Figura 22B**), TLR-5 (**Figura 22C**) y TLR-9 (**Figura 22D**) en comparación al control de células AGS sin tratar.

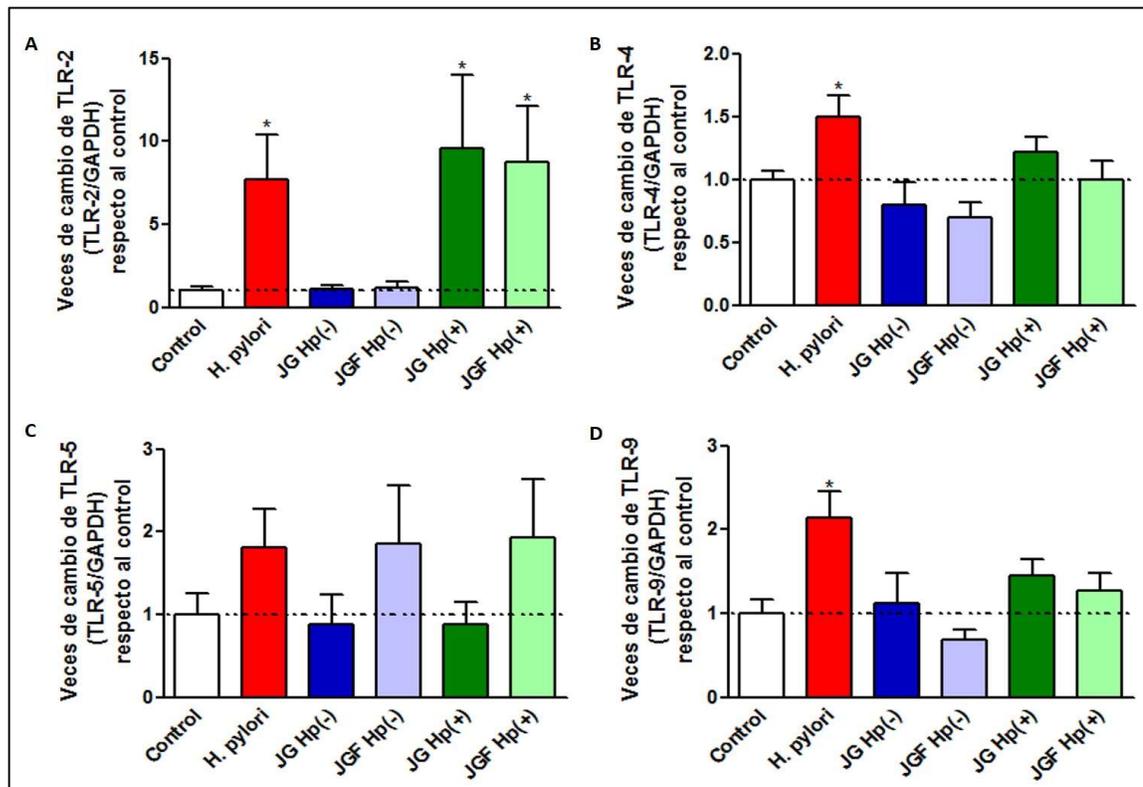


Figura 22: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de los receptores TLRs en células AGS. Células tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-) respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)) y JGF Hp(+)) respectivamente). A) Expresión de mRNA de TLR-2, B) TLR-4, C) TLR-5 y D) TLR-9 (n=4 por grupo). * p<0,05 con respecto al control de células sin tratar.

1.2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los receptores TLRs en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides

Dado que en el modelo de AGS, la microbiota ejerce un efecto sobre la expresión de mRNA del TLR2 y TLR4, en el modelo de monocapa de células epiteliales derivada de organoides, se evaluó el efecto de la microbiota del jugo gástrico y jugo filtrado

proveniente de niños infectados y no infectados con *H. pylori*, sobre la expresión de mRNA del TLR2 (**Figura 23A**) y TLR4 (**Figura 23B**). Se encontró que ninguno de los tratamientos genera diferencias significativas en los niveles de expresión de estos receptores. Sin embargo, se aprecia que la microbiota presente en el jugo gástrico de niños infectados y no infectados tiende a inducir la expresión de TLR2, la cual disminuye al estimular las monocapas con los jugos filtrados de ambos grupos.

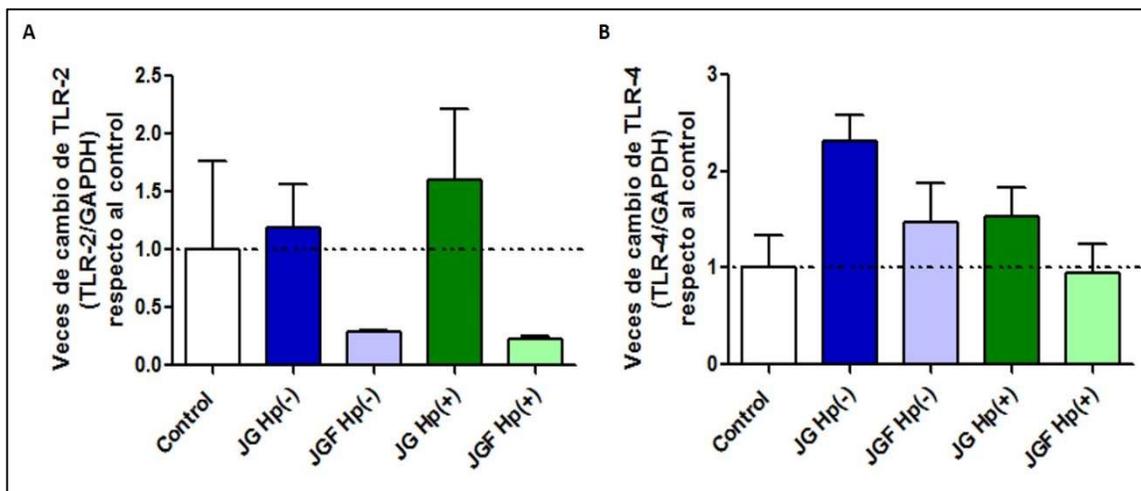


Figura 23: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de los receptores TLRs en el cultivo en monocapa de células epiteliales derivadas de organoides. Monocapa de células epiteliales gástricas tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-), respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)) y JGF Hp(+), respectivamente). Expresión de mRNA de A) TLR-2 y B) TLR-4 (n=3 por grupo).

2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la expresión de los mediadores inflamatorios y moléculas efectoras en un modelo *in vitro* de células epiteliales gástricas

En los modelos de células AGS y cultivo primario de monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides, se evaluó el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras β -defensinas.

2.1 Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los mediadores inflamatorios en un modelo de línea celular AGS

Se evaluó el efecto del jugo gástrico y del jugo filtrado proveniente de niños infectados y no infectado con *H. pylori*, en relación a los niveles de expresión de mRNA y de la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-8, TNF- α (**Figura 24**) en las células AGS. Se observó que los niveles de secreción de IL-6 fueron similares entre los tratamientos y con respecto al control (**Figura 24B**). Sin embargo, no fue posible detectar la expresión de mRNA de IL-6 por RT- QPCR real time (**Figura 24A**).

Se determinó que el jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* aumenta la expresión de mRNA de IL-8 (**Figura 24C**) en comparación a las células sin tratar. Al evaluar la secreción de IL-8 se encontró que el jugo gástrico tanto de niños no infectados como infectados induce un aumento en la secreción de IL-8, lo cual es dependiente de la presencia del componente bacteriano (**Figura 24D**). En cuanto al control con *H. pylori*, tal como se encuentra descrito, produce un aumento tanto en la expresión de mRNA como de secreción de IL-8 (**Figura 24C y Figura 24D**).

Adicionalmente, al evaluar los niveles de expresión de mRNA de TNF- α (**Figura 24E**), no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos. En cuanto a los niveles de secreción (**Figura 24F**), no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

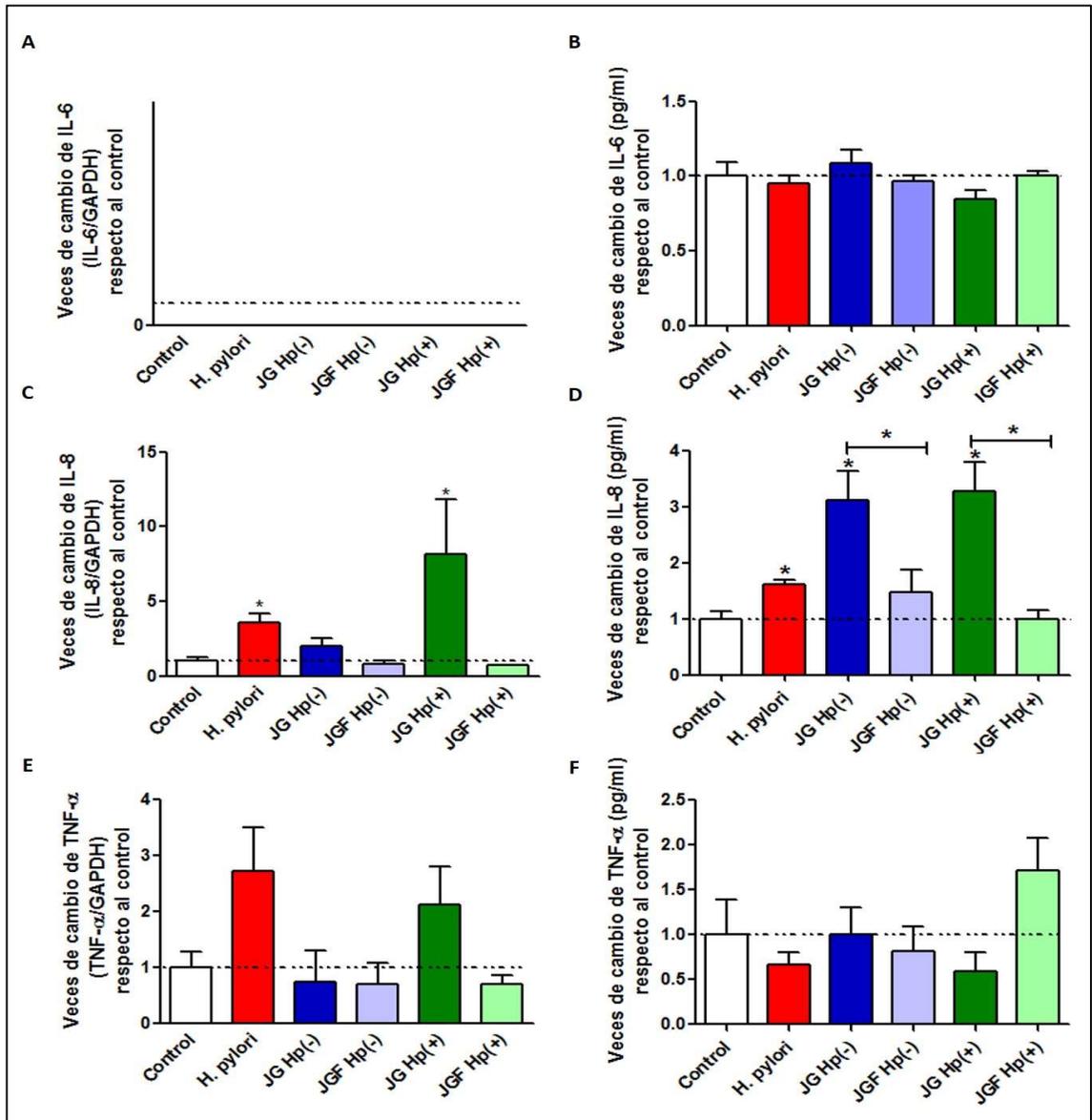


Figura 24: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en células AGS. Células tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-) respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+) y JGF Hp(+)) respectivamente). Niveles de expresión de mRNA de A) IL-6, C) IL-8 y E) TNF- α . Niveles de secreción de B) IL-6, D) IL-8 y F) TNF- α (n=4 por grupo). * p<0,05 con respecto al control de células sin tratar.

2.2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de los mediadores inflamatorios en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides

En el modelo de monocapa de células epiteliales se evaluó el efecto del jugo gástrico y de su respectivo filtrado sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (**Figura 25**) y se determinó que los niveles de expresión de mRNA de IL-6 (**Figura 25A**) como los niveles de secreción de IL-6 (**Figura 25B**) son similares entre los distintos tratamientos. Sin embargo, aunque no existieron diferencias significativas, se observó que el componente bacteriano tanto del jugo gástrico de niños no infectados como el de los niños infectados con *H. pylori*, tienden a inducir levemente los niveles de expresión de IL-6, ya que, al remover las bacterias en su filtrado, dicho efecto se anula (**Figura 25A**). En cuanto a los niveles de expresión de IL-8 (**Figura 25C**) en las monocapas de células epiteliales, se observó que el jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori* indujo un aumento en su expresión de manera dependiente de la presencia del componente bacteriano. Sin embargo, pese a que el jugo gástrico de niños no infectados por la bacteria ejerció niveles similares a la monocapa control sin tratar, se pudo observar que los niveles de expresión de IL-8 fueron mayores que los ejercidos por efecto de su correspondiente jugo filtrado, por lo que una vez más el efecto apreciado sería causado por la presencia del componente bacteriano. En cuanto a la secreción (**Figura 25D**) de esta citoquina, se pudo apreciar claramente que tanto el jugo gástrico de niños infectados, como el de los no infectados con *H. pylori*, ejercieron un aumento en la secreción de IL-8 y este efecto estaría mediado por el componente bacteriano del jugo gástrico, ya que al eliminarlo por medio de la filtración, los niveles de secreción fueron similares a la monocapa de células epiteliales control sin tratar. Además, también sería un evento dependiente del estatus de infección de *H. pylori*, ya que los niños no infectados indujeron una mayor secreción de IL-8 que los niños infectados con *H. pylori* (**Figura 25D**).

Finalmente, en cuanto la citoquina TNF- α , nuevamente encontramos que el jugo gástrico de los niños infectados con *H. pylori*, indujo un aumento en la expresión de TNF- α , de manera dependiente del componente bacteriano y dependiente del estatus de infección de *H. pylori*, pues los niños infectados con *H. pylori* indujeron una mayor expresión que los niños no infectados con la bacteria (**Figura 25E**). En cuanto a los niveles de secreción de la citoquina, tenemos que tanto el jugo gástrico de niños infectados como los no infectados con *H. pylori* indujeron altos niveles de secreción de TNF- α en comparación a la monocapa de células epiteliales sin tratar, este efecto fue dependiente de la presencia del componente bacteriano, ya que, al remover las bacterias en el jugo filtrado, los niveles de secreción de la citoquina fueron similares al control (**Figura 25F**).

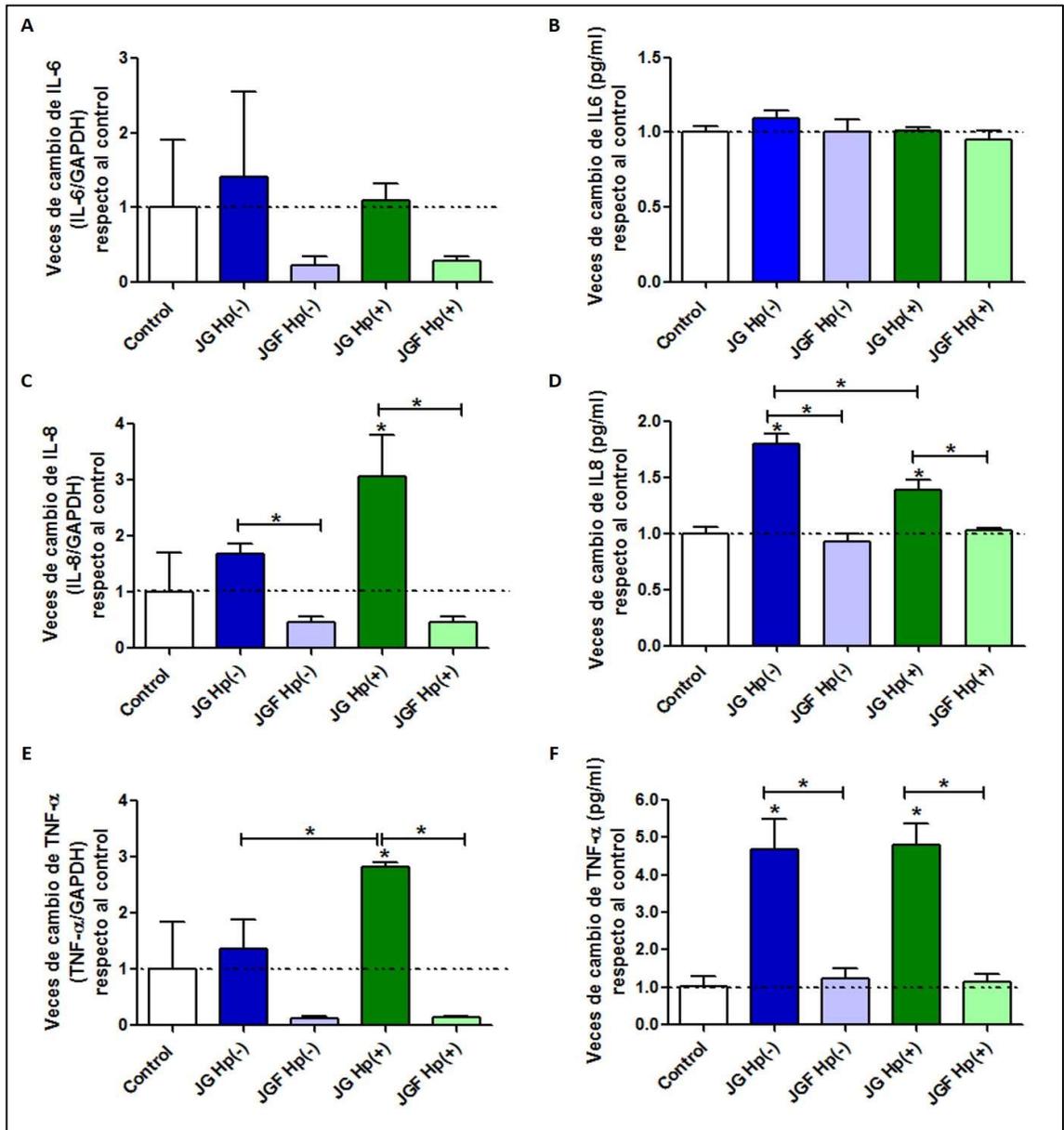


Figura 25: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en cultivo en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides. Monocapa de células epiteliales gástricas tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-), respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)) y JGF Hp(+), respectivamente). Niveles de expresión de mRNA de A) IL-6, C) IL-8 y E) TNF- α . Niveles de

secreción de B) IL-6, D) IL-8 y F) TNF- α (n=3 por grupo). * p<0,05 con respecto al control de células sin tratar.

2.3. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de β -defensinas en un modelo de línea celular AGS

Al evaluar la expresión de β -defensinas (**Figura 26**), se encontró que el jugo gástrico y el jugo gástrico filtrado de niños no infectados con *H. pylori*, indujeron una disminución de la expresión de hBD-1 en comparación a las células AGS sin tratar (**Figura 26A**). En cuanto a los niveles de expresión de las hBD-2 (**Figura 26B**), hBD-3 (**Figura 26C**) y hBD-4 (**Figura 26D**), fueron similares entre los tratamientos y en comparación con el control.

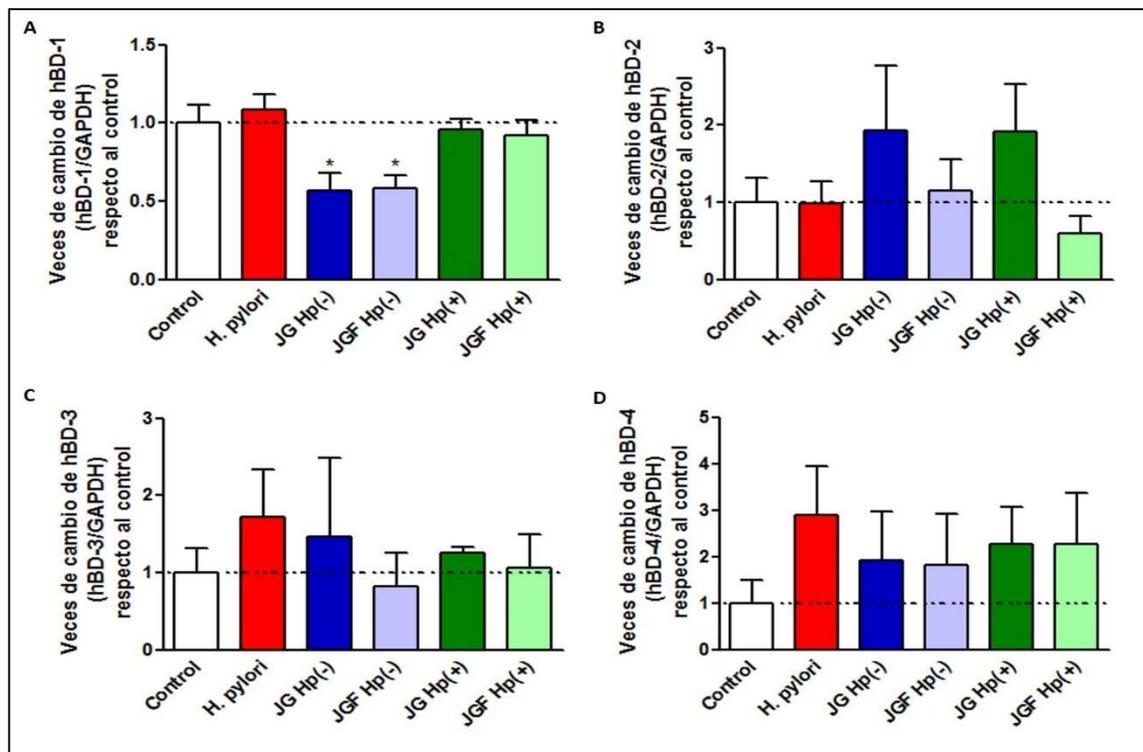


Figura 26: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las β -defensinas en células AGS. Células tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado

proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-) respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)) y JGF Hp(+)) respectivamente). Expresión de mRNA de A) hBD-1, B) hBD-2, C) hBD-3 y D) hBD-4 (n=4 por grupo). * p<0,05 con respecto al control de células sin tratar.

2.4. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de β -defensinas en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides

Evaluamos en el cultivo primario de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides, los niveles de expresión de hBD-1 (Figura 27A) y hBD-2 (Figura 27B). Es así como podemos observar que, a diferencia del modelo anterior, el jugo gástrico y el filtrado de niños no infectados indujeron niveles similares de expresión de hBD-1 en comparación a la monocapa sin tratar. Por otro lado, al evaluar hBD-2, se pudo observar que tanto el jugo gástrico de niños infectados como no infectados con *H. pylori*, indujeron altos niveles de expresión de esta β -defensina en comparación a la monocapa sin tratar, siendo este efecto dependiente de la presencia del componente bacteriano.

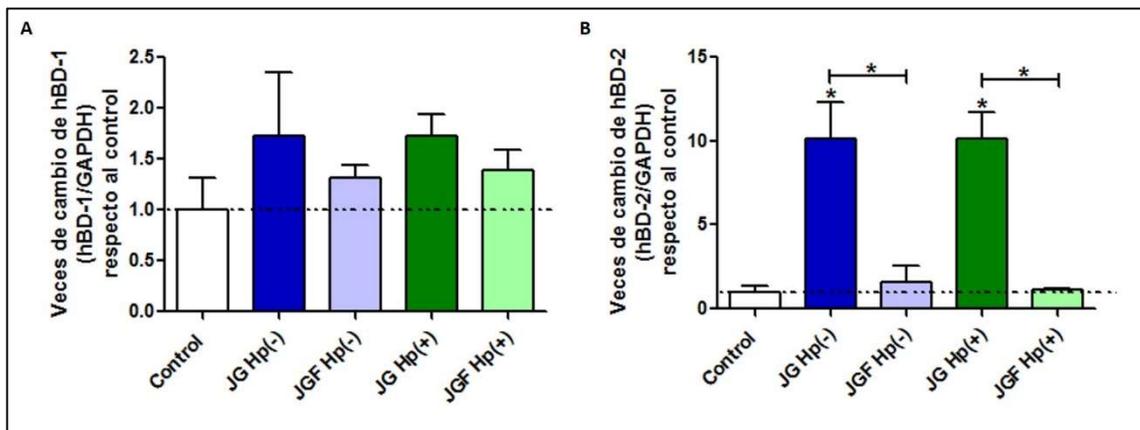


Figura 27: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las β -defensinas en el cultivo en monocapa de células epiteliales diferenciadas de organoides. Monocapa de células epiteliales gástricas tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-), respectivamente) y jugo

gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+) y JGF Hp(+), respectivamente). Expresión de mRNA de A) hBD-1 y B) hBD-2 (n=3 por grupo). * p<0,05 con respecto al control de células sin tratar.

3. Efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori* sobre la expresión de las proteínas formadoras de uniones estrechas, en un modelo *in vitro* de células epiteliales gástricas

Otro de los parámetros utilizados para evaluar el efecto de la microbiota con respecto a su interacción con las células epiteliales gástricas, fue evaluar la integridad de la barrera de las células epiteliales, desde el punto de vista de la expresión de las proteínas formadoras de uniones estrechas como también evaluando su presencia y distribución en ésta.

3.1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de ZO-1, Claudina-2 y Claudina-4, en un modelo de línea celular AGS

Al analizar la expresión de mRNA de las proteínas formadoras de uniones estrechas (**Figura 28**), se observó que el jugo gástrico de niños no infectados, indujo una disminución de los niveles de expresión de claudina-2 (Cldn-2) con respecto a las células AGS sin tratar (**Figura 28A**). Al evaluar los niveles de expresión de claudina-4 (Cldn-4) no se encontró diferencias significativas con respecto al control, sin embargo el jugo gástrico de niños infectados por *H. pylori* indujo una mayor expresión de Cldn-4 al comprar los niveles de expresión inducidos por su jugo filtrado (**Figura 28B**). En cuanto a la proteína de andamiaje ZO-1, los niveles de expresión del mensajero fueron similares entre los tratamientos (**Figura 28C**).

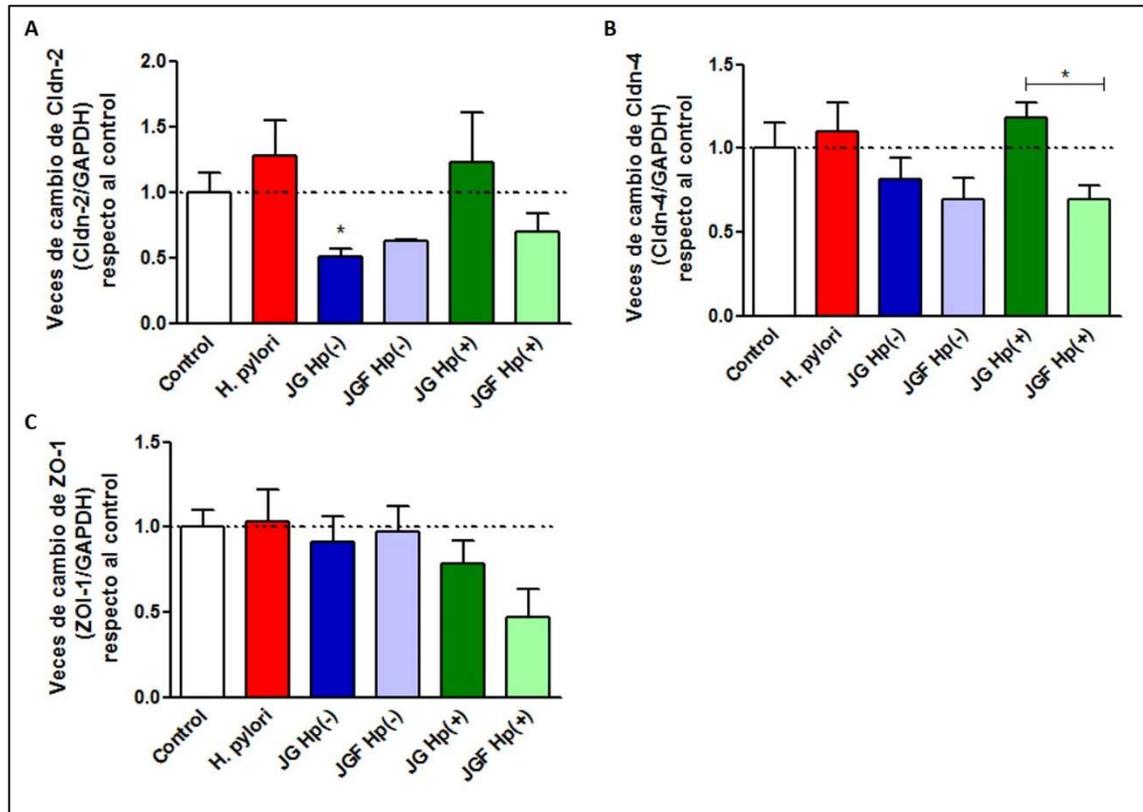


Figura 28: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las proteínas formadoras de uniones estrechas en células AGS. Células tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-) respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)) y JGF Hp(+)) respectivamente). Expresión de A) Claudina-2, B) Claudina-4 y C) ZO-1 (n=4 por grupo). * p<0,05 con respecto al control de células sin tratar.

Se evaluó por inmunofluorescencia, la presencia de las proteínas formadoras de uniones estrechas de interés (**Figura 29**). En cuanto a la distribución de las proteínas claudinas, se pudo observar que las proteínas Cldn-2 presentaron un patrón de distribución poco definido en este tipo celular, mientras que Cldn-4, mostró un patrón un poco más claro y algunas uniones entre célula-célula (**Figura 29A**). Al visualizar la inmuno-tinción de ZO-1 y E-cadherina como marcador de célula epitelial (**Figura 29B**), se pudo observar que ZO-1 se encuentra presente, pero sólo se pueden apreciar algunas uniones efectivas

entre célula-célula (aumentadas en el recuadro blanco e indicadas con flecha blanca en la **Figura 29B**). Estos resultados indican que las células AGS no son un buen modelo para evaluar la distribución de las proteínas que forman las uniones estrechas, pues pese a que las proteínas están presentes, las uniones estrechas no son efectivas, por tal razón no se evaluó la distribución proteica de Cldn-2, Cldn-4 y ZO-1 en células AGS estimuladas con los jugos gástricos y jugos gástricos filtrados.

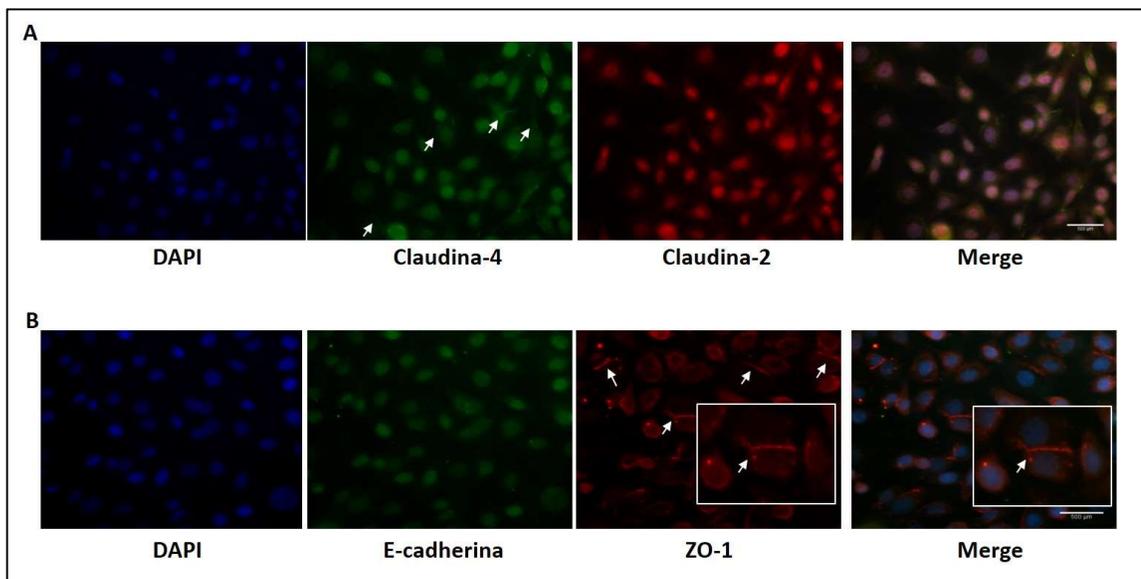


Figura 29: Distribución de las proteínas formadoras de uniones estrechas en células AGS. A) Células AGS con anticuerpo que detectan Cldn-4 (en verde) y Cldn-2 (en rojo). B) Células AGS con anticuerpo que detectan E-cadherina (en verde) y ZO-1 (en rojo). En A y B, inmunotinción de DAPI como marcador de núcleo (azul).

3.2. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la expresión de ZO-1, Claudina-2 y Claudina-4, en el modelo de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides

Monocapas de células epiteliales fueron estimuladas con jugo gástrico y jugo filtrado proveniente de niños infectados y no infectados con *H. pylori*. En éstas se determinó los niveles de expresión de mRNA de las proteínas formadoras de uniones estrechas Cldn-2, Cldn-4 y ZO-1 (**Figura 30**) y se encontró que los niveles de expresión de los tratamientos fueron similares con respecto a la monocapa de células epiteliales sin tratar. Sin embargo, pese a que no es estadísticamente significativo, el jugo gástrico de niños no infectados con *H. pylori* tendió a aumentar la expresión de Cldn-2 (**Figura 30A**), siendo esta inducción significativamente mayor que el efecto inducido por su respectivo jugo filtrado. Algo similar se pudo observar al evaluar la expresión de Cldn-4 (**Figura 30B**), en donde el jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*, indujo mayores niveles de expresión que su respectivo jugo filtrado. Para el caso de ZO-1, sólo se pudo apreciar un leve aumento de expresión al tratar las monocapas de células epiteliales con el jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*, pero este aumento no fue estadísticamente significativo (**Figura 30C**).

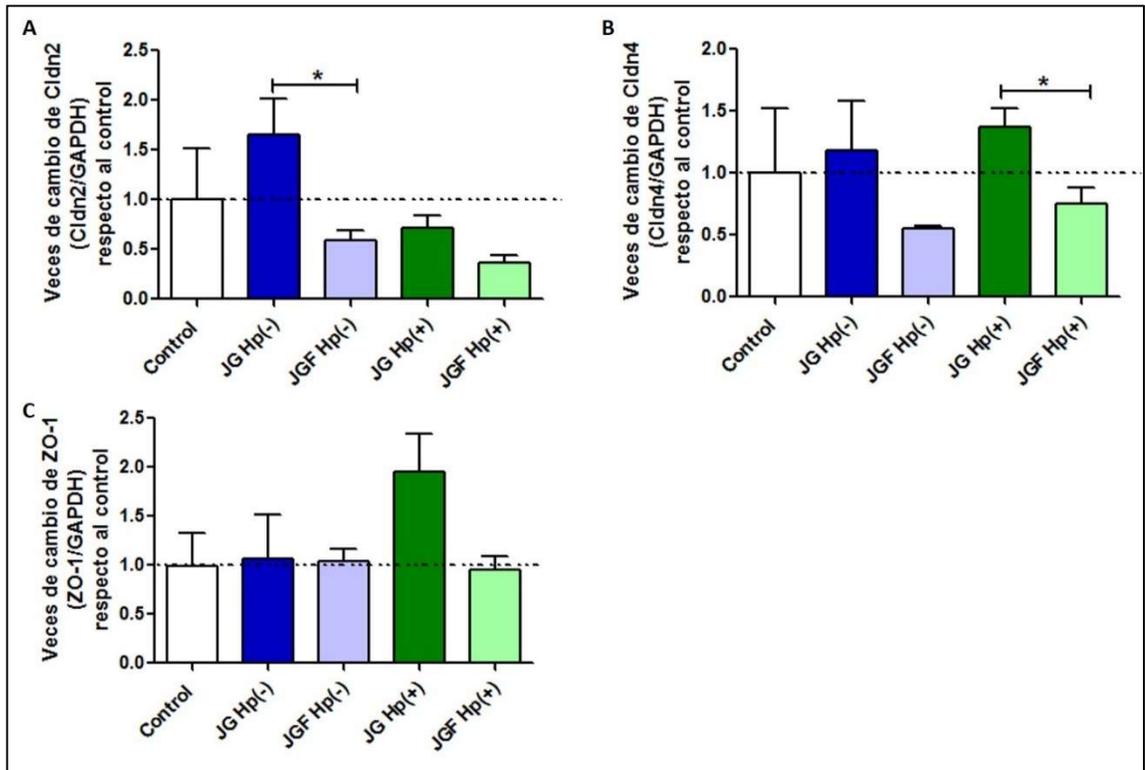


Figura 30: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre los niveles de expresión de mRNA de las proteínas formadoras de uniones estrechas en un cultivo de monocapa de células epiteliales diferenciadas de stem cells de organoides. Monocapa de células epiteliales gástricas tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-), respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+) y JGF Hp(+), respectivamente). Expresión de mRNA de A) Claudina-2, B) Claudina-4 y C) ZO-1 (n=3 por grupo).

Mediante inmunofluorescencia, se evaluó la distribución de las proteínas que forman parte de las uniones estrechas de la barrera de células epiteliales (**Figura 31**). El patrón de distribución de Cldn-2 (**Figura 31A**) fue bastante difuso, mientras que la distribución de Cldn-4 (**Figura 31A**) mostró un patrón un poco más claro y algunas uniones entre célula-célula. Al evaluar la distribución de ZO-1 y E-cadherina (**Figura 31B**) se observa el claro patrón de enrejado definido en la literatura (109), por tal motivo sólo se evaluó el efecto del jugo gástrico en los patrones de distribución de ZO-1.

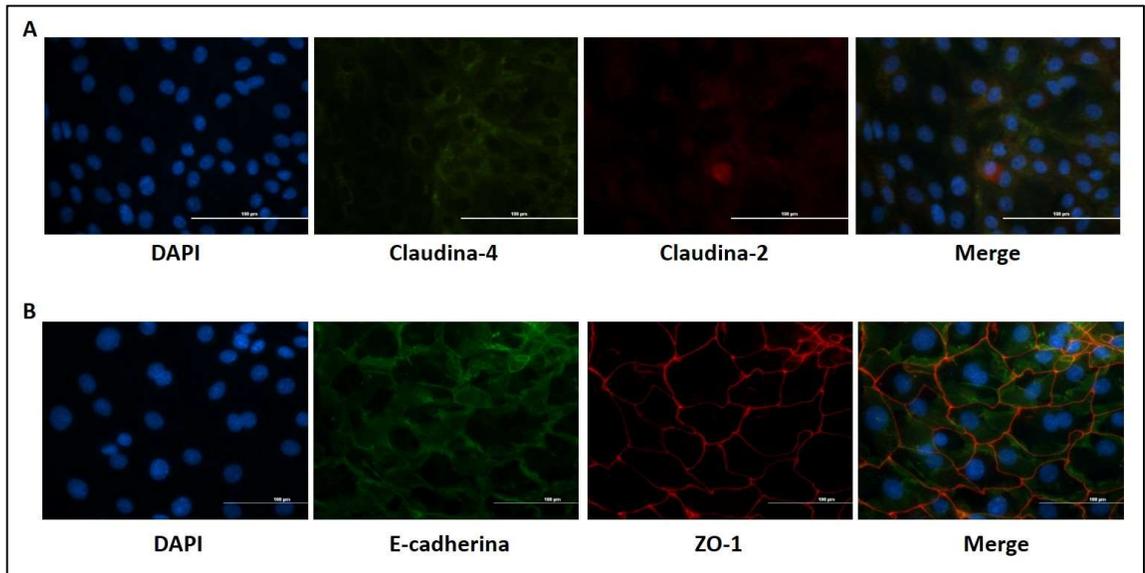


Figura 31: Distribución de las proteínas formadoras de uniones estrechas en cultivo de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides. A) Inmuno-tinción de Cldn-4 (en verde) y Cldn-2 (en rojo) y B) Inmuno-tinción de E-cadherina (en verde) y ZO-1 (en rojo). En A y B, DAPI como marcador de núcleo (azul).

3.3. Distribución de ZO-1 en células epiteliales gástricas estimuladas con el jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori*.

La estructura de la barrera de células epiteliales fue evaluada por inmunofluorescencia de la proteína de andamiaje formadora de uniones estrechas ZO-1 y E-cadherina como identificador de célula epitelial (**Figura 32**). Se comparó la inmuno-tinción de las monocapas estimuladas con jugo gástrico y jugo filtrado de niños no infectados (**Figura 32C** y **Figura 32D** respectivamente) y las monocapas estimuladas con jugo gástrico y jugo filtrado de niños infectados con *H. pylori* (**Figura 32E** y **Figura 32F** respectivamente), con respecto a las monocapa de células epiteliales sin tratar, como control (**Figura 32B**), tal como lo indica el esquema (**Figura 32A**).

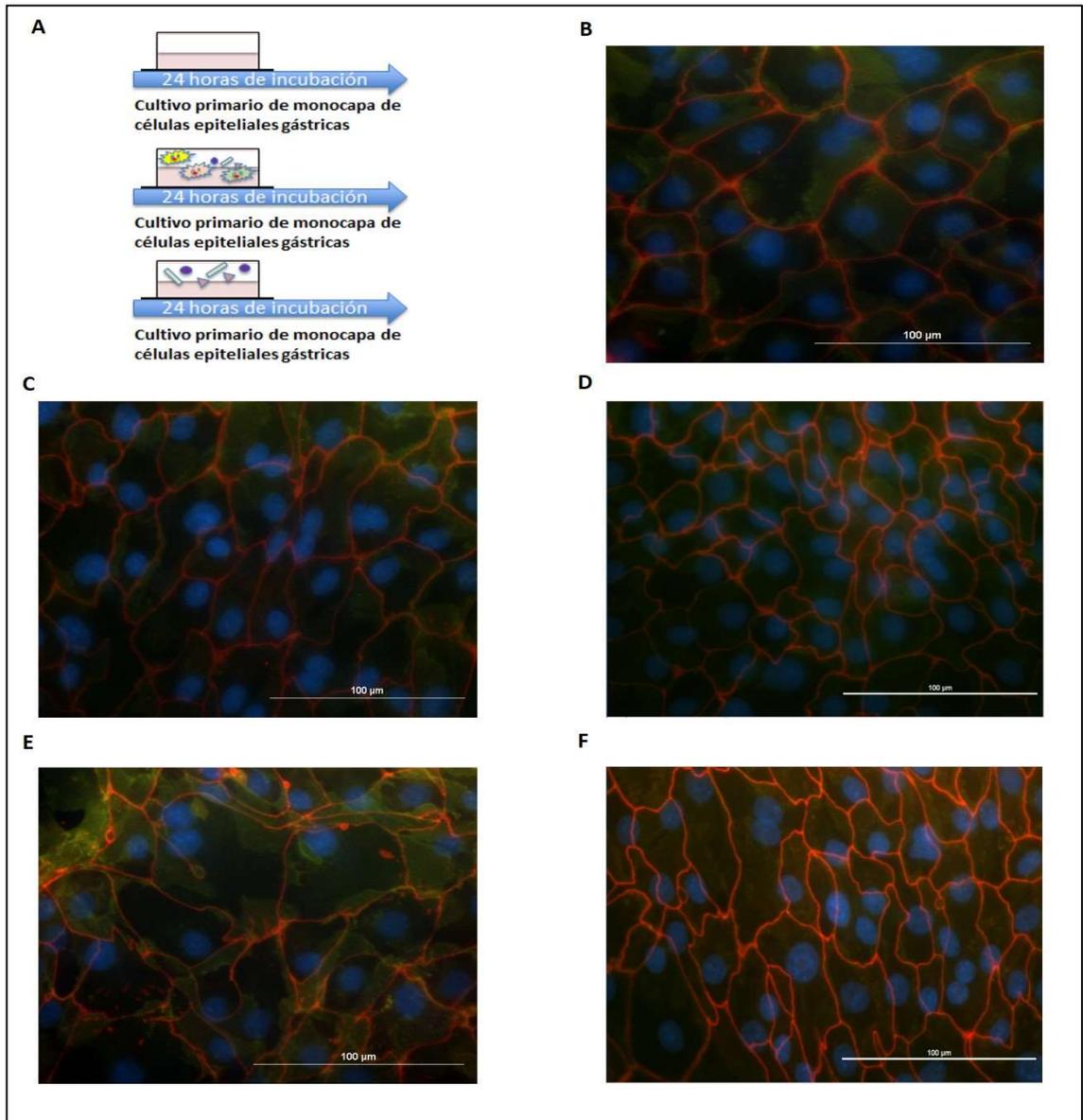


Figura 32: Efecto del jugo gástrico y jugo gástrico filtrado sobre la distribución de ZO-1. A) Esquema de los tratamientos y tiempo de incubación a utilizar en el experimento. B) Monocapa de células epiteliales sin tratar, control. Monocapa de células epiteliales estimuladas con C) jugo gástrico y D) jugo filtrado de niños no infectados, E) jugo gástrico y F) jugo filtrado de niños infectados con *H. pylori*. Imagen representativa de un grupo de 30 fotografías por grupo. Marca de ZO-1 (en rojo), E-cadherina (en verde) y marcador de núcleo DAPI (azul). Aumento 20x.

Para realizar la comparación entre los grupos, se evaluó la estabilidad de la presencia de la proteína de interés ZO-1. Observando detalladamente las imágenes, se encontraron varios patrones de distribución de ZO-1 (**Figura 33**), diferentes a la línea uniforme y continua que rodea la célula (**Figura 33A**). Estos patrones fueron utilizados como parámetros morfológicos para clasificar el efecto de los tratamientos sobre las células. Estos parámetros incluyeron quiebres en la estructura de la barrera de células epiteliales (**Figura 33B**), inmuno-tinción de ZO-1 difusa (**Figura 33C**) y/o débil (**Figura 33D**), apariencia puntiforme (**Figura 33E**) y formación de estructuras en forma de anillos (**Figura 33F**).

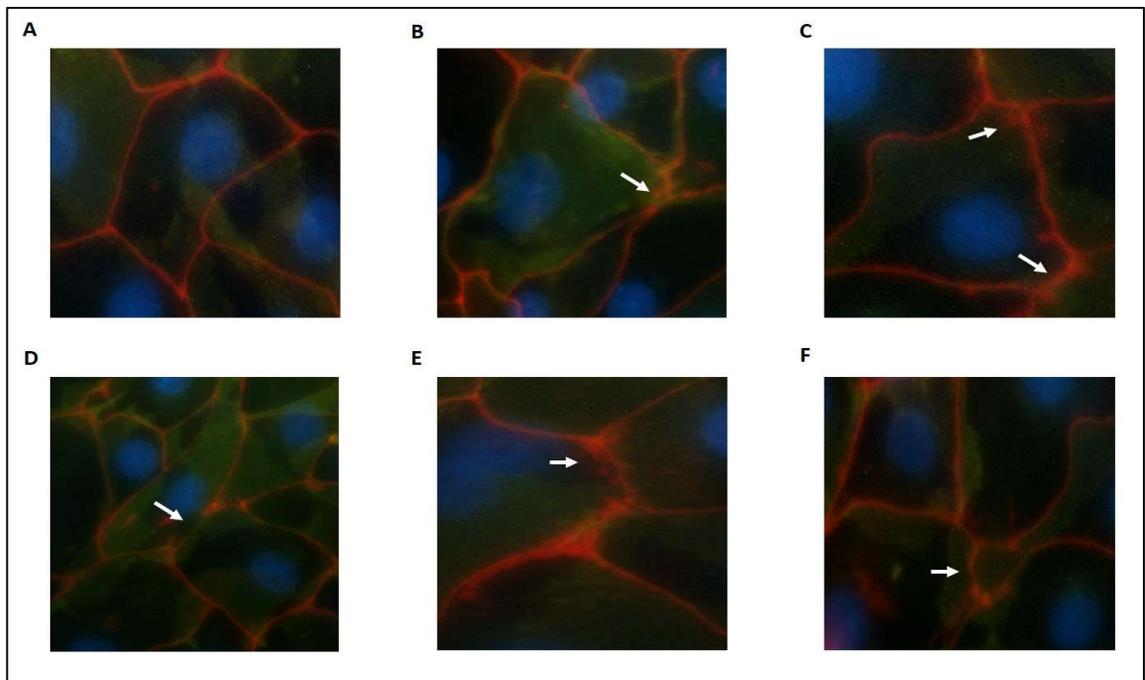


Figura 33: Parámetros morfológicos de clasificación de distribución de ZO-1 en cultivo de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides. A) Normal, B) quiebre en la estructura de la unión entre célula, C) inmuno-tinción difusa, D) inmuno-tinción débil, E) puntiforme, F) estructura en forma de anillo.

Se cuantificó el porcentaje de células que presentaban los diferentes parámetros (**Figura 34**) y se obtuvo que el jugo gástrico y su respectivo jugo filtrado, indujeron similares patrones de expresión de ZO-1 en relación al porcentaje de quiebres (**Figura 34A**), apariencia difusa (**Figura 34B**), débil (**Figura 34C**) y apariencia puntiforme (**Figura 34D**) con respecto al control de células sin tratar, independiente del estatus de infección por *H. pylori*. Sin embargo, se observó un aumento en la cantidad de estructuras con forma de anillo cuando las células fueron tratadas con jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*, en comparación al control y en comparación al porcentaje de anillos formados por el estímulo de jugo gástrico de niños no infectados ($p= 0,0111$) (**Figura 34E**). Este incremento en la formación de anillos de ZO-1 fue dependiente del componente microbiano ($p= 0,0036$), ya que la filtración eliminó la formación de los anillos, al nivel del control.

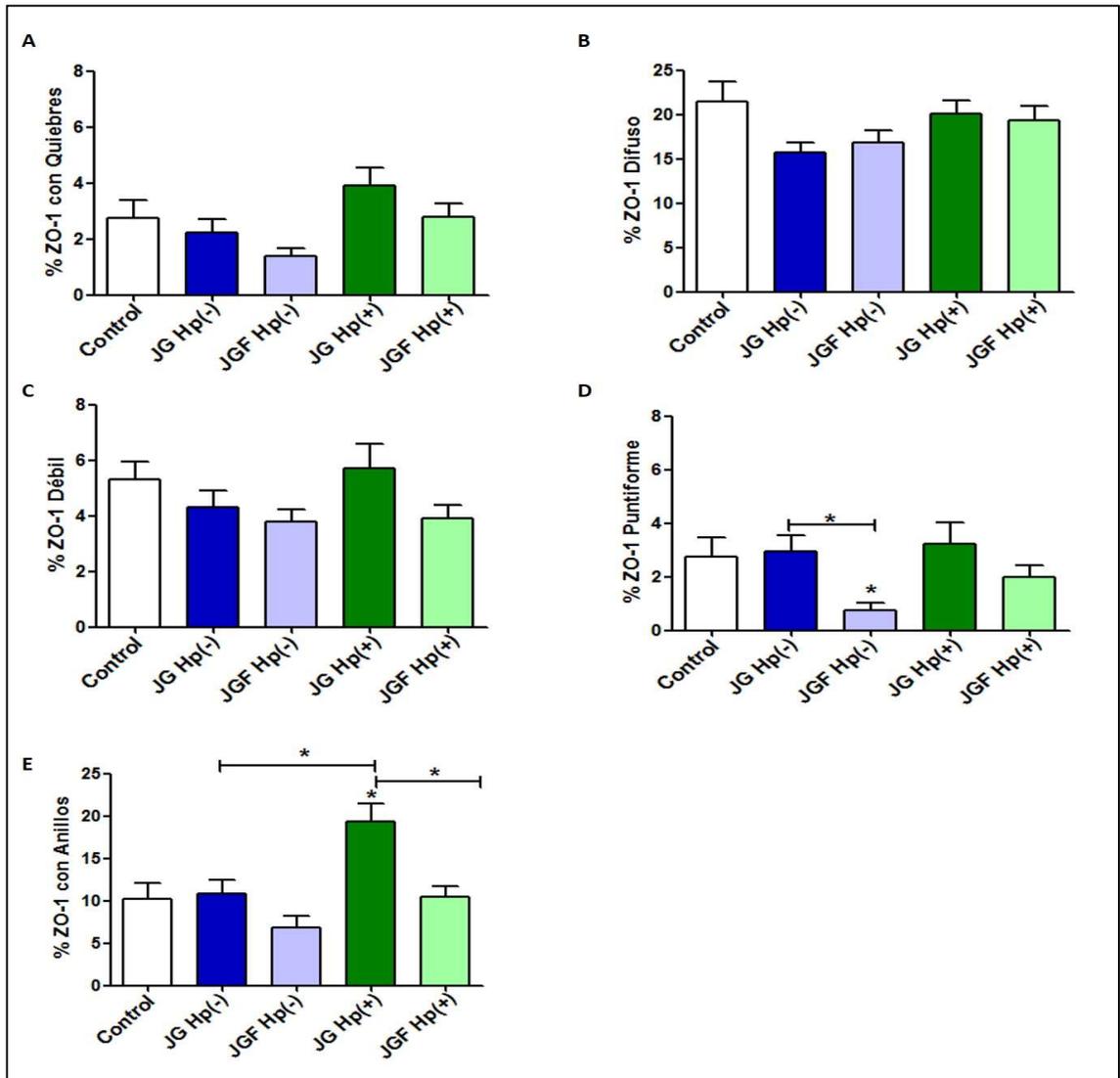


Figura 34: Cuantificación de los parámetros morfológicos de distribución de ZO-1 en cultivo de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides. Monocapa de células epiteliales gástricas tratadas con jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños no infectados con *H. pylori* (JG Hp(-) y JGF Hp(-), respectivamente) y jugo gástrico y jugo gástrico filtrado proveniente de niños infectados con *H. pylori* (JG Hp(+)) y JGF Hp(+), respectivamente). A) Porcentaje de células que presentan ZO-1 con queiebres en la estructura de la unión entre célula. B) Porcentaje de inmuno-tinción difusa. C) Porcentaje de inmuno-tinción débil. D) Porcentaje de células con presencia de ZO-1 puntiforme. E) Porcentaje de células que presentan estructura en forma de anillo. * $p < 0,05$ con respecto al control de células sin tratar.

Dado este interesante hallazgo, se visualizaron las monocapas de células epiteliales a través de microscopía confocal (**Figura 35**), para así obtener una mejor resolución de estas estructuras de ZO-1 con forma de anillo (**Figura 35A**). Usando las herramientas entregadas por estas microscopías, se observaron las estructuras en forma de anillo por medio de un corte en serie z (**Figura 35B y Figura 35C**), herramienta con la cual, con tal calidad de tinción, no fue posible determinar de manera precisa qué son estas estructuras. Sin embargo, con ayuda de las visualizaciones en 3D (**Figura 35D-F**) el análisis de microscopía confocal de los anillos sugiere la formación de un poro entre las células.

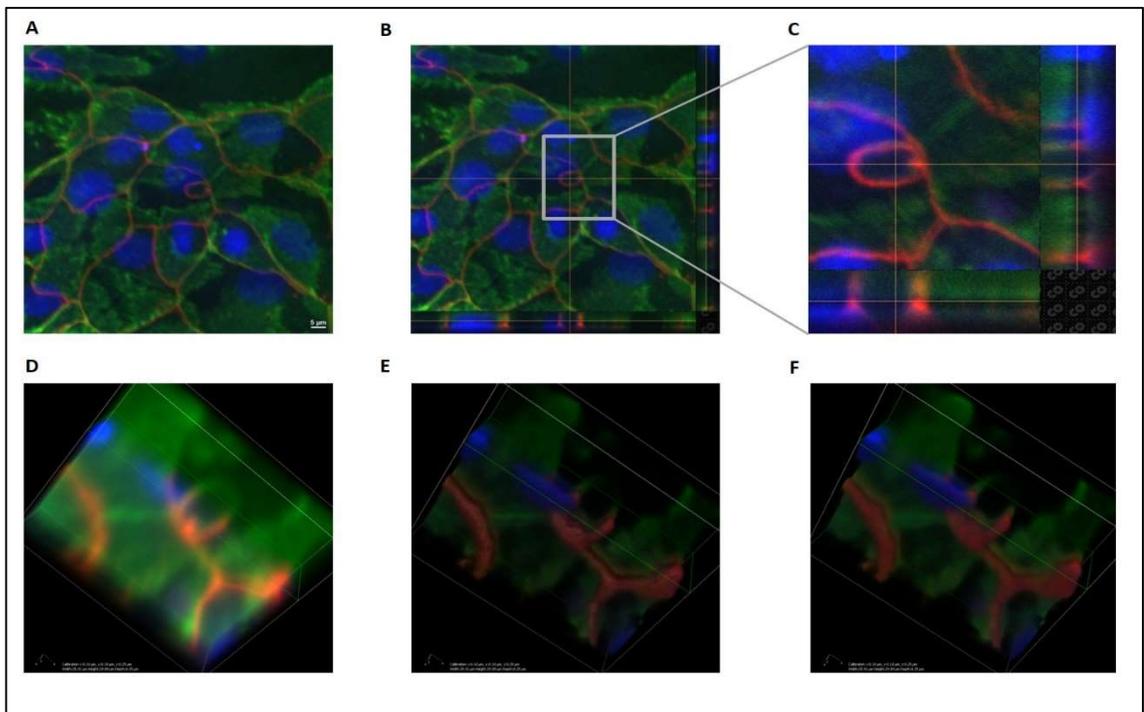


Figura 35: Microscopía Confocal de monocapa de células epiteliales que presenta estructura de ZO-1 en forma de anillo. A) Microscopía confocal 2D, aumento 40x. B) Microscopía confocal del corte en serie z. C) Magnificación de una estructura de anillo, en corte de serie z. D) Visualización en 3D del corte de serie z. E) Visualización 3D, shading. F) Visualización 3D, alpha blending.

4. Efecto del desafío con *H. pylori* en la integridad de la barrera epitelial en células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides, pre-incubadas con la microbiota del jugo gástrico de niños no infectados con *H. pylori*.

Con el objetivo de simular la infección primaria de *H. pylori* y así poder evaluar de qué manera puede interactuar o afectar la microbiota durante la infección, es que se desafió con *H. pylori* a monocapas de células epiteliales pre-incubadas con el jugo gástrico y jugo gástrico filtrado de niños no infectados (**Figura 36A**) como se describió en metodología (**Sección 4.7**).

4.1. Efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre la distribución de ZO-1 durante el desafío con *H. pylori*

En el ensayo de primo infección de *H. pylori*, se evaluó la distribución de ZO-1 por medio de la cuantificación de los parámetros morfológicos (**Figura 36**) descritos en la sección anterior (**Figura 33**). El análisis demostró que las monocapas de células epiteliales desafiadas con *H. pylori* presentaron un aumento en los quiebres ($p=0,0177$) y la presencia de ZO-1 con apariencia puntiforme ($p=0,0228$) en comparación a las células sin tratar, pero no afectó al porcentaje de células que presentan estructuras con forma de anillo. Además, se determinó que las monocapas de células pre-incubadas con el jugo gástrico y jugo gástrico filtrado de niños no infectados con *H. pylori*, protegieron ante la injuria inducida por el desafío con *H. pylori*, disminuyendo el efecto de la infección a nivel de quiebres ($p=0,0039$ y $p=0,0010$, respectivamente) (**Figura 36B**), expresión puntiforme de ZO-1 ($p=0,0060$ y $p=0,0009$, respectivamente) (**Figura 36C**) y no afectaron al porcentaje de células que presentan estructuras con forma de anillo (**Figura 36D**).

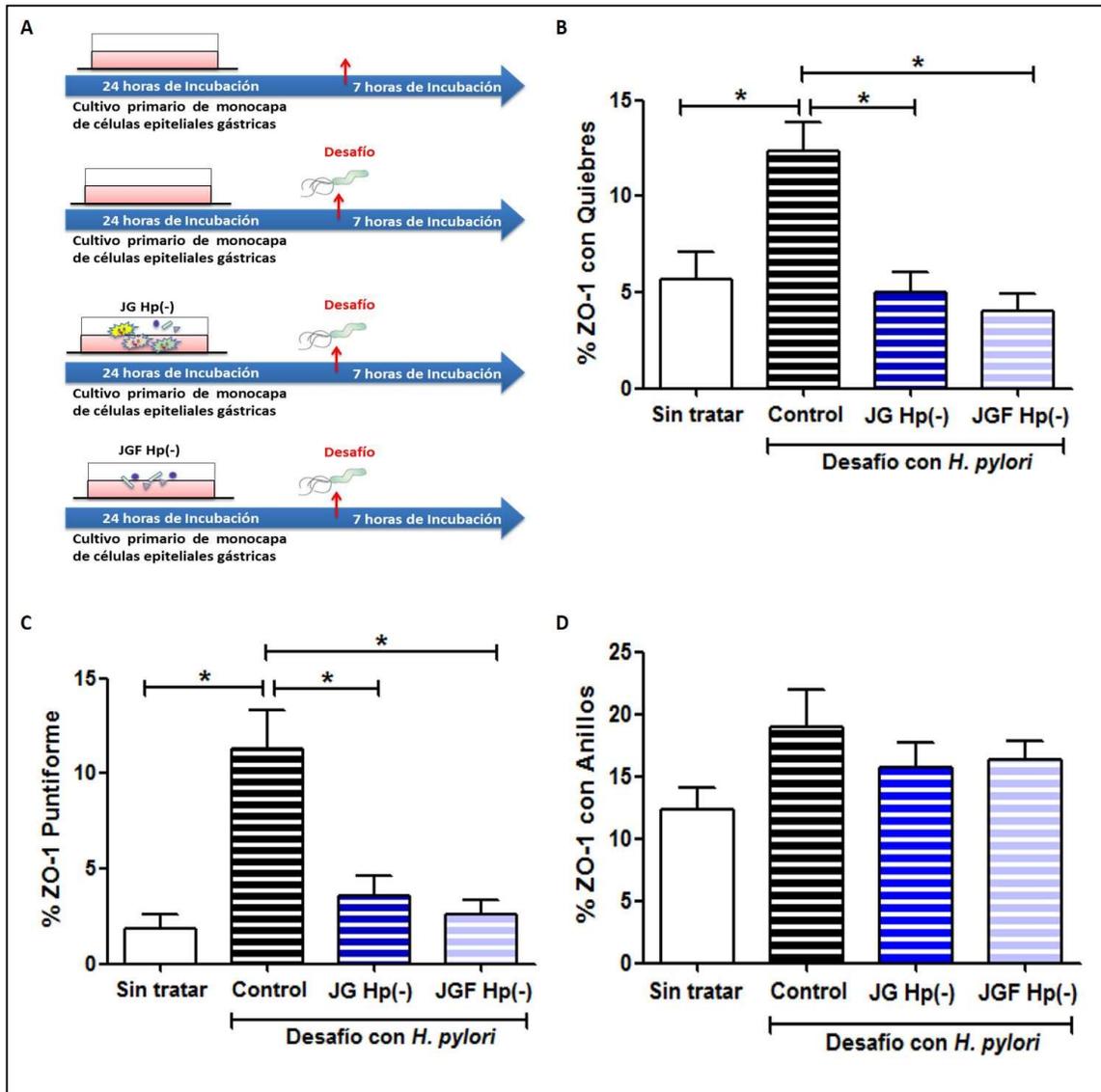


Figura 36: Efecto del jugo gástrico en la infección primaria por *H. pylori* sobre la distribución de ZO-1 en monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de organoides. A) Esquema de infección con el grupo sin tratar, el grupo control de monocapa de células epiteliales desafiadas con *H. pylori* y los grupos de monocapas de células epiteliales preincubadas con el jugo gástrico y jugo filtrado de niños no infectados (JG Hp(-) y JGF Hp(-), respectivamente) y el posterior desafío con *H. pylori*. B) Porcentaje de células que presentan estructura en forma de anillo. C) Porcentaje de células con distribución de ZO-1 en forma puntiforme. D) Porcentaje de células que presentan ZO-1 con quiebres en la estructura de la unión entre célula.

Discusión

En esta tesis se evaluó la microbiota gástrica en un modelo *in vitro* de células epiteliales gástricas. Como condición previa al desarrollo de los objetivos propuestos en esta tesis, comparamos la composición de las muestras de jugo gástrico provenientes de los niños infectados y no infectados con *H. pylori* mediante el análisis de la secuenciación del gen *16S rDNA* y encontramos que no hay diferencias entre la alfa diversidad bacteriana presente en las muestras, contrario a los hallazgos encontrados por Llorca et al., quien encontró en biopsias gástricas de niños no infectados con la bacteria, una mayor diversidad bacteriana en comparación a las biopsias gástricas de los niños infectados (110). Al evaluar la composición taxonómica de las muestras de jugo gástrico, determinamos que la microbiota gástrica de niños infectados en comparación a los niños no infectados con *H. pylori* fue distinta en la abundancia de phylum, clase, orden, familia y género, lo cual indica que la presencia de *H. pylori* en el estómago está asociada a una composición de una microbiota diferencial, la cual podría afectar la respuesta inmune innata de las células epiteliales evaluada en esta tesis.

Al igual que lo reportado por Brawner (90), encontramos que el jugo gástrico de los niños infectados con *H. pylori*, presentan menores abundancias del phylum Actinobacterias, pero además nuestras muestras tienen una disminución en la abundancia de Firmicutes y mayor abundancia de Proteobacterias en comparación a las muestras del jugo gástrico de niños no infectados, lo cual es bastante similar a lo encontrado por los grupos de Maldonado-Contreras y Llorca, en biopsias gástricas de adultos y niños en presencia y ausencia de *H. pylori* (86,110).

A nivel de clase, en las muestras de jugos gástricos de niños infectados encontramos bajas abundancias de Actinobacteria, Deltaproteobacteria y Clostridia. En oposición a nuestros hallazgos, bacterias de la clase Clostridia se encuentra en una mayor abundancia en biopsias gástricas de los niños no infectados con *H. pylori*, junto con Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria y Bacteroidia (110). Las abundancias en los distintos niveles taxonómicos encontradas en las muestras de jugos gástricos de niños no

infectados e infectados con *H. pylori*, difiere a lo descrito por Llorca et al. en comparación a las abundancias encontradas en biopsias gástricas de niños, debido a que pese que ambos tipos de muestras provienen del mismo nicho, cada una posee un microecosistema diferente, en donde *H. pylori* puede influir de mayor o menor manera.

A nivel de género, de manera interesante encontramos que el jugo gástrico de los niños infectados con *H. pylori*, presentan una mayor abundancia de bacterias pertenecientes al género *Limnohabitans* en comparación a los niños no infectados, las cuales no son usualmente identificadas dentro de la composición de la microbiota gastrointestinal humana. Las bacterias del género *Limnohabitans*, son betaproteobacterias conocidas también como bacterioplancton de agua dulce y juegan un papel importante en la modulación de la comunidad bacteriana de dicho hábitat (111). En el estudio realizado por Inkinen et al., en Finlandia, encontraron altos niveles de bacterias del género *Limnohabitans* en el biofilm y en agua de las tuberías del sistema de distribución de agua potable de un edificio de oficinas (112), lo que justificaría la posibilidad de encontrar este tipo de bacteria en las muestras de jugo gástrico.

Por otro lado, Schulz et al., realizaron un estudio usando muestras de adultos que contemplaba biopsias y aspirados de distintos nichos del tracto gastrointestinal superior, en él se encontró que el aspirado gástrico de pacientes infectados con *H. pylori* presentaba una alta abundancia de bacterias del género *Helicobacter* (113). De manera contraria, en nuestras muestras de jugo gástrico de niños infectados, no se encontró una abundancia significativa de bacterias del tipo *Helicobacter*, pues éstas sólo se encontraban en un 0,1%. Esto sugiere que la modulación de la microbiota en el jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*, está mediada por un mecanismo distinto a la competencia por nutrientes en el jugo gástrico. Por su parte, el grupo de Llorca et al., obtuvo un 66,3% de abundancia relativa promedio de secuencias pertenecientes al género *Helicobacter* en biopsias gástricas de niños infectados con la bacteria, en donde algunos de esos pacientes presentaban una baja abundancia relativa (23%) con una estructura en su microbiota similar a la de los niños no infectados, indicando que dicha

superposición podría deberse a una reciente colonización con la bacteria o por ser infectados con una cepa poco virulenta que no es capaz de dominar el ecosistema (110).

En esta tesis, se evaluó el efecto de esta microbiota diferencial presente en las muestras de jugo gástrico, utilizando un modelo clásico e histórico para el estudio de la patogénesis de *H. pylori*, como son las líneas celulares, en este caso, la línea celular AGS. Estas son células derivadas de adenocarcinoma gástrico y frecuentemente tienen 49 cromosomas, haciéndolas un sustituto de epitelio gástrico primario humano, altamente artificial. Este modelo si bien no es ideal en su representación de la respuesta epitelial gástrica, sigue siendo ampliamente utilizado debido al fácil manejo en cultivo de las líneas celulares. Es por ello que, en esta tesis, además se evaluó el efecto de la microbiota del jugo gástrico en el modelo de monocapas de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cell de organoides gástricos. Este cultivo primario es un modelo actualmente utilizado para estudiar respuestas epiteliales, representando no sólo la vanguardia en el área de investigación sino un modelo más cercano a la realidad fisiológica de la mucosa gástrica.

El modelo de organoides, es un cultivo tridimensional de stem cells, el cual imita la organización *in vivo* de diferentes linajes celulares (114). Estas stem cells pueden crecer en cada expansión del organoide conservando la identidad original del órgano (115). Los organoides pueden ser derivados desde dos fuentes de stem cells: células stem pluripotentes que pueden ser obtenidas desde embrión o por reprogramación de células somáticas y desde stem cells adultas (116). Las stem cells adultas se encuentran en tejidos que se auto renuevan, como por ejemplo, el epitelio del tracto gastrointestinal (116). Actualmente, los organoides son ampliamente usados, ya que representan una herramienta ideal para el preciso estudio *in vitro* de un rango de complejos procesos biológicos que ocurren *in vivo* (117). Este modelo de estudio, tiene la capacidad de auto renovarse, auto organizarse, exhibir similar funcionalidad del órgano como del tejido de origen, pueden ser expandidos indefinidamente sin adquirir modificaciones genéticas y se pueden criopreservar (117). Por tales motivos, son utilizados tanto en la investigación

básica como en aplicaciones traslacionales, en la investigación en tecnologías para las stem cells, modelamiento de ciertas enfermedades como el cáncer colorrectal y fibrosis quística y también en medicina regenerativa (118).

En el año 2009, Sato et al., fueron el primer grupo de investigadores capaces generar organoides desde las stem cells aisladas desde las criptas intestinales de ratón, utilizando un cultivo tridimensional de matrigel en conjunto con factores de crecimiento que reflejaban las condiciones del nicho intestinal *in vivo* (115). Más tarde, en el año 2010 Berker et al., lograron generar organoides gástricos de ratón que reproducían similarmente el epitelio gástrico *in vitro* (114). Posteriormente, fueron descritos los organoides de colón (119) y gástricos (120) derivados de humanos.

Dado que el modelo utilizado en esta tesis, son monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas desde las stem cell de los organoides gástricos que proviene de un delicado procesamiento a partir de biopsias gástricas de pacientes pediátrico, se realizó la comparación de la expresión de genes característicos de mucosa gástrica en los distintos estadios de las muestras. Encontramos que el cultivo de organoides posee altos niveles de expresión de Lgr5, un marcador de stem cells, en concordancia a los descrito por Berker et al. (114). Schlaermann et al., en su descripción del cultivo de organoides en etapas tempranas, a través de inmunofluorescencia, menciona que además de presentar el marcador de stem cells Lgr5, la cual lo describe como una etapa altamente proliferativa e indiferenciada, también encontró marcadores de epitelio como E-cadherina, β -catenina, el marcador de proteína formadora de uniones estrechas ocludina e indica que poseen un alto grado de polarización (121). En dicho trabajo, los autores removieron del medio los factores mitogénicos como Wnt3A y R-spondina, diferenciando el cultivo de organoides y pasaron desde un cultivo en 3D a un cultivo en 2D y del mismo modo evaluaron los cambios morfológicos, los cuales iban acompañados de alteraciones en los marcadores de expresión génica. Al igual que en ésta tesis, en un estadio de monocapa (cultivo en 2D), los autores encontraron una disminución del marcador de stem cells Lgr5 y un aumento de la expresión de la mucina

MUC5AC (121), en dicho análisis los autores no mencionan si existen diferencias en los niveles de expresión de E-cadherina ni de ocludina tanto en el cultivo en 3D como en 2D. En esta tesis, nosotros sí evaluamos estos genes y encontramos que el cultivo en monocapa no sólo tiene bajos niveles de expresión de Lgr5, sino que además consiste en un cultivo diferenciado, pues posee altos niveles de expresión del marcador de célula epitelial E-cadherina (CDH1) y de la mucina MUC5AC en comparación al cultivo de organoides, además de presentar mayores niveles de expresión de la proteína formadora de unión estrecha ZO-1 que el cultivo tridimensional. En nuestro trabajo, la expresión tanto de TLRs como de β -defensinas no varía entre las distintos tipos de muestras, a excepción de que las biopsias gástricas presentan una mayor expresión de hBD1, la cual se ha visto que en biopsias gástricas de pacientes no infectados con *H. pylori*, se expresa de manera constitutiva en relación a las biopsias gástricas de pacientes infectados con la bacteria (57), lo cual sugiere que el micro-ecosistema y la microbiota que acoge la mucosa gástrica es capaz de mantener activa la expresión de éste gen, sin embargo sin este estímulo, como ocurre en el caso de organoides y monocapa de células epiteliales, hBD1 se encuentra en bajos niveles de expresión.

El cultivo en monocapa de células epiteliales es el modelo ideal para estudiar cómo bacterias patogénicas o patobiontes como *H. pylori* y bacterias propias al nicho como la microbiota gástrica, son reconocidas y cómo interactúan con la primera barrera de defensa que posee el estómago, las células epiteliales, y cómo estas bacterias podrían modular la respuesta inmune innata. De éste modo, para responder a los objetivos planteados en ésta tesis, se evaluó el efecto de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados y no infectados con *H. pylori*, en estos dos modelos *in vitro* de línea celular AGS y de cultivo primario de monocapa de células epiteliales gástricas diferenciadas de stem cells de organoides. Se encontró que a nivel de reconocimiento, la expresión de los receptores TLRs, en células AGS, sólo el jugo gástrico y el jugo filtrado de niños infectados con la bacteria inducen altos niveles de expresión del mensajero del receptor TLR2, mientras que en el modelo de monocapas de células epiteliales, éste efecto sólo

se pudo observar como tendencia de manera no significativa. La activación del receptor TLR2, ocurre por asociación de lipoproteínas, ácido lipoteicoico y/o peptidoglicano, iniciando una cascada de señales que lleva a la activación de NF- κ B induciendo a una respuesta del tipo inflamatoria (122), la cual en ambos modelos de estudio se ve reflejada en el aumento de la expresión y secreción de IL-8.

También evaluamos la producción de citoquinas proinflamatorias y encontramos en ambos modelos de estudio, que no hubo diferencias en los niveles de expresión y secreción de IL-6 con respecto a las células sin tratar, esto probablemente porque pese que IL-6 es una citoquina proinflamatoria, expresada por células epiteliales, es mayormente expresada en células del tipo linfocitoide, macrófagos y fibroblastos (44). Por otro lado, al comparar los niveles de expresión de IL-8 y TNF- α tanto en AGS como en la monocapa de células epiteliales gástricas, encontramos que el componente bacteriano presente en el jugo gástrico de los niños infectados induce la expresión de IL-8 en ambos modelos y de TNF- α sólo en el modelo de monocapa de células epiteliales, siendo en este último, inclusivamente mayor a lo expresado por su contraparte. Sin embargo, cuando se evaluó los niveles de secreción, el jugo gástrico tanto de niños infectados como de no infectados, indujeron altos niveles de secreción de IL-8 y TNF- α . El hecho de que no exista una correlación entre los niveles de mensajero y de secreción de las citoquinas no es inesperado, ya que ante un primer estímulo se produce una respuesta inmediata generando la secreción de citoquinas proinflamatorias almacenadas en gránulos, respuesta que se aprecia ante estímulo de las bacterias del jugo gástrico de niños infectados y no infectados, sin embargo para inducir la expresión del mensajero sólo las bacterias de niños infectados con *H. pylori* son capaces de lograrlo.

En conjunto con la evaluación de TLRs y citoquinas pro-inflamatorias, estudiamos el efecto de la microbiota del jugo gástrico sobre las β -defensinas, encontrando que de manera independiente de la presencia de bacterias, el jugo gástrico de niños no infectados, induce la disminución de la expresión del mensajero de la molécula antimicrobiana hBD-1, sólo en el modelo de células AGS. Esta inhibición también ha sido encontrada en la mucosa intestinal de pacientes infectados con *Shigella dysenteriae*

(123), en pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa (124) y en cultivos *in vitro* de células epiteliales de intestino infectadas con patógenos entéricos como *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigenica y *S. dysenteriae* (125). Patel et al., ha descrito que la disminución de la expresión de hBD-1, tanto en biopsias de pacientes infectados con *H. pylori* como en cultivo *in vitro*, es modulada por la activación de NF- κ B y sugiere que este es un mecanismo por el cual *H. pylori* promueve la supervivencia bacteriana y la persistencia en el nicho gástrico (126), lo cual también podría ocurrir en el contexto de estimular el cultivo *in vitro* de la línea celular AGS, con bacterias no patogénicas. En cuanto a la expresión de las otras β -defensinas evaluadas, no hubo diferencias con respecto a las células sin tratar. Sin embargo, en el modelo de monocapa de células epiteliales, el jugo gástrico de ambos grupos indujo la expresión de hBD2, de manera dependiente del componente bacteriano. Esta β -defensina, en otros modelos como en el tracto respiratorio, piel e intestino (127–129), ha sido altamente expresada ante el efecto de una infección bacteriana, por PAMPs y por citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α (130), siendo activada por todos estos factores vía TLR2 (131,132).

El modelo de infección por *H. pylori*, demuestra que tanto la bacteria como sus factores de virulencia son capaces de interactuar con la barrera de las células epiteliales, irrumpiendo las uniones estrechas (79,80), lo cual permite el paso a través de la barrera de metabolitos y fuga de bacterias a través de ella, exacerbando de este modo el daño mucosal y la respuesta inmune (80). El fenotipo celular generado por la disrupción de las uniones estrechas, está asociado a mecanismos involucrados en la carcinogénesis gástrica (82,83). Debido a la relevancia que adquiere la integridad de la barrera de células epiteliales, es que se evaluó su estructura a través de la expresión del mensajero de las proteínas formadoras de uniones estrechas, Cldn-2, Cldn-4 y ZO-1. En donde, no encontramos diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a las células sin tratar, a excepción del modelo en AGS, el cual presentó una disminución en los niveles de expresión de Cldn-2 por efecto del jugo gástrico de niños no infectados con

H. pylori. Esta proteína, Cldn-2, está descrita como una proteína formadora de poros en las uniones estrechas, permitiendo el paso de pequeños cationes (133) y agua (134). En el contexto de infección de *H. pylori*, se ha descrito que las cepas que poseen el factor de virulencia *cagA*, son capaces de inducir la disrupción de las uniones estrechas de las células AGS vía el factor de transcripción *Cdx2*, el cual induce la expresión de *Cldn-2* (76). En enfermedades inflamatorias, infecciosas y en líneas cancerígenas de intestino (135,136), estómago (137) y pulmón (138), *Cldn-2* se encuentra altamente expresada, induciendo una disminución de la resistencia transepitelial y fuga en la permeabilidad paracelular, produciendo la disfuncionalidad de la barrera epitelial. Por tal motivo la regulación de la expresión de *Cldn-2* es considerada en como un posible blanco terapéutico en el estudio de terapias para ciertos adenocarcinomas (139) y Enfermedad Inflamatoria Intestinal (140). Considerando estos antecedentes, nuestros resultados sugieren que en las células de adenocarcinoma gástrico, AGS, el jugo gástrico de niños no infectados con *H. pylori*, al disminuir la expresión de *Cldn-2*, podría ser un modulador favorable para mejorar la función de barrera epitelial.

Al evaluar la distribución de ZO-1 en la barrera epitelial del cultivo primario en monocapa de las células epiteliales, se identificaron distintos parámetros de distribución de la proteína, los que fueron utilizados para medir daño en la barrera celular. De los cinco parámetros propuestos y cuantificados, sólo tres fueron identificados en la literatura y ninguno de ellos ha sido cuantificado. Estos tres parámetros son: quiebres en la distribución de ZO-1, descrito como una disrupción de la línea continua de ZO-1 alrededor de la célula y definida por Krueger et al. como una disrupción del contacto célula-célula (141); inmuno-tinción de ZO-1 débil identificado como disminución de la marca de ZO-1 (141); y apariencia puntiforme, descrita como una deslocalización de ZO-1 en el citoplasma o zonas cercanas a la membrana celular y definida por Krueger et al. como distribución de ZO-1 en pequeñas vesículas (141) y por Amieva et al. como parches ectópicos de ZO-1 (79). De manera interesante, en esta tesis se identificó un cuarto parámetro descrito como estructuras de ZO-1 con forma de anillo, el cual no ha sido previamente reportado. Al respecto, encontramos que el jugo gástrico induce la

formación de estas estructuras con forma de anillo, de manera dependiente de la presencia del componente bacteriano y dependiente del estatus de infección positivo de *H. pylori*. A través de imágenes de mayor resolución, los resultados sugieren que estas estructuras podrían ser poros entre la unión célula-célula, proponiendo una disposición de ZO-1 como lo demuestra el diagrama (**Figura 37**).

A pesar de que el mecanismo por el cual se forman las uniones estrechas no ha sido completamente descrito, se ha identificado que ZO-1 resulta ser necesaria para el ensamblaje de las uniones estrechas y localización de otras proteínas que la forman, como por ejemplo las claudinas (142,143). Estudios realizados en monocapas de líneas celulares de epitelio, en donde se ha eliminado la presencia de ZO-1, se ha encontrado que se producen cambios en la distribución de F-actina y miosina II, acompañada de cambios en la forma de la células, por lo que se le atribuye estar involucrada en la determinación de la forma del contacto célula-célula (144) y de interactuar con componentes estructurales y reguladores del citoesqueleto de actina. Al respecto se ha descrito que la activación de AMPK (145), fosforila la proteína I-afadina (146), la cual permite la unión de ZO-1 con F-actina (143), facilitando el ensamblaje de las uniones estrechas. En un estudio realizado en pacientes con enfermedad celiaca, en donde se esperaba que los niveles de expresión de ZO-1 fueran bajos, Ciccocioppo et al. reportaron un reducido estatus de fosforilación de ZO-1 sin una alteración de los niveles de expresión del mensajero (147). En esta tesis, el jugo gástrico de niños infectados no afectó la expresión de ZO-1, pero indujo alteraciones en la distribución proteica en la barrera de las células epiteliales, por lo que, dado estos antecedentes, es posible que el mecanismo por el cual se forman estas estructuras de ZO-1 con forma de anillo esté involucrada la contracción de las fibras de F-actina. Por lo que, al diagrama anteriormente propuesto, es necesario adicionar una inmunofluorescencia con detección de actina (como faloidina) para discriminar entre el citoplasma y el poro que esta tesis propone. Además, resulta fundamental realizar un ensayo funcional para determinar que la formación de anillos, o como se sugiere, de poros entre las uniones células-células, es efectivamente una irrupción en la barrera de las células epiteliales, por lo que se debe

evaluar el registro de la resistencia transepitelial de las monocapas de células epiteliales antes y después de los tratamientos y ensayos de flujo a través de la monocapa.

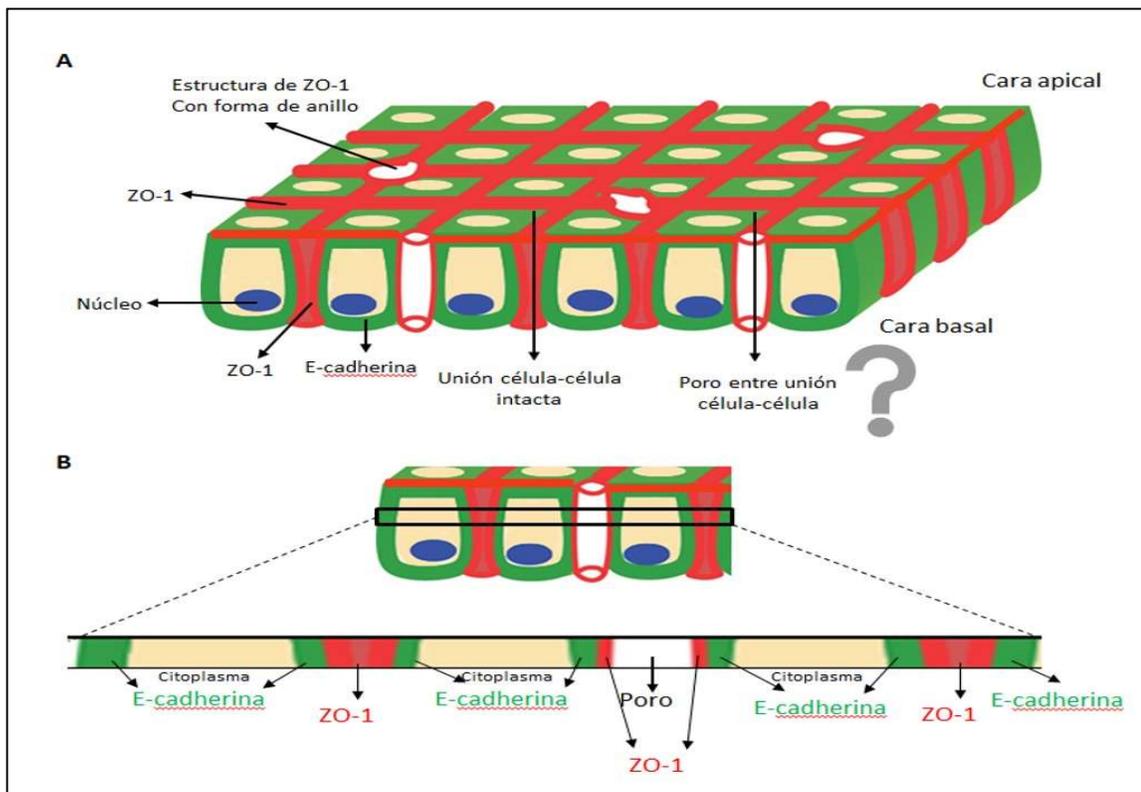


Figura 37: Diagrama de la distribución de ZO-1 en la barrera de células epiteliales. A) Visualización 3D de la barrera de células epiteliales, indicando la presencia de ZO-1 (rojo), marcador de células epiteliales E-cadherina (verde), Núcleo (azul) y la presencia de ZO-1 formando estas estructuras de anillo y posible poro entre célula-célula. B) Esquema de una hipotética visualización de corte z (corte transversal), mostrando la disposición de las proteínas E-cadherina, ZO-1 y la hipotética presencia de poro entre célula-célula dada por ZO-1.

Finalmente con el objetivo de dilucidar cómo afecta la microbiota del jugo gástrico en la infección primaria por *H. pylori*, en donde la bacteria se enfrenta a un nicho con una composición bacteriana del jugo gástrico de niños no infectados, se evaluó la barrera de las células epiteliales y se encontró que luego del desafío con *H. pylori*, el porcentaje de

células que presentan quiebres y apariencia puntiforme de ZO-1, se mantienen similares a las células sin tratar de manera independiente de la presencia del componente bacteriano. A diferencia de lo anterior, al tratar el cultivo en monocapa sólo con *H. pylori* se observó un alto porcentaje de células con quiebres y apariencia puntiforme de ZO-1. El efecto de la bacteria concuerda con las pequeñas vesículas de ZO-1 en el citoplasma y disrupción del contacto célula-células reportado en la literatura (79,141). Dado lo anterior, el jugo gástrico, de manera independiente del componente bacteriano, protege ante la injuria inducida por la infección temprana por *H. pylori*, sugiriendo que no sólo las bacterias, sino que también algún metabolito producido por ellas y presente en la muestra de jugo gástrico, esté modulando este efecto protector ante la injuria inducida por *H. pylori* sobre la distribución de la proteína ZO-1 en las uniones estrechas de la barrera de las células epiteliales.

La inmunopatogénesis de la infección por *H. pylori in vivo*, se caracteriza por una infección bacteriana que produce daño a nivel de mucosa gástrica (15), induce la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y la activación de un perfil efector del tipo Th1 (11) y Th17 (148), el cual se encuentra mucho más exacerbado en adultos infectados que en niños infectados por *H. pylori* (15,16). Sin embargo, el desarrollo de un perfil de respuesta regulatoria (Tregs) en pacientes infectados con *H. pylori* es mayor en los niños infectados que los adultos infectados, lo cual estaría asociado al menor daño histológico que los niños presentan ante la infección en comparación a los adultos (15). Además, está descrito que en adultos, *H. pylori* es el agente etiológico del desarrollo de la cascada de cáncer gástrico (149), por lo que nos hace pensar que además del componente genético, podrían existir otros factores presentes en el nicho gástrico que podría afectar al correcto funcionamiento de la mucosa, entre ellos, la microbiota gástrica. Por un lado, el análisis de secuenciación masiva ha demostrado en múltiples trabajos que, los pacientes adultos con cáncer gástrico presentan una microbiota diferencial y menos diversa que los pacientes con gastritis asociada a la infección con *H. pylori* e individuos adultos sanos (150–152). Por otro lado, en el trabajo de Brawner et al., nuestro grupo de

investigación ha demostrado que además la microbiota de los adultos es menos diversa que la microbiota de los niños y que la microbiota de los niños posee una composición diferencial con respecto al estado de infección por *H. pylori* del paciente (90). Por lo que nos cuestionamos si es posible, que por medio de la presencia de *H. pylori* en la mucosa gástrica pediátrica, la microbiota diferencial de estos niños, sea un factor relevante en el desarrollo de la inmunopatogénesis bacteriana en el niño y más allá, en la acumulación de lesiones en el epitelio gástrico en el adulto, que más tarde podrían estar involucradas en el desarrollo de malignidades como el cáncer gástrico. Con esta tesis, nuestro objetivo fue marcar un punto de inicio, en donde descartando modificaciones genéticas adquiridas por la edad y factores ambientales, utilizamos donantes pediátricos para evaluar el efecto de la microbiota del jugo gástrico en etapas tempranas de la infección por *H. pylori*.

En conclusión, la microbiota del jugo gástrico indujo la secreción de IL-8 y TNF- α y la expresión de hBD-2. Durante la infección temprana por *H. pylori*, la microbiota del jugo gástrico de niños no infectados y/o metabolitos producidos por ésta, disminuyó la alteración estructural de la barrera de células epiteliales producida por la infección de la bacteria. Sin embargo, una vez asentada la infección en niños, la presencia de *H. pylori* podría modificar la microbiota del jugo gástrico contribuyendo al rol patogénico asociado a *H. pylori*. Así, esta microbiota del jugo gástrico de niños infectados, participa en la respuesta inmune innata de las células epiteliales, induciendo la expresión de IL-8 y TNF- α y produciendo alteraciones estructurales en la barrera de células epiteliales, modificando la distribución de ZO-1 (**Figura 38**), efecto que se refleja en la formación de estructuras en forma de anillo. Estructuras que por lo demás, sugieren ser poros en las uniones célula-célula que pueden afectar la funcionalidad de la barrera de las células epiteliales.

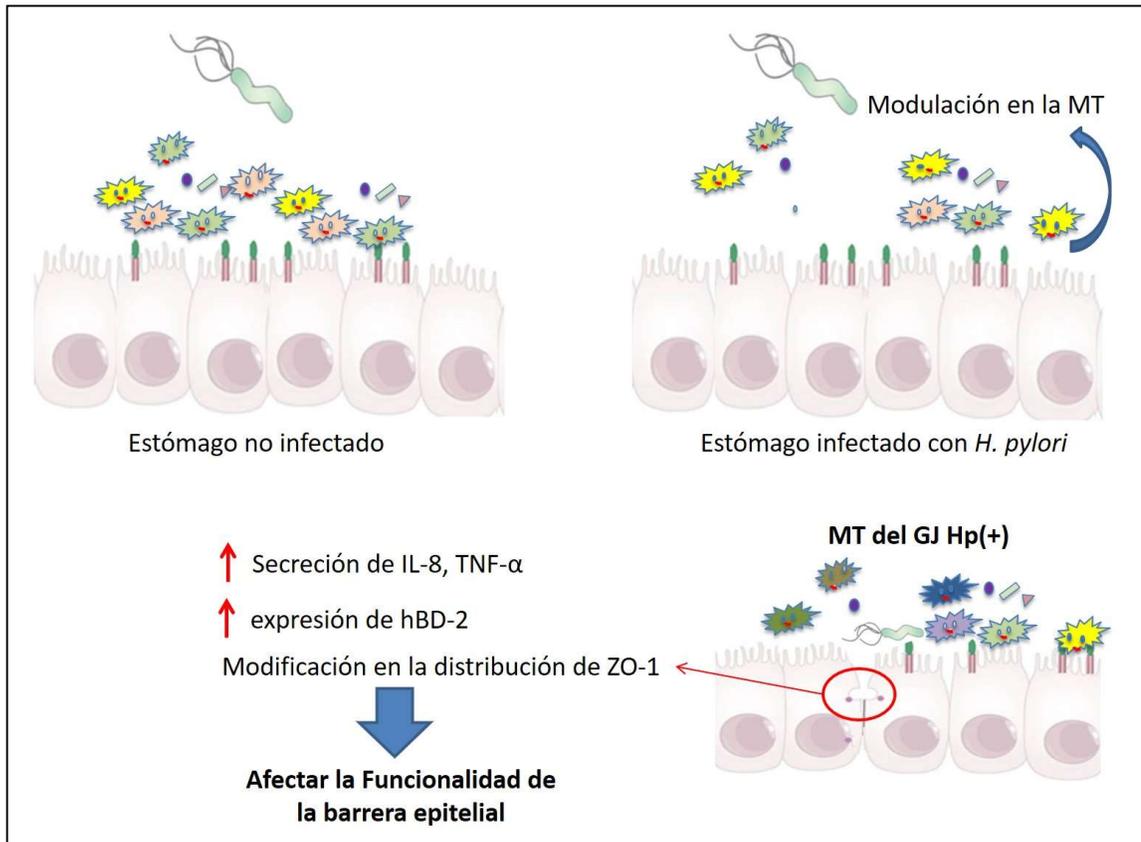


Figura 38: Modelo de infección de *H. pylori* y su interacción con la microbiota gástrica.

El trabajo de esta tesis doctoral continuará con el desarrollo de los ensayos funcionales pertinentes para demostrar el efecto de la microbiota sobre la función de barrera de las células epiteliales, utilizando para ello el modelo de monocapa de células epiteliales diferenciados de organoides. Este modelo de estudio, el cual representa de manera cercana los eventos que ocurren *in vivo*, es ideal para el estudio de la respuesta inmune y cambios funcionales en las células epiteliales, ante escenarios de infección crónica por *H. pylori* e inclusive ante efectos deletéreos inducidos a largo plazo por la bacteria, como son los estadios pre neoplásicos.

Finalmente, los hallazgos de esta tesis nos motivan a determinar la composición completa del jugo gástrico. Ya contamos con la descripción del componente bacteriano,

por lo que pretendemos mediante espectrometría de masa, determinar los componentes de la porción soluble de nuestras muestras. Luego de analizar el efecto de estos componentes sobre la respuesta inmune y estructura de las células epiteliales utilizando nuestro modelo de organoides, deseamos desarrollar un compuesto al cual denominaremos como JGN-ni. Este producto proveniente del jugo gástrico de niños no infectados, deberá ser evaluado en su efecto sobre la integridad de la barrera y la respuesta inmune de las células epiteliales gástricas en presencia de la microbiota del jugo gástrico de niños infectados con *H. pylori*.

Debido que *H. pylori* tiene un efecto dual sobre el hospedero, en donde, por una parte es el agente etiológico de úlcera gástrica particularmente en población adulta, también su presencia está asociada a un menor desarrollo de alergias en edades tempranas (153,154). Por lo que nuestro objetivo final, sería evaluar este producto JGN-ni como suplemento en la alimentación de los niños y de esta manera disminuir el efecto deletéreo producido por la infección por *H. pylori* y manteniendo el efecto benéfico inmunoregulador de alergias en la población infantil.

Conclusión

La microbiota del jugo gástrico de niños sanos previene el efecto inducido por la infección temprana por *H. pylori*, estimulando la respuesta inmune innata y disminuyendo la alteración estructural de la barrera de célula epiteliales. Sin embargo, si los mecanismos de defensa son sobrepasados y se establece la infección por *H. pylori*, la microbiota del jugo gástrico asociada a la infección estimula la respuesta inmune innata para hacerla más efectiva, pero altera la integridad de la barrera de las células epiteliales gástricas, lo que podría tener un rol en el daño asociado a la infección. De este modo, el jugo gástrico de niños no infectados por *H. pylori*, podría ser un posible blanco terapéutico para modular la respuesta inmune y disminuir alteraciones en la estructura de la barrera en las células epiteliales gástricas en presencia de *H. pylori*, sin la necesidad de erradicar la bacteria de su nicho.

Referencias

1. Robin Warren J, Marshall B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Vol. 321, *The Lancet*. 1983. p. 1273–5.
2. Cover TL, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* in Health and Disease. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1863–73.
3. Ferreccio C, Rollán A, Harris PR, Serrano C, Gederlini A, Margozzini P, et al. Gastric cancer is related to early *Helicobacter pylori* infection in a high-prevalence country. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(4):662–7.
4. Jaime F, Villagrán A, Hernández C, Ortiz M, Serrano C, Harris PR. Functional gastrointestinal disorders in children from low socio-economic status and *Helicobacter pylori* infection. *Child Care Health Dev*. 2018;44(2).
5. Osaki T, Okuda M, Ueda J, Konno M, Yonezawa H, Hojo F, et al. Multilocus sequence typing of DNA from faecal specimens for the analysis of intra-familial transmission of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*. 2013;62(PART5):761–5.
6. Philippe Lehours OY. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. 2007;12:1–3.
7. Sipponen P, Hyvärinen H, Seppälä K, Blaser MJ. Review article: Pathogenesis of the transformation from gastritis to malignancy. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998;12 Suppl 1:61–71.
8. McColl KEL. Clinical practice. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2010; 362:1597-1604
9. Iarc. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. *Iarc Monogr Eval Carcinog Risks To Humans*. 1994;61:121–62.
10. Guiraldes E, Duarte I, Peña a, Godoy a, Espinosa MN, Bravo R, et al. Proinflammatory cytokine expression in gastric tissue from children with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001;33(August):127–32.
11. D'Elis MM, Manghetti M, De Carli M, Costa F, Baldari CT, Burrioni D, et al. T

- helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol.* 1997;158(2):962–7.
12. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007;13(3):108–16.
 13. Gil JH, Seo JW, Cho M-S, Ahn J-H, Sung HY. Role of Treg and TH17 Cells of the Gastric Mucosa in Children With *Helicobacter pylori* Gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014;58(2):252–8.
 14. Atherton JC, Blaser MJ. Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: Ancient history, modern implications. Vol. 119, *Journal of Clinical Investigation.* 2009. p. 2475–87.
 15. Harris PR, Wright SW, Serrano C, Riera F, Duarte I, Torres J, et al. *Helicobacter pylori* Gastritis in Children Is Associated With a Regulatory T-Cell Response. *Gastroenterology.* 2008;134(2):491–9.
 16. Serrano C, Wright SW, Bimczok D, Shaffer CL, Cover TL, Venegas A, et al. Downregulated Th17 responses are associated with reduced gastritis in *Helicobacter pylori*-infected children. *Mucosal Immunol.* 2013;6(5):950–9.
 17. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol.* 2005;17(1):1–14.
 18. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011;30(1):16–34.
 19. Cobo E, Chadee K. Antimicrobial Human β -Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens.* 2013; 2(1):177-92.
 20. Pimentel-Nunes P, Afonso L, Lopes P, Roncon-Albuquerque R, Goncalves N, Henrique R, et al. Increased expression of toll-like receptors (TLR) 2, 4 and 5 in gastric dysplasia. *Pathol Oncol Res.* 2011;17(3):677–83.
 21. Rad R, Brenner L, Krug A, Volland P, Mages J, Lang R, et al. Toll-Like Receptor-Dependent Activation of Antigen-Presenting Cells Affects Adaptive Immunity to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 2007;133(1).
 22. Müller A, Oertli M, Arnold IC. *H. pylori* exploits and manipulates innate and

- adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. *Cell Commun Signal*. 2011;9(1):25.
23. Schmaußer B, Andrulis M, Endrich S, Lee SK, Josenhans C, Müller-Hermelink HK, et al. Expression and subcellular distribution of toll-like receptors TLR4, TLR5 and TLR9 on the gastric epithelium in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol*. 2004;136(3):521–6.
 24. Smith MF, Mitchell A, Li G, Ding S, Fitzmaurice AM, Ryan K, et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B activation and chemokine expression by epithelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(35):32552–60.
 25. Mandell L, Moran AP, Cocchiarella A, Houghton J, Taylor N, Fox JG, et al. Intact gram-negative *Helicobacter pylori*, *Helicobacter felis*, and *Helicobacter hepaticus* bacteria activate innate immunity via toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4. *Infect Immun*. 2004;72(11):6446–54.
 26. Kumar Pachathundikandi S, Brandt S, Madassery J, Backert S. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF- β . *PLoS One*. 2011;6(5):1–11.
 27. Takenaka R, Yokota K, Ayada K, Mizuno M, Zhao Y, Fujinami Y, et al. *Helicobacter pylori* heat-shock protein 60 induces inflammatory responses through the Toll-like receptor-triggered pathway in cultured human gastric epithelial cells. *Microbiology*. 2004;150(12):3913–22.
 28. Su B, Ceponis PJ, Lebel S, Huynh H, Sherman PM. *Helicobacter pylori* activates Toll-like receptor 4 expression in gastrointestinal epithelial cells. *Infect Immun*. 2003;71(6):3496–502.
 29. Ishihara S, Rumi MAK, Kadowaki Y, Ortega-Cava CF, Yuki T, Yoshino N, et al. Essential role of MD-2 in TLR4-dependent signaling during *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *J Immunol*. 2004;173:1406–16.
 30. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J*

- Exp Med. 1999;189(11):1777–82.
31. Torok AM, Bouton AH, Joanna B, Goldberg JB. Helicobacter pylori Induces Interleukin-8 Secretion by Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 5-Dependent and -Independent Pathways Helicobacter pylori Induces Interleukin-8 Secretion by Toll-Like Receptor 2- and Toll-Like Receptor 5-Dependent and -. 2005;73(3):1523–31.
 32. Gewirtz AT, Yu Y, Krishna US, Israel DA, Lyons SL, Peek, Jr. RM. *Helicobacter pylori* Flagellin Evades Toll-Like Receptor 5–Mediated Innate Immunity. J Infect Dis. 2004;189(10):1914–20.
 33. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature. 2000;408(6813):740–5.
 34. Varga MG, Shaffer CL, Sierra JC, Suarez G, Piazuelo MB, Whitaker ME, et al. Pathogenic Helicobacter pylori strains translocate DNA and activate TLR9 via the cancer-associated cag type IV secretion system. Oncogene. 2016;35(48):6262–9.
 35. El Kebir D, Jozsef L, Pan W, Wang L, Filep JG. Bacterial DNA Activates Endothelial Cells and Promotes Neutrophil Adherence through TLR9 Signaling. J Immunol. 2009;182(7):4386–94.
 36. Alvarez-Arellano L, Cortés-Reynosa P, Sánchez-Zauco N, Salazar E, Torres J, Maldonado-Bernal C. TLR9 and NF- κ B are partially involved in activation of human neutrophils by Helicobacter pylori and its purified DNA. PLoS One. 2014;9(7).
 37. Chang YJ, Wu MS, Lin JT, Sheu BS, Muta T, Inoue H, et al. Induction of Cyclooxygenase-2 Overexpression in Human Gastric Epithelial Cells by Helicobacter pylori Involves TLR2 / TLR9 and c-Src-Dependent Nuclear Factor- κ B Activation. 2004;66(6):1465–77.
 38. Bergman M, Del Prete G, van Kooyk Y, Appelmelk B. Helicobacter pylori phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. Nat Rev Microbiol. 2006; 4(2):151-9.
 39. Torok AM, Bouton AH, Goldberg JB. Helicobacter pylori induces interleukin-8

- secretion by Toll-like receptor 2- and Toll-like receptor 5-dependent and -independent pathways. *Infect Immun.* 2005; 73(3):1523-31.
40. Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. Helicobacter pylori induces an array of pro-inflammatory cytokines in human gastric epithelial cells: quantification of mRNA for interleukin-8, -1 alpha/beta, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, monocyte chemoattractant protein-1 and tumour . *J Gastroenterol Hepatol.* 1997;12(7):473–80.
 41. Lai CH, Chang YC, Du SY, Wang HJ, Kuo CH, Fang SH, et al. Cholesterol depletion reduces Helicobacter pylori CagA translocation and CagA-induced responses in AGS cells. *Infect Immun.* 2008;76(7):3293–303.
 42. Crabtree E, Shallcross TM, Heatley R V, Wyatt JI, Elisa I-. Mucosal tumour necrosis factor and interleukin-6 in patients with Helicobacterpylori associated gastritis. *Gut.* 1991;32:1473–7.
 43. Shibata J, Goto H, Arisawa T, Niwa Y, Hayakawa T, Nakayama A, et al. Regulation of tumour necrosis factor (TNF) induced apoptosis by soluble TNF receptors in Helicobacter pylori infection. *Gut.* 1999;45(1):24–31.
 44. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood.* 1989;74(1):1–10.
 45. Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, et al. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1092–101.
 46. Del Prete G, Chiumiento L, Amedei A, Piazza M, D’Elios MM, Codolo G, et al. Immunosuppression of TH2 responses in Trichinella spiralis infection by Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *J Allergy Clin Immunol.* 2008;122(5).
 47. Tsai CC, Kuo TY, Hong ZW, Yeh YC, Shih KS, Du SY, et al. Helicobacter pylori neutrophil-activating protein induces release of histamine and interleukin-6 through G protein-mediated MAPKs and PI3K/Akt pathways in HMC-1 cells. *Virulence.* 2015;6(8):755–65.
 48. Kabisch R, Mejiás-Luque R, Gerhard M, Prinz C. Involvement of toll-like

- receptors on *Helicobacter pylori*-induced immunity. *PLoS One*. 2014;9(8).
49. Nagy TA, Allen SS, Wroblewski LE, Flaherty DK, Slaughter JC, Perez-Perez G, et al. *Helicobacter pylori* induction of eosinophil migration is mediated by the *cag* pathogenicity island via microbial-epithelial interactions. *Am J Pathol*. 2011;178(4):1448–52.
 50. Backert S, Naumann M. What a disorder: Proinflammatory signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. Vol. 18, *Trends in Microbiology*. 2010. p. 479–86.
 51. Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Pharmacol Ther*. 1995;66(2):191–205.
 52. Miyasaki KT, Bodeau AL, Ganz T, Selsted ME, Lehrer RI. In vitro sensitivity of oral, gram-negative, facultative bacteria to the bactericidal activity of human neutrophil defensins. *Infect Immun*. 1990;58(12):3934–40.
 53. Ogata K, Linzer BA, Zuberi RI, Ganz T, Lehrer RI, Catanzaro A. Activity of defensins from human neutrophilic granulocytes against *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *Infect Immun*. 1992;60(11):4720–5.
 54. Daher KA, Selsted ME, Lehrer RI. Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol*. 1986;60(3):1068–74.
 55. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999;286(5439):525–8.
 56. Bajaj-Elliott M, Fedeli P, Smith G V, Domizio P, Maher L, Ali RS, et al. Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut*. 2002;51(3):356–61.
 57. Patel SR, Smith K, Letley DP, Cook KW, Memon AA, Ingram RJM, et al. *Helicobacter pylori* downregulates expression of human beta-defensin 1 in the gastric mucosa in a type IV secretion-dependent fashion. *Cell Microbiol*. 2013;15(12):2080–92.
 58. Bajaj-Elliott M, Fedeli P, Smith G V, Domizio P, Maher L, Ali RS, et al. Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression

- during gastritis. *Gut*. 2002;51(3):356–61.
59. George JT, Boughan PK, Karageorgiou H, Bajaj-Elliott M. Host anti-microbial response to *Helicobacter pylori* infection. *Mol Immunol*. 2003;40(7):451–6.
 60. O’Neil DA, Cole SP, Martin Porter E, Housley MP, Liu L, Ganz T, et al. Regulation of human beta-defensins by gastric epithelial cells in response to infection with *Helicobacter pylori* or stimulation with interleukin-1. *Infect Immun*. 2000;68(9):5412–5.
 61. Vordenbäumen S, Pilic D, Otte JM, Schmitz F, Schmidt-Choudhury A. Defensin-mRNA expression in the upper gastrointestinal tract is modulated in children with celiac disease and *helicobacter pylori*-positive gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(6):596–600.
 62. Muhammad JS, Zaidi SF, Zhou Y, Sakurai H, Sugiyama T. Novel epidermal growth factor receptor pathway mediates release of human β -defensin 3 from *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. *Pathog Dis*. 2016:1–31.
 63. García JR, Krause a, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, et al. Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*. 2001;15(10):1819–21.
 64. Otte JM, Neumann HM, Brand S, Schrader H, Schmidt WE, Schmitz F. Expression of beta-defensin 4 is increased in human gastritis. *Eur J Clin Invest*. 2009;39(2):126–38.
 65. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001. 2(4):285-93
 66. Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. Vol. 36, *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2014. p. 157–65.
 67. Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction. Vol. 1, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009. 1(2): a002584
 68. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction

- strands. *Mol Biol Cell*. 2000;11(12):4131–42.
69. Ohtani S, Terashima M, Satoh J, Soeta N, Saze Z, Kashimura S, et al. Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: Downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival. *Gastric Cancer*. 2009;12(1):43–51.
 70. Hajjari M, Behmanesh M, Sadeghizadeh M, Zeinoddini M. Junctional adhesion molecules 2 and 3 may potentially be involved in progression of gastric adenocarcinoma tumors. *Med Oncol*. 2013;30(1).
 71. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993; 123(6 Pt 2):1777-88.
 72. Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(2):511-6.
 73. Borch K, Sjöstedt C, Hannestad U, Söderholm JD, Franzén L, Mårdh S. Asymptomatic *Helicobacter pylori* gastritis is associated with increased sucrose permeability. *Dig Dis Sci*. 1998; 43(4):749-53.
 74. Matysiak-Budnik T, Coffin B, Lavergne-Slove A, Sabate JM, Mégraud F, Heyman M. *Helicobacter pylori* Increases the Epithelial Permeability to A Food Antigen in Human Gastric Biopsies. *Am J Gastroenterol*. 2004; 99(2):225-32.
 75. Fiorentino M, Ding H, Blanchard TG, Czinn SJ, Szein MB, Fasano A. *Helicobacter pylori* induced disruption of monolayer permeability and pro-inflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 2013; 81(3):876-83.
 76. Song X, Chen HX, Wang XY, Deng XY, Xi YX, He Q, et al. H. pylori-encoded CagA disrupts tight junctions and induces invasiveness of AGS gastric carcinoma cells via Cdx2-dependent targeting of Claudin-2. *Cell Immunol*. 2013;286(1–2):22–30.
 77. Zavala-Zendejas VE, Torres-Martinez AC, Salas-Morales B, Fortoul TI, Montaña

- LF, Rendon-Huerta EP. Claudin-6, 7, or 9 overexpression in the human gastric adenocarcinoma cell line AGS increases its invasiveness, migration, and proliferation rate. *Cancer Invest.* 2011;29(1):1–11.
78. Lai YP, Yang JC, Lin TZ, Lin JT, Wang JT. Helicobacter pylori infection and CagA protein translocation in human primary gastric epithelial cell culture. *Helicobacter.* 2006;11(5):451–9.
 79. Amieva MR, Vogetmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA. *Science.* 2003; 300(5624):1430-4.
 80. Tegtmeyer N, Wessler S, Necchi V, Rohde M, Harrer A, Rau TT, et al. Helicobacter pylori Employs a Unique Basolateral Type IV Secretion Mechanism for CagA Delivery. *Cell Host Microbe.* 2017; 22(4):552-560.e5.
 81. Li W, Shu X, Gu W, Peng K, Cai H, Jiang L JM. Tight junction protein expression of gastric mucosa and its significance in children with Helicobacter pylori infection. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2015;53(7):510–5.
 82. Terashima M, Maesawa C, Oyama K, Ohtani S, Akiyama Y, Ogasawara S, et al. Gene expression profiles in human gastric cancer: Expression of maspin correlates with lymph node metastasis. *Br J Cancer.* 2005; 92(6):1130-6.
 83. Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, et al. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci.* 2007; 98(7):1014-9.
 84. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984; 1(8390):1311-5.
 85. Sanduleanu S, Jonkers D, De Bruine A, Hameeteman W, Stockbr??gger RW. Non-Helicobacter pylori bacterial flora during acid-suppressive therapy: Differential findings in gastric juice and gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001; 15(3):379-88.
 86. Maldonado-Contreras A, Goldfarb KC, Godoy-Vitorino F, Karaoz U, Contreras M, Blaser MJ, et al. Structure of the human gastric bacterial community in

- relation to *Helicobacter pylori* status. *ISME J.* 2011;5(4):574–9.
87. Heimesaat MM, Fischer A, Plickert R, Wiedemann T, Loddenkemper C, Göbel UB, et al. *Helicobacter pylori* induced gastric immunopathology is associated with distinct microbiota changes in the large intestines of long-term infected Mongolian gerbils. *PLoS One.* 2014; 9(6):e100362.
 88. Aebischer T, Fischer A, Walduck A, Schlötelburg C, Lindig M, Schreiber S, et al. Vaccination prevents *Helicobacter pylori*-induced alterations of the gastric flora in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;46(2):221–9.
 89. Hornsby MJ, Huff JL, Kays RJ, Canfield DR, Bevins CL, Solnick J V. *Helicobacter pylori* Induces an Antimicrobial Response in Rhesus Macaques in a *cag* Pathogenicity Island-Dependent Manner. *Gastroenterology.* 2008; 134(4):1049-57.
 90. Brawner KM, Kumar R, Serrano CA, Ptacek T, Lefkowitz E, Morrow CD, et al. *Helicobacter pylori* infection is associated with an altered gastric microbiota in children. *Mucosal Immunol.* 2017;10(5):1169–77.
 91. Hamilton MK, Boudry G, Lemay DG, Raybould HE. Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(10):G840-51.
 92. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One.* 2007;2(12).
 93. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci.* 2011; 108 Suppl 1:4516-22.
 94. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* 2013; (17):5112-20.
 95. Kumar R, Eipers P, Little RB, Crowley M, Crossman DK, Lefkowitz EJ, et al.

- Getting started with microbiome analysis: Sample acquisition to bioinformatics. *Curr Protoc Hum Genet.* 2014; 82:18.8.1-29.
96. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 2010; 26(19):2460-1.
 97. McDonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, Desantis TZ, Probst A, et al. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J.* 2012; 6(3):610-8.
 98. Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(16):5261-7.
 99. Caporaso JG, Bittinger K, Bushman FD, Desantis TZ, Andersen GL, Knight R. PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics.* 2010; 26(2):266-7.
 100. Miyoshi H, Ajima R, Luo CT, Yamaguchi TP, Stappenbeck TS. Wnt5a potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science.* 2012;338(6103):108–13.
 101. Nusse R. Wnt signaling and stem cell control. Vol. 18, *Cell Research.* 2008. p. 523–7.
 102. Miyoshi H, Stappenbeck TS. In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells as organoids. *Nat Protoc.* 2013;8(12):2471–82.
 103. VanDussen KL, Marinshaw JM, Shaikh N, Miyoshi H, Moon C, Tarr PI, et al. Development of an enhanced human gastrointestinal epithelial culture system to facilitate patient-based assays. *Gut.* 2015;64(6):911–20.
 104. Bacchetti De Gregoris T, Aldred N, Clare AS, Burgess JG. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *J Microbiol Methods.* 2011;86(3):351–6.
 105. Lin CH, Wu CY, Kou HS, Chen CY, Huang MC, Hu HM, et al. Effect of Di(2-ethylhexyl)phthalate on *Helicobacter pylori* -Induced Apoptosis in AGS Cells. *Gastroenterol Res Pract.* 2013:924769.

106. Forte M, Iachetta G, Tussellino M, Carotenuto R, Prisco M, De Falco M, et al. Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicol Vitro*. 2016;31:126–36.
107. Vordenbäumen S, Pilic D, Otte J-M, Schmitz F, Schmidt-Choudhury A. Defensin-mRNA Expression in the Upper Gastrointestinal Tract Is Modulated in Children With Celiac Disease and Helicobacter pylori–positive Gastritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(6):596–600.
108. WHO | BMI-for-age (5-19 years). WHO. 2015
109. Fiorentino M, Ding H, Blanchard TG, Czinn SJ, Szein MB, Fasano A. Helicobacter pylori-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. *Infect Immun*. 2013;81(3):876–83.
110. Llorca L, Pérez-Pérez G, Urruzuno P, Martinez MJ, Iizumi T, Gao Z, et al. Characterization of the gastric microbiota in a pediatric population according to Helicobacter pylori status. In: *Pediatric Infectious Disease Journal*. 2017. 36(2):173-178.
111. Jezberová J, Jezbera J, Znachor P, Nedoma J, Kasalický V, Šimek K. The Limnohabitans genus harbors generalistic and opportunistic subtypes: Evidence from spatiotemporal succession in a canyon-shaped reservoir. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(21).
112. Inkinen J, Jayaprakash B, Santo Domingo JW, Keinänen-Toivola MM, Ryu H, Pitkänen T. Diversity of ribosomal 16S DNA- and RNA-based bacterial community in an office building drinking water system. *J Appl Microbiol*. 2016;120(6):1723–38.
113. Schulz C, Schütte K, Koch N, Vilchez-Vargas R, Wos-Oxley ML, Oxley APA, et al. The active bacterial assemblages of the upper GI tract in individuals with and without Helicobacter infection. *Gut*. 2016;67(2):216-225
114. Barker N, Huch M, Kujala P, van de Wetering M, Snippert HJ, van Es JH, et al. Lgr5+veStem Cells Drive Self-Renewal in the Stomach and Build Long-Lived

- Gastric Units In Vitro. *Cell Stem Cell*. 2010; 6(1):25-36.
115. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Van De Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009; 459(7244):262-5.
 116. Bartfeld S. Modeling infectious diseases and host-microbe interactions in gastrointestinal organoids. *Developmental Biology*. 2016. 420(2):262-270.
 117. Fatehullah A, Tan SH, Barker N. Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nat Cell Biol*. 2016;18(3):246–54.
 118. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications. *Science*. 2013. 340(6137):1190-4.
 119. Sato T, Stange DE, Ferrante M, Vries RGJ, Van Es JH, Van Den Brink S, et al. Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*. 2011; 141(5):1762-72.
 120. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, et al. Modelling human development and disease in pluripotent stem-cell-derived gastric organoids. *Nature*. 2014; 516(7531):400-4.
 121. Schlaermann P, Toelle B, Berger H, Schmidt SC, Glanemann M, Ordemann J, et al. A novel human gastric primary cell culture system for modelling *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Gut*. 2014;0:1–12.
 122. Pachathundikandi SK, Lind J, Tegtmeier N, El-Omar EM, Backert S. Interplay of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* with toll-like receptors. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
 123. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, et al. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: A novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med*. 2001;7(2):180–5.
 124. Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M, Mueller O, Herrlinger KR, Fellermann K, et al. Inducible and constitutive beta-defensins are differentially expressed in

- Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2003;9(4):215–23.
125. Chakraborty K, Ghosh S, Koley H, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Saha DR, et al. Bacterial exotoxins downregulate cathelicidin (hCAP-18/LL-37) and human β -defensin 1 (HBD-1) expression in the intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2008;10(12):2520–37.
 126. Patel SR, Smith K, Letley DP, Cook KW, Memon a a, Ingram RJM, et al. *Helicobacter pylori* down-regulates expression of human β -defensin 1 in the gastric mucosa in a type IV secretion dependent fashion. *Cell Microbiol*. 2013; 15(12):2080-92.
 127. Hiratsuka T, Nakazato M, Date Y, Ashitani J, Minematsu T, Chino N, et al. Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 249(3):943-7.
 128. Nagy I, Pivarcsi A, Kis K, Koreck A, Bodai L, McDowell A, et al. *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide induce the expression of antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines/chemokines in human sebocytes. *Microbes Infect*. 2006; 8(8):2195-205.
 129. O'Neil D a, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, et al. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*. 1999; 163(12):6718-24.
 130. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM, Schwichtenberg L, Bartels J, Maune S, et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 22(6):714-21.
 131. Birchler T, Seibl R, Bchner K, Loeliger S, Seger R, Hossle JP, et al. Human Toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur J Immunol*. 2001; 31(11):3131-7.
 132. Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, et al. Beta-

- defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 2004; 173(9):5398-405.
133. Amasheh S. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci.* 2002; 115(Pt 24):4969-76.
 134. Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke J-D, Amasheh S, et al. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci.* 2010; 123(Pt 11):1913-21.
 135. Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K, Mäkelä TH, Bindels RJ, Hoenderop JG, et al. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2013; 48(1):58-69
 136. Kinugasa T, Huo Q, Higashi D, Shibaguchi H, Kuroki M, Tanaka T, et al. Selective up-regulation of claudin-1 and claudin-2 in colorectal cancer. In: *Anticancer Research.* 2007; 27(6A):3729-34.
 137. Xin S, Huixin C, Benchang S, Aiping B, Jinhui W, Xiaoyan L, et al. Expression of Cdx2 and claudin-2 in the multistage tissue of gastric carcinogenesis. *Oncology.* 2007; 73(5-6):357-65.
 138. Ikari A, Sato T, Watanabe R, Yamazaki Y, Sugatani J. Increase in claudin-2 expression by an EGFR/MEK/ERK/c-Fos pathway in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2012; 1823(6):1110-8.
 139. Sonoki H, Tanimae A, Furuta T, Endo S, Matsunaga T, Ichihara K, et al. Caffeic acid phenethyl ester down-regulates claudin-2 expression at the transcriptional and post-translational levels and enhances chemosensitivity to doxorubicin in lung adenocarcinoma A549 cells. *J Nutr Biochem.* 2018; 56:205-214.
 140. Ma Y, Wang Q, Yu K, Fan X, Xiao W, Cai Y, et al. 6-Formylindolo(3,2-b)carbazole induced aryl hydrocarbon receptor activation prevents intestinal barrier dysfunction through regulation of claudin-2 expression. *Chem Biol Interact.* 2018; 288:83-90.
 141. Krueger S, Hundertmark T, Kuester D, Kalinski T, Peitz U, Roessner A. *Helicobacter pylori* alters the distribution of ZO-1 and p120ctn in primary human

- gastric epithelial cells. *Pathol Res Pract*. 2007; 203(6):433-44.
142. Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, et al. ZO-1 and ZO-2 Independently Determine Where Claudins Are Polymerized in Tight-Junction Strand Formation. *Cell*. 2006; 126(4):741-54.
 143. Fanning AS, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1165:113-20.
 144. Fanning AS, Van Itallie CM, Anderson JM. Zonula occludens-1 and -2 regulate apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol Biol Cell*. 2012; 23(4):577-90
 145. Rowart P, Wu J, Caplan M, Jouret F, Rowart P, Wu J, et al. Implications of AMPK in the Formation of Epithelial Tight Junctions. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2040.
 146. Sakakibara S, Maruo T, Miyata M, Mizutani K, Takai Y. Requirement of the F-actin-binding activity of I-afadin for enhancing the formation of adherens and tight junctions. *Genes to Cells*. 2018; 23(3):185-199.
 147. Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR. Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol*. 2006; 125(4):502-11.
 148. Shi Y, Liu XF, Zhuang Y, Zhang JY, Liu T, Yin Z, et al. Helicobacter pylori-Induced Th17 Responses Modulate Th1 Cell Responses, Benefit Bacterial Growth, and Contribute to Pathology in Mice. *J Immunol*. 2010; 184(9):5121-9.
 149. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 1994.
 150. Dicksved J, Lindberg M, Rosenquist M, Enroth H, Jansson JK, Engstrand L. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *J Med Microbiol*. 2009; 58(Pt 4):509-16.

151. Castaño-Rodríguez N, Goh KL, Fock KM, Mitchell HM, Kaakoush NO. Dysbiosis of the microbiome in gastric carcinogenesis. *Sci Rep.* 2017; 7(1):15957.
152. Ferreira RM, Pereira-Marques J, Pinto-Ribeiro I, Costa JL, Carneiro F, MacHado JC, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota. *Gut.* 2018; 67(2):226-236.
153. Chen Y, Blaser MJ. Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Arch Intern Med.* 2007;167(8):821-7
154. Chen Y, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *J Infect Dis.* 2008;198(4):553–60.



Fundamentos de la Aprobación :

Para otorgar esta aprobación, el Comité en pleno, en su sesión del 18 de diciembre de 2014, consideró los siguientes aspectos:

- El equipo investigador cuenta con la capacidad técnica y competencia profesional acorde a los requerimientos del estudio.
- Los aspectos científicos de la propuesta son considerados adecuados.
- La propuesta puede redundar en aportes al conocimiento.
- Este proyecto no tiene fines terapéuticos y no existe ningún beneficio directo para los participantes a corto plazo.
- La población a estudiar, son adultos y niños que han sido derivados a realizar una endoscopia digestiva alta por su médico tratante, por lo que, salvo los menores de edad, la población no es considerada como vulnerable.
- Balance beneficio/riesgo es considerado favorable.
- No contempla entregar resultados clínicos relevantes ni estudios genéticos. Se solicitará autorización adicional para estudios futuros.
- El Documento de Consentimiento Informado señala claramente que existe libertad para consentir y para retirarse; se asegura confidencialidad, que no hay costos asociados, que no hay beneficios directos para los participantes. No hay potenciales complicaciones derivadas directamente de la investigación. Se indican los teléfonos de las personas responsables del estudio y de los derechos de los participantes.

Adjunto al Acta de Aprobación Ética, se encuentra el listado de los miembros asistentes a la reunión del Comité en la cual fue aprobado este proyecto.

Al término del estudio, se le solicita enviar un informe al CEC Med UC con los resultados del estudio

Se solicita en toda futura correspondencia, hacer referencia al número de proyecto asignado por este Comité (14-165).


DRA. BEATRIZ SHAND KLAGGES
Presidente CEC-MedUC

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC-MedUC
Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el acata del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina (CEC-MedUC). Este Comité adhiere a los principios éticos de Escuela de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, que considera como norma fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición, desde el momento de la concepción hasta la muerte natural. Este comité cumple además con las guías de buena práctica clínica definidas por la conferencia internacional de armonización (GCP-ICH); y con las leyes chilenas 20.120 y 19.628 sobre protección de la vida privada o protección de datos de carácter personal.

Anexo 2

Aprobación del Proyecto de Tesis por el Comité Ético Científico Medicina UC

COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO | CEC MED UC



FACULTAD DE MEDICINA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CHILE

CERTIFICADO
DE APROBACIÓN
CEC-MEDUC

Santiago, 17 de Noviembre de 2016.
Número Proyecto: 161019011

SE APROBÓ EL SIGUIENTE PROYECTO

Investigador Responsable: **Hernández, Carol**
Departamento Gastroenterología y Nutrición Pediátrica.

Financiamiento: Aportes Fondecyt de inicio 11140232

Título PROYECTO: Rol de la microbiota del jugo gástrico en la respuesta inmune innata en la mucosa gástrica en la infección pediátrica por H. Pylori.

Se acusa recibo de los siguientes documentos:
Carta del investigador responsable solicitando la revisión y aprobación de nuevo estudio en referencia.

Documentos revisados y aprobados por el comité:
Solicitud para la aprobación de investigación que involucre seres humanos o uso de muestras humanas.
Formulario de solicitud de dispensa de documento de consentimiento informado.

Resolución del CEC Med UC :
Este proyecto ha sido aprobado con fecha 17 de noviembre de 2016 y tiene vigencia de un año. Para extender esta aprobación, el Investigador Responsable deberá solicitar al Comité de Ética la renovación anual del estudio con al menos 45 días de anticipación.

Por favor lea cuidadosamente la hoja anexa a esta carta en la que se indican todas sus responsabilidades como investigador responsable de este estudio.

Se le solicita en toda futura correspondencia hacer referencia al número del Proyecto asignado 161019011

SRA. ANDREA VILLAGRÁN TORRES
Secretaría Ejecutiva CEC-MedUC

DRA. BEATRIZ SHAND KLAGGES
Presidente CEC-MedUC

EN CASO DE CUALQUIER DUDA SE LE SOLICITA CONTACTARSE CON EL CEC Med UC
Se certifica que la información contenida en el presente documento es correcta y que refleja el acta del Comité Ético Científico de la Facultad de Medicina (CEC-Med UC). Este Comité adhiere a los principios éticos de Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica, que considera como norma fundamental el respeto a la dignidad de la persona humana en cualquier condición, desde el momento de la concepción hasta la muerte natural. Este Comité cumple además con las guías de buena práctica clínica definidas por la conferencia internacional de armonización (GCP-ICH); y con las leyes chilenas 20.120 y 19.628 sobre protección de la vida privada o protección de datos de carácter personal

Marcoleta 391 - Piso 1 8330024 - Santiago, Chile | Teléfono: (+56 -2) 2354 8173 | Fax: (+56-2) 26321924 | etica.investigacion@med.puc.cl