



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

TESIS

**INFLUENCIA DE LA BIOPELÍCULA FORMADA POR
Helicobacter pylori EN PARÁMETROS DE RESPUESTA
INMUNE**

PRESENTA:

Clara Lourdes Tovar Robles

PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TUTORES:

Dr. en C. Rodolfo González Segovia

Dra. en C. Yolanda Romo Lozano

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORIAL:

Dr. en C. Daniel Cervantes García

Aguascalientes, Ags., junio de 2025.



Mtro. En C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO (A) DEL CENTRO BÁSICAS

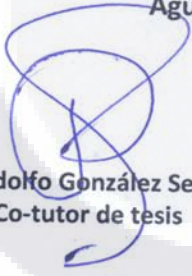
PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutoral** designado del estudiante **CLARA LOURDES TOVAR ROBLES** con ID **56378** quien realizó la tesis titulada: **INFLUENCIA DE LA BIOPELÍCULA FORMADA POR *Helicobacter pylori* EN PARÁMETROS DE RESPUESTA INMUNE**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 4 de junio de 2025.


Dr. Rodolfo González Segovia
Co-tutor de tesis


Dra. Yolanda Romo Lozano
Co-tutora de tesis


Dr. Daniel Cervantes
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado

c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.

Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.

Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16

Actualización: 00

Emisión: 17/05/19

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 5 de junio de 2025

NOMBRE: Clara Lourdes Tovar Robles ID 56378

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional LGAC (del posgrado): Estudio de Proteínas en Sistemas Biológicos

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TÍTULO: Influencia de la biopelícula formada por *Helicobacter pylori* en parámetros de respuesta inmune

Helicobacter pylori es una bacteria asociada gastritis crónica, úlceras pépticas y puede causar algunos tipos de cáncer gástrico. La infección que genera es considerada emergente debido al aumento a nivel mundial de su prevalencia y resistencia. Además, la Organización Mundial de la Salud clasifica a la bacteria como carcinógeno tipo I y la incluye en la lista de los 12 patógenos prioritarios. Es importante destacar que la prevalencia en México es del 70%. Existe una alta probabilidad de que la biopelícula de *H. pylori* esté relacionada a la alta prevalencia de la infección. Los resultados generados por esta tesis contribuirían a establecer esta hipótesis. Es decir, el estudio del comportamiento de la bacteria tanto en su estado planctónico como en el desarrollo de biopelícula, arroja información en cuanto a las características diferenciales pero además, el estudio de la respuesta inmunológica frente a esta bacteria en ambos estados, permite desarrollar y establecer nuevas terapias más efectivas que disminuyan dicha prevalencia. Asimismo, debido a que en el desarrollo experimental de esta tesis se estandarizaron y validaron técnicas que no se encontraban establecidas, permitirá que futuros proyectos de investigación cuenten con una referencia que les permita perfeccionar sus propias técnicas y reafirmar en su caso, lo reportado por este trabajo.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
En caso de Tesis por artículos científicos publicados	
	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
	El estudiante es el primer autor
	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí X
No

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCION:

FIRMAS

Dr. Daniel Cervantes García

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Dr. Alejandro Padilla Díaz

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Re: Manuscript accepted

Mensaje 231 de 1580



De amb@usb-bg.org
Destinatario rgonzals
Fecha 2025-05-15 01:25

Dear Dr. Segovia,

Your manuscript entitled "Effect of fetal calf serum on *in vitro* biofilm formation by *Helicobacter pylori* *in vitro*" has been accepted and will be published in AMB vol. 41, issue 2, 2025 (at the end of June).

Please send the publication fee to the following address:

Information on payment (100 Euro):

Bank: UniCredit Bulbank

IBAN: BG72UNCR76301009569900

Bank Identifier code/SWIFT/BIC: UNCRBGSF

Address: 7 Sveta Nedelya Sq.; 1000 Sofia, Bulgaria

Foundation "Acad. Prof. Dr. Stephan Angeloff"

Payment of the publication fee for the journal Acta Microbiologica Bulgarica (Corresponding author Rodolfo González Segovia).

Prof. Maria Angelova, DSc, Editor

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por el apoyo brindado mediante el número de beca 166856.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por el apoyo de manutención recibido durante el primer semestre, por la infraestructura a disposición de este programa de doctorado y, muy especialmente, por el valioso capital humano con el que cuenta mi *alma mater*.

A la Coordinación del Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, por su constante compromiso y paciencia hacia nosotros, los alumnos.

Al Departamento de Microbiología, por facilitar el uso de áreas, equipos, materiales y reactivos.

A mis Cotutores y Asesor de Tesis, por la oportunidad e invaluable guía.

Un enorme agradecimiento por el apoyo técnico (y emocional) a L.B.T. Angelina Lizbeth Montañez Flores y a L.A.Q.B. Aylin Mayela Ávila Colís. Gracias a su profesionalismo, quienes fuimos alumnos hoy podemos estar graduados.

Y, finalmente, a toda persona que haya visto en este trabajo —y en mí— un ápice de, además de voluntad, una oportunidad para lograr avances de conocimiento.

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS



A Pablo Tovar Vázquez

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

TESIS

ÍNDICE

ACRÓNIMOS..... 5

RESUMEN 7

ABSTRACT 8

I. INTRODUCCIÓN..... 9

II. ANTECEDENTES..... 10

1. *Helicobacter pylori* 10

2. Epidemiología de las enfermedades por *H. pylori*..... 10

3. Fisiopatología 12

3.1 Gastritis13

3.2 Úlcera péptica13

3.3 Dispepsia no ulcerosa.....13

3.4 Gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico.....13

3.5 Linfoma gástrico MALT14

3.6 Trastornos extragastroduodenales14

4. Características microbiológicas 15

5. Mecanismos de infección y patogenicidad..... 16

5.1 Factores de patogenicidad y virulencia18

6. Evasión de la respuesta inmune por *H. pylori*..... 21

6.1.Inhibición en inmunidad innata21

6.2.Modulación de las funciones de células presentadoras de antígeno en la inmunidad adaptativa.....25

7. Formación de biopelículas o biofilms por bacterias..... 28

7.1. Biopelícula formada por *H. pylori*.....31

7.2.Genes asociados a formación de película en *H. pylori*.....33

8. Evasión inmunológica por BFs bacterianas 33

III. JUSTIFICACIÓN 36

IV. OBJETIVOS 38

Objetivo general..... 38

Objetivos específicos 38

V. HIPÓTESIS..... 38

VI. METODOLOGÍA..... 39

1. Cultivo de *H. pylori* y caracterización de la bacteria..... 39

1.1. Análisis molecular de *H. pylori*.....39

2. Monitoreo de biopelícula *in vitro* 41

2.1. Cuantificación de crecimiento bacteriano e inducción de la formación de biopelícula41

2.2. Identificación y cuantificación de BF.....42

2.3. Valoración de diferentes condiciones en la formación de biopelícula por *Helicobacter pylori*42

2.4 Análisis de imagen para cálculo de área total de formación de biopelícula44

2.5 Visualización de BF *in vitro* en microscopía electrónica de barrido.44

3. Monitoreo de la formación de BF *in vivo*..... 45

3.1. Análisis microbiológico en tejido gástrico46

3.2. Identificación molecular gen *ureC*46

4. Expresión de genes relacionados a formación de BF <i>in vitro</i>	46
5. Efecto de la BF de <i>H. pylori</i> sobre la estimulación de receptores de patrones moleculares a patógenos en leucocitos	48
5.1. Activación de NF- κ B	48
5.2. Obtención de sonication de bacteria y BF.....	49
5.3. Estimulación de leucocitos con sonication de bacteria y BF.....	49
6. Actividad anti-fagocitaria de la BF	51
6.1. Actividad de células fagocíticas vs. <i>H. pylori</i> y BF de <i>H. pylori</i>	51
6.2. Actividad de células PMNs humanas con sonication de <i>H. pylori</i> y BF de <i>H. pylori</i> ...	52
7. Modulación inmune de BF sobre los perfiles de linfocitos T.....	53
7.1. Análisis de RT-PCR en tiempo real para determinar perfiles Th1, Th2, Th17 y Treg en mucosa gástrica.	53
8. Análisis estadístico	55
VII. RESULTADOS	56
1. Caracterización de <i>H. pylori</i>	56
Caracterización de los factores de virulencia	56
2. Evaluación de la formación de BFs <i>in vitro</i>	57
2.1. Adición de β -ciclodextrina (β -CD) y uso de caldo Brucella (BB).	57
2.2. Identificación y cuantificación de BF.....	59
2.3. Cálculo de área total con BF.....	62
2.4. Visualización de BF <i>in vitro</i> en microscopía electrónica	64
3. Formación de BF <i>in vivo</i>	65
3.1. Modelo experimental murino de infección por <i>H. pylori</i>	65
3.2. Análisis de expresión de genes bacterianos indicadores de BF <i>in vivo</i>	67
4. Estimulación de receptores de patrones moleculares a patógenos en leucocitos	69
4.1. Caracterización de sonication de bacteria y BF	69
4.2. Condiciones de estimulación de leucocitos.....	70
4.3. Expresión de I κ B α y β -actina en leucocitos humanos estimulados con sonication de bacteria y BF	70
5. Actividad antifagocitaria de la BF.....	71
5.1. Caracterización de <i>Staphylococcus aureus</i>	71
5.2. Estandarización del conteo de <i>Staphylococcus aureus</i> para el proceso de fagocitosis.....	72
5.3. Unidades formadoras de colonia de <i>S. aureus</i> y fagocitosis en ensayos con células de peritoneo de ratón	73
5.4. Unidades formadoras de colonia de <i>S. aureus</i> y fagocitosis en ensayos con neutrófilos humanos.....	75
5.5. Visualización al microscopio de células fagocíticas en peritoneo de ratón	77
6. Modulación inmune de BF sobre los perfiles de linfocitos T.....	78
6.1. Análisis de biopsias gástricas humanas	78
6.2. Expresión relativa de genes transcripcionales asociados a la presencia de <i>H. pylori</i>	80
6.3. Coeficiente de Spearman en perfiles transcripcionales	81
VIII.DISCUSIÓN.....	83
IX. CONCLUSIONES.....	88
X. BIBLIOGRAFÍA.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de iniciadores para <i>vacA</i> y <i>cagA</i> en <i>H. pylori</i>	40
Tabla 2. Genes de expresión diferencial para el desarrollo de BF.....	48
Tabla 3. Genes de expresión para perfiles transcripcionales de Th1, Th2, Th17 y Treg en mucosa gástrica.	54
Tabla 4. Áreas promedio de BF calculadas cinco días	63
Tabla 5. Valores de correlación de Spearman para los perfiles transcripcionales asociados a <i>H. pylori</i>	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de infección por <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 2. Historia natural de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	12
Figura 3. Características estructurales de <i>H. pylori</i>	15
Figura 4. Mecanismos de infección por <i>Helicobacter pylori</i>	16
Figura 5. Diagrama de la infección y patogenia por <i>Helicobacter pylori</i>	17
Figura 6. Factores de patogenicidad y virulencia de <i>H. pylori</i>	18
Figura 7. Ruta canónica de activación de NF- κ B.....	23
Figura 8. Esquema de la respuesta inmune frente a <i>H. pylori</i>	27
Figura 9. Representación esquemática de las etapas del desarrollo de una BF.	31
Figura 10. Diagrama que muestra cambios transcriptómicos/proteómicos en <i>H. pylori</i> ...	32
Figura 11. Caracterización molecular de <i>H. pylori</i>	41
Figura 12. Diferentes combinaciones de ensayos para definir las mejores condiciones en la formación de BF para <i>H. pylori</i>	43
Figura 13. Formación de BF para <i>H. pylori</i> en placa de cultivo.....	43
Figura 14. Diagrama de pasos para la obtención de cálculo de área de BF.	44
Figura 15. Modelo experimental murino de infección con <i>H. pylori</i>	45
Figura 16. Regiones estomacales muestreadas.	46
Figura 17. Estimulación de leucocitos con <i>H. pylori</i> y LPS de <i>E. coli</i>	50
Figura 18. Metodología de la estimulación de células fagocíticas en peritoneo de ratón con extracto sonificado de bacteria planctónica y biopelícula de <i>H. pylori</i>	52
Figura 19. Pruebas de verificación de la especie <i>H. pylori</i>	57
Figura 20. Crecimiento de <i>H. pylori</i> en ICC o BB, OD a 600 nm.....	58
Figura 21. Crecimiento y formación de BF por <i>H. pylori</i>	59
Figura 22. Lecturas de OD para BFs.....	60
Figura 23. Cinética para la formación de BF.....	61
Figura 24. Formación de agregados en experimento realizado para formación de BF en cubreobjetos.....	61
Figura 25. Desarrollo de BF en diferentes condiciones a 40x en cubreobjetos.....	62
Figura 26. Cálculo de área promedio de BF con el software Image J 1.53.	63
Figura 27. Biopelícula de <i>Helicobacter pylori</i> por microscopía electrónica.....	64
Figura 28. Primers utilizados para la identificación del gen <i>ureC</i>	66
Figura 29. PCR para fragmento Hp3-Hp4 del gen <i>ureC</i>	66

Figura 30. Muestras de DNA en biopsias gástricas de ratones infectados 67

Figura 31. PCR de muestras de BF y bacteria planctónica..... 68

Figura 32. PCR para genes *lpxD* y *luxS* asociados a BF 69

Figura 33. Siembra de sonicado de bacteria y BF de *H. pylori* 70

Figura 34. Electroforesis e inmunoblot en extracto de lisis total..... 70

Figura 35. Intensidad de bandas en membranas pvdf en técnica Western blot 71

Figura 36. Pruebas de caracterización de *S. aureus* 72

Figura 37. OD equivalente a Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL para *S. aureus* 72

Figura 38. Dilución en serie para establecer las UFC/mL para *S. aureus*..... 73

Figura 39. Ensayo de UFCs con células de peritoneo de ratón 74

Figura 40. Ensayo de fagocitosis con células de peritoneo de ratón.....75

Figura 41. UFC de *S. aureus* en ensayos con neutrófilos obtenidos de sangre periférica humana. 76

Figura 42. Ensayo de fagocitosis con neutrófilos obtenidos de sangre periférica humana. 77

Figura 43. Imágenes al microscopio (100x) con tinción Giemsa-Wright..... 78

Figura 44. Imágenes al microscopio (100x) con tinción Giemsa-Wright. Se aprecian los cambios morfológicos de PMN humanos..... 78

Figura 45. Patologías gástricas de 18 pacientes en los que se detectó la presencia de *H. pylori*. 79

Figura 46. Estadísticas de los pacientes positivos a la presencia de *H. pylori*. 80

Figura 47. Análisis de correlación bivariada de Spearman 81

Figura 48. Expresión relativa para FOXp3, ROR- γ t, Tbet y GATA3..... 82

ACRÓNIMOS

Acrónimo	Descripción	
	Español	Inglés
AlpA/AlpB	Lipoproteína asociada a la adherencia	Adherence-associated lipoprotein A and B
APC	Células presentadoras de antígeno	Antigen presenting cell
BabA	Proteína de adhesión a los antígenos de Lewis B	Blood antigen binding adhesion
BB	Caldo Brucella	Brucella broth
BF o BF_s	Biopelícula/Biopelículas	Biofilm/Biofilms
cagPAI	Isla de patogenicidad <i>cag</i> de <i>H. pylori</i>	<i>Cag</i> pathogenicity island of <i>Helicobacter pylori</i>
β-CD	Ciclodextrina	Cyclodextrin
cDNA	DNA complementario	Complementary DNA
CLR	Receptores de lectina tipo C	C-type lectin receptors
Ct	Umbral de ciclos, indica la concentración relativa de RNA	Cycle threshold, indicates the relative concentration of an RNA
dupA	Gen promotor de úlceras duodenales	Duodenal ulcer promoting gene
eDNA	DNA extracelular	Extracellular DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	Ethylene diamine tetra-acetic acid
EPS	Exopolisacáridos	Exopolysaccharides
FCS	Suero de ternera fetal	Fetal calf serum
GAPDH	Enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
glmM	gen ureC que codifica para la fosfoglucosamina mutasa	Phosphoglucosamine mutase gene
HopZ	Proteína de membrana externa de <i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i> outer membrane protein
HSP	Proteínas de choque térmico	Heat shock protein
ICC	Infusión cerebro corazón	Brain Heart Infusion Broth
Ig	Inmunoglobulina	Immunoglobulins
IL-4, 5, 8, 12, etc.	Interleucina 4, 5, 8, 12, etc.	Interleukin
iNOS	Enzima óxido nítrico sintasa inducible	Inducible nitric oxide synthase
LPS	Lipopolisacárido	Lipopolysaccharide
MALT	Tejido linfóide asociado a las mucosas	Mucosa-associated lymphoid tissue
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad	Major histocompatibility complex
NEMO	Modulador esencial NF-κB	NF-kappa-B essential modulator
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Óxido nítrico	Nitric oxide
NOD	Proteína que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos	Nucleotide-binding oligomerization domain
NLR	Dominio de oligomerización de unión a nucleótido	NOD-like receptor
OD	Densidad óptica	Optical density
OipA	Proteína inflamatoria de membrana externa	Outer inflammatory protein A
OMP	Proteínas de la membrana externa	Outer membrane protein

OMS	Organización Mundial de la Salud	World Health Organization
OMV	Vesículas de membrana externa	Outer membrane vesicles
PAMP	Patrones de moléculas asociadas a patógenos	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Buffer de fosfato salino	Phosphate buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	Polymerase chain reaction
PMN	Leucocito polimorfonuclear	Polymorphonuclear leukocyte
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones	Pattern recognition receptor
QS	<i>Quorum sensing</i>	
RNA	Ácido ribonucleico	Ribonucleic acid
ROS	Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
RPMI	Medio de Roswell Park Memorial Institute	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa	Reverse transcription polymerase chain reaction
SabA	Adhesina de unión a ácido siálico	Sialic acid binding adhesión
SDS	Dodecilsulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate
SPE	Sustancias poliméricas extracelulares	Extracellular polymeric substances
SSF	Solución salina fisiológica	Physiological saline solution
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta	Transforming growth factor beta
TLR	Receptores tipo <i>toll</i>	Toll like receptors
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa	Tumor necrosis factor-alpha
Treg	Linfocitos T reguladores	Regulatory T lymphocytes
UFC	Unidades formadoras de colonias	Colony-forming unit
VacA	Citotoxina vacuolizante	Vacuolating cytotoxin A

RESUMEN

Helicobacter pylori es un bacilo Gram negativo causante de gastritis crónica que presenta propiedades inmunomoduladoras y posee la capacidad de desarrollar biopelículas (BFs). El objetivo principal del presente trabajo fue analizar el efecto y asociación de la BF de *H. pylori* sobre la respuesta inmune. Para ello, se determinaron las condiciones óptimas para que la bacteria desarrollara BF *in vitro*, asociadas a medios de cultivo y suplementos. También se estudió el efecto de los componentes celulares de la bacteria planctónica y su BF sobre la activación del factor nuclear NF- κ B de leucocitos humanos, así como en la interacción de estos componentes con células fagocíticas. Se estableció la correlación de factores transcripcionales en la diferenciación de células T, con la presencia de BF en pacientes con sintomatología asociada a gastritis. Así, se obtuvieron como resultado, las condiciones adecuadas para el desarrollo de la BF *in vitro* y además, al evaluar el efecto de partículas sonicadas de *H. pylori* planctónica y su BF sobre la activación de NF- κ B y la fagocitosis de *Staphylococcus aureus*, se encontró que la presencia y tipo de sonicado afecta la respuesta del NF- κ B así como al proceso de fagocitosis y actividad bactericida de las células fagocíticas. Finalmente en un estudio comparativo de perfiles transcripcionales de la respuesta inmune en biopsias gástricas humanas, se encontró, ante la presencia de BF por *H. pylori*, una correlación (Spearman , ρ) significativa para FOXP3 que es un perfil relacionado a una respuesta de tipo regulador del sistema inmune. Y además, una alta correlación del perfil Tbet asociado a inflamación en pacientes con presencia de bacteria planctónica. De tal forma que, nuestros resultados sugieren que la BF de *H. pylori* puede inducir una respuesta reguladora del sistema inmune que permite que la infección causada por esta bacteria sea persistente a su tratamiento.

Palabras clave: biopelícula, gastritis, inmunomodulador, *in vitro*, planctónica.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a Gram-negative bacillus that causes chronic gastritis and exhibits immunomodulatory properties and the ability to develop biofilms (BFs). The main objective of this study was to analyze the effect and association of *H. pylori* BF on the immune response. Optimal conditions for the bacteria to develop BF in vitro, associated with culture media and supplements, were determined. The effect of the cellular components of the planktonic bacteria and its BF on the activation of the nuclear factor NF- κ B in human leukocytes, as well as on the interaction of these components with phagocytic cells, was also studied. A correlation between transcriptional factors in T cell differentiation and the presence of BF in patients with gastritis-associated symptoms was established. Thus, the appropriate conditions for the development of BF in vitro were obtained and, in addition, when evaluating the effect of sonicated particles of planktonic *H. pylori* and its BF on the activation of NF- κ B and the phagocytosis of *Staphylococcus aureus*, it was found that the presence and type of sonicate affects the response of NF- κ B as well as the process of phagocytosis and bactericidal activity of phagocytic cells. Finally, in a comparative study of transcriptional profiles of the immune response in human gastric biopsies, a significant correlation (Spearman , ρ) was found for FOXP3 in the presence of *H. pylori* BF, which is a profile related to a regulatory response of the immune system. A high correlation was also found for the Tbet profile associated with inflammation in patients with the presence of planktonic bacteria. Thus, our results suggest that *H. pylori* BF can induce a regulatory response of the immune system that allows the infection caused by this bacteria to persist despite treatment.

Keywords: biofilm, gastritis, immunomodulator, *in vitro*, planktonic.

I. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa asociada a infecciones consideradas como problemas de salud pública, tales como la enfermedad ulcerosa péptica, ciertas formas de cáncer gástrico y el linfoma gástrico del tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT, por sus siglas en inglés), en las cuales desempeña un papel patogénico esencial.

Los países en desarrollo poseen tasas de prevalencia de la infección por *H. pylori* más altas que en los países desarrollados. Varios factores, como la edad, el género, la educación, el estilo de vida, el estado de salud, el número de miembros de la familia y el estado financiero y el área de residencia, podrían afectar la prevalencia de *H. pylori* en la población (Zhang et al., 2021).

Los factores de patogenicidad de la bacteria involucran factores metabólicos que le permiten alterar con éxito el nicho ambiental extremo en el hospedero, para su propio beneficio. Además, presenta factores de virulencia que provocan respuesta inflamatoria y que alteran la homeostasis de los tejidos. *H. pylori* tiene la capacidad de formar biopelículas (BFs), las cuales son comunidades de microorganismos que forman agregados rodeados por una matriz extracelular que ellos mismos producen. La capacidad de formar estas estructuras podría estar involucrada en la resistencia de *H. pylori* durante la infección.

Diversos estudios indican que *H. pylori* presenta propiedades inmunomoduladoras que favorecen la resistencia de la bacteria durante la infección. En el presente trabajo se evaluará la participación de la BF por *H. pylori* *in vitro* e *in vivo* en la activación de componentes involucrados en la respuesta inmune innata y específica. La evaluación de las BFs, así como de los componentes involucrados en la respuesta inmune en la infección por *H. pylori*, proporcionará conocimientos que podrán conducir al desarrollo de terapias más efectivas para su erradicación.

II. ANTECEDENTES

1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es una bacteria microaerófila, Gram negativa, de crecimiento lento y forma helicoidal con abundantes flagelos unipolares. Está presente en el 50 % de la población mundial y la infección por esta bacteria es un factor de riesgo de gastritis crónica y úlcera péptica, además es reconocida como carcinógeno de clase I por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Zeng et al., 2022).

En 1984, Marshall y Warren describieron la presencia de bacilos curvados o espirales encontrados en muestras de mucosa gástrica en 58 de 100 pacientes que presentaban lesiones del sistema digestivo como úlceras duodenales o pépticas. Las bacterias identificadas eran Gram negativas, flageladas y microaerófilas y fueron clasificadas como una nueva especie del género *Campylobacter* (Marshall & Warren, 1984). Hasta ese tiempo, era una bacteria espiral nunca cultivada. Por su morfología y requerimientos atmosféricos para el crecimiento, la nombraron inicialmente *C. pyloridis*. Finalmente, gracias a la realización de análisis de DNA, este microorganismo fue asignado dentro de un nuevo género denominado *Helicobacter* y la bacteria es hoy conocida como *H. pylori* (Cava, 2003).

Clasificación taxonómica de *H. pylori*:

Dominio:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Clase:	Epsilonproteobacteria
Orden:	Campylobacterales
Familia:	Helicobacteraceae
Género:	<i>Helicobacter</i>
Especie:	<i>pylori</i>

2. Epidemiología de las enfermedades por *H. pylori*

Helicobacter pylori es causante de la enfermedad bacteriana con mayor prevalencia en el humano, ya que afecta a más de la mitad de la población mundial, responsable de enfermedades digestivas y extradigestivas. Al mismo tiempo, el riesgo de infección por este

microorganismo es hasta del 90%, y por otro lado, es de relevancia considerar que esta bacteria puede persistir en el estómago durante toda la vida del paciente (Pérez Bastán et al., 2021), sin síntomas aparentes.

Los estudios epidemiológicos han aclarado que la prevalencia de enfermedades gastroduodenales graves depende de la ascendencia y los factores patogénicos de *H. pylori*, origen étnico y geográfico de las personas infectadas y susceptibilidad del huésped (Bakhti et al., 2020). El principal determinante de la prevalencia de la infección es el nivel socioeconómico, ya que influyen los niveles de higiene, saneamiento, densidad de población y educación. Lo que explica por qué la prevalencia de la infección es generalmente mayor, y casi omnipresente en los subconjuntos más pobres, de países en desarrollo (World Gastroenterology Organisation, 2021).

Aunque la infección sigue siendo muy común en los países en desarrollo, en las últimas décadas se ha observado una disminución constante, tanto en la prevalencia de la infección por esta bacteria como en la incidencia de cáncer gástrico en la mayoría de las poblaciones, principalmente en las sociedades occidentales ricas (Figura 1). La asociación de los genotipos de *H. pylori* con el riesgo de cáncer gástrico ha sido ampliamente influenciada por el origen étnico/geográfico a nivel mundial (Bakhti et al., 2020).

En México, la media nacional de seroprevalencia de *H. pylori* reportada en la población general es del 66%. El incremento en la tasa de mortalidad por cáncer gástrico ha incrementado con el tiempo, pasando de 4.5 por cada 100 000 habitantes en 1980 a 6.5 por cada 100 000 habitantes en un periodo de 10 años (Ladrón et al., 2019). En México, la prevalencia también depende de la zona geográfica, encontrándose que en niños del estado de Guerrero, la infección es mayor que en los de la Ciudad de México y Monterrey (59.6% vs. 35–38%, respectivamente) (Borka et al. 2022).

Un grave problema asociado a la erradicación de infecciones por *H. pylori* está relacionado con el tratamiento, el cual sigue siendo un desafío, debido al incremento en casos de resistencia a los antibióticos. En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a *H. pylori* como patógeno de “alta prioridad” para el cual se deben desarrollar antibióticos para erradicar esta bacteria (Nista et al., 2022).

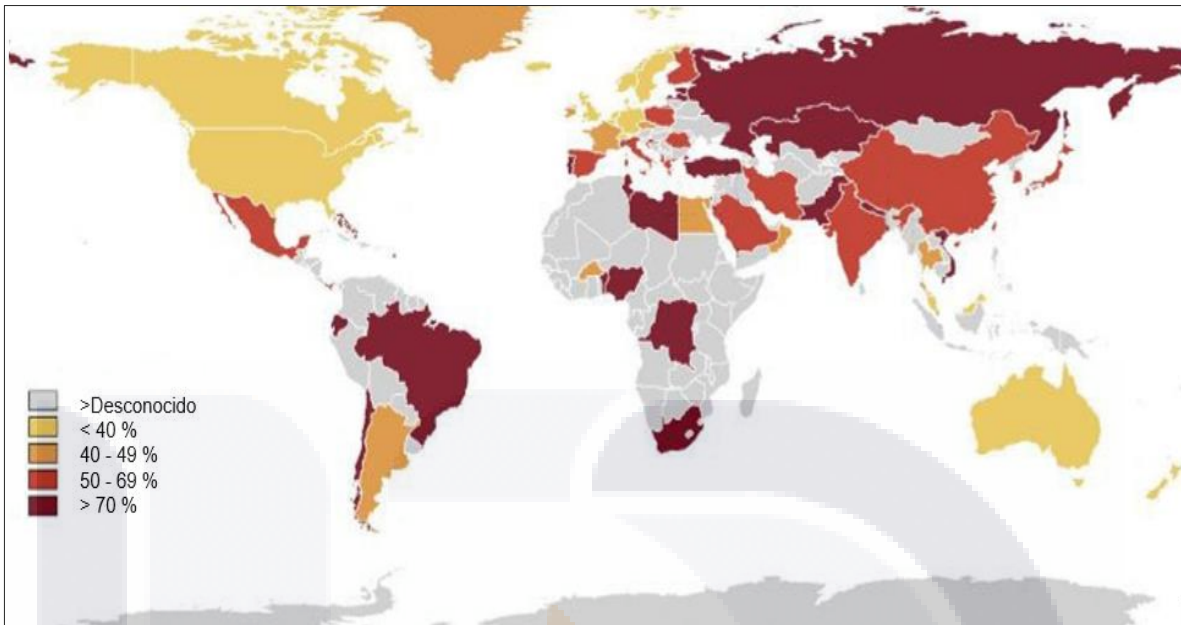


Figura 1. Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* (modificado de Hooi et al., 2017)

3. Fisiopatología

“La colonización gástrica por *H. pylori* induce gastritis histológica pero solo una minoría presenta signos clínicos. Pacientes *H. pylori*-positivos tienen un riesgo del diez al veinte por ciento de desarrollar enfermedad ulcerosa y del uno al dos por ciento de desarrollar cáncer gástrico distal” (Figura 2) (Kusters et al., 2006).

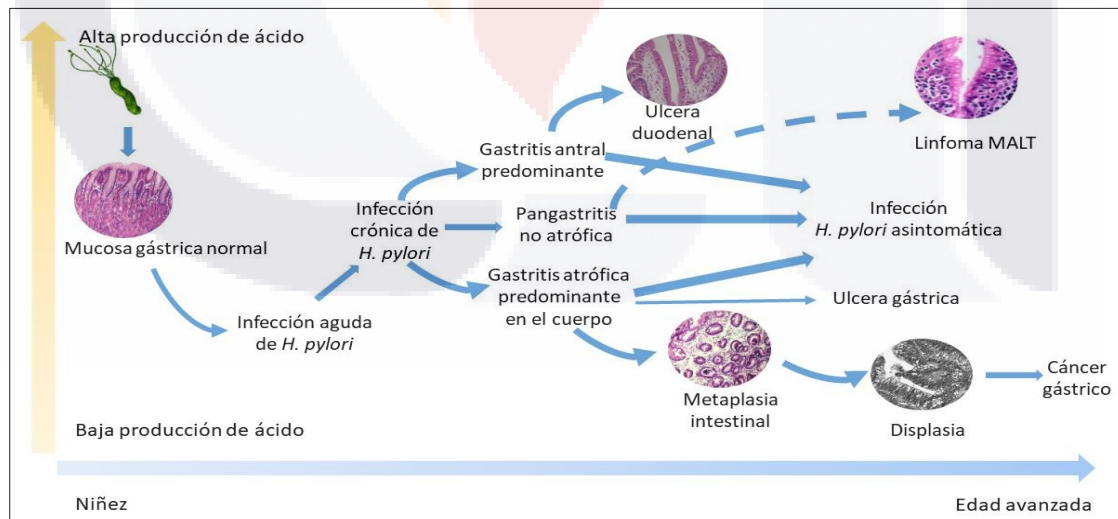


Figura 2. Historia natural de la infección por *Helicobacter pylori*. La bacteria generalmente se adquiere en la infancia (modificada de Suerbaum y Michetti, 2002).

3.1. Gastritis

De acuerdo con Kuster et al. (2006), la colonización con *H. pylori* conduce a la infiltración de la mucosa gástrica con células neutrofílicas y mononucleares. Esta gastritis activa crónica es la afección principal relacionada con la colonización por esta bacteria y, en particular, otros trastornos asociados a *H. pylori* son el resultado de este proceso inflamatorio crónico.

3.2. Úlcera péptica

Las úlceras ocurren principalmente en sitio donde la inflamación de las mucosas es severa (Van Zanten et al., 1999). En la zona de transición gástrica (entre el cuerpo y el antro), da lugar a úlceras gástricas. Cuando la producción de ácido es de normal a alta, la inflamación más grave se encuentra en el estómago distal y el duodeno proximal (úlceras yuxtapilóricas y duodenales).

Un factor de virulencia bacteriano como la positividad del gen *cagA* se encuentra mayoritariamente en pacientes con úlcera péptica, por lo tanto, puede existir una asociación entre la positividad de *cagA*, la úlcera péptica y la erradicación efectiva de *H. pylori* (Vilaichone y Mahachai, 2013)

3.3. Dispepsia no ulcerosa

La dispepsia no ulcerosa o funcional se define como la presencia de síntomas de malestar gastrointestinal superior sin ninguna anomalía estructural identificable durante la evaluación diagnóstica, al menos en la endoscopia gastrointestinal superior. Treinta a sesenta por ciento de los pacientes con dispepsia funcional son portadores de *H. pylori* (Kusters et al., 2006).

3.4. Gastritis atrófica, metaplasia intestinal y cáncer gástrico

La inflamación crónica puede conducir a la pérdida de la arquitectura normal de la mucosa. La gastritis atrófica y metaplasia intestinal ocurre en aproximadamente la mitad de la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

población colonizada por *H. pylori*, primero en aquellos sujetos y sitios donde la inflamación es más severa (Kuipers et al., 1995).

La colonización por *H. pylori* aumenta el riesgo de cáncer gástrico aproximadamente 10 veces y la OMS ha designado a *H. pylori* como carcinógeno de clase I, como ya se mencionó antes. La evidencia de que *H. pylori* aumenta el riesgo de desarrollo de cáncer gástrico a través de la atrofia y metaplasia, se origina en varios estudios en los que se demostró que los sujetos *H. pylori* positivos desarrollan estas afecciones con más frecuencia que los controles no infectados y esto está respaldado por las asociaciones geográficas entre su prevalencia y la incidencia de cáncer gástrico (Kusters et al., 2006).

3.5. Linfoma gástrico MALT

En el curso de la gastritis crónica pueden aparecer agregados linfáticos, lo que constituye el tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT), y es el sustrato anatómico necesario para que se desarrolle un linfoma MALT (Ferreira y Terramoto, 2002).

El proceso incluye destrucción de foveolas gástricas y erosión de la mucosa. La presentación endoscópica de linfoma gástrico primario se caracteriza por patrones no específicos como úlceras múltiples o gigantes y lesiones elevadas, así como erosiones, nódulos pequeños, engrosamiento de pliegues gástricos, eritema. La mayoría de los linfomas gástricos primarios se localizan en el antro, seguidos por el cuerpo y fondo. El tratamiento de erradicación de *H. pylori* se considera el tratamiento inicial en pacientes con diagnóstico de MALT localizado con evidencia de infección por dicha bacteria (Balanza et al., 2020).

3.6. Trastornos extragastroduodenales

Helicobacter pylori se ha relacionado con una variedad de trastornos extragástricos: enfermedad coronaria, rosácea, urticaria idiopática, enfermedad tiroidea autoinmune, púrpura trombocitopénica y síndrome de Guillain-Barré. Los mecanismos hipotéticos subyacentes incluyen la activación crónica de bajo grado de la cascada de la coagulación, la aceleración de la aterosclerosis y el mimetismo antigénico entre *H. pylori* y los epítomos del hospedero que conducen a trastornos autoinmunitarios (Kusters et al., 2006).

4. Características microbiológicas

Helicobacter pylori presenta las características estructurales de los bacilos Gram negativos, posee una membrana externa y una interna. Es un bacilo delgado helicoidal, pequeño y curvo. Mide aproximadamente 3 μm de largo y 0,5 μm de ancho (Figura 3).

Esta bacteria posee múltiples flagelos polares (en penacho), entre 4 a 6, que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, que protege a los flagelos de degradación por el medio ácido (Alarcón et al, 2004). Los flagelos de *H. pylori* no solo aumentan su movilidad, sino que también tienen funciones esenciales en el inicio de la quimiotaxis y la formación de BFs, desencadenando la inflamación gástrica y permitiendo la evasión inmunitaria (Mărginean et al, 2022). La bacteria no forma esporas ni cápsula y su pared celular es similar a la de otras bacterias Gram negativas (Gil, 2018). El lipopolisacárido (LPS) es el componente principal de su pared celular y contribuye a su integridad estructural. El LPS de *H. pylori* consta de una cadena de polisacárido O-específica, un oligosacárido central y una parte lipídica llamada lípido A. Si bien el LPS suele ser altamente tóxico para el huésped, el de *H. pylori* tiene una baja activación de la respuesta inmunológica del huésped (Oleastro y Ménard, 2013).

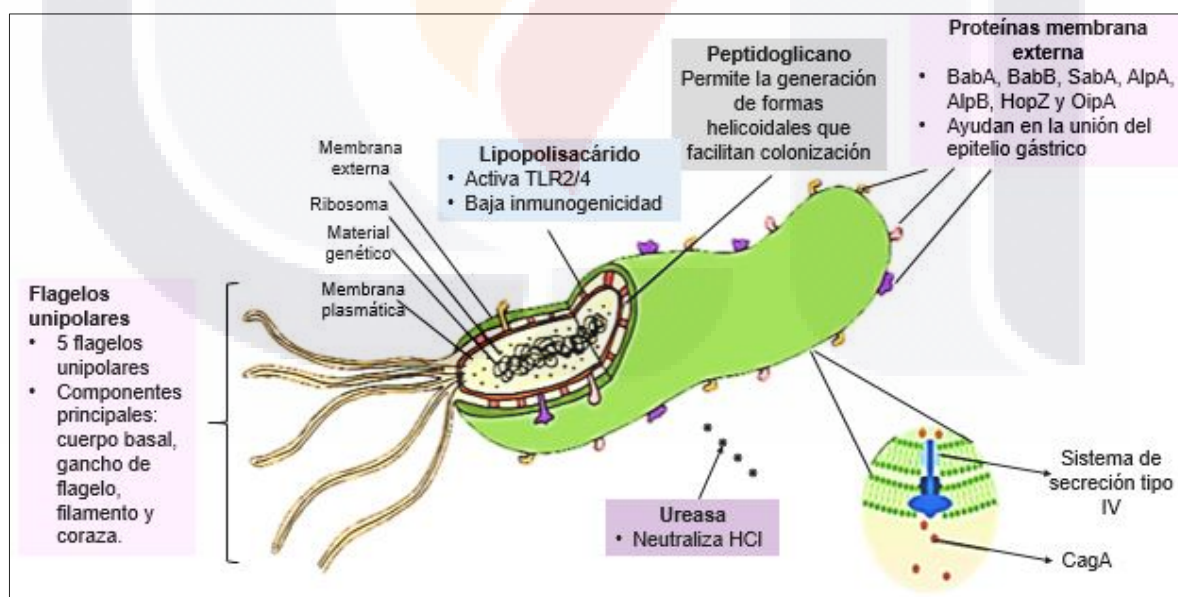


Figura 3. Características estructurales de *H. pylori* indicando sus factores de virulencia. Modificado de <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122502>.

Para el cultivo e identificación morfofisiológica de *H. pylori* se utilizan medios enriquecidos con sangre y una atmósfera microaerófila con incubación por 4 días. Tras la incubación se pueden apreciar colonias pequeñas, brillantes e incoloras, que microscópicamente presentan principalmente forma bacilar Gram negativa. La actividad enzimática positiva se demuestra mediante las pruebas ureasa, catalasa y oxidasa. Es importante considerar que *H. pylori* es resistente a vancomicina, cefsulodina, polimixina, trimetoprim/sulfametoxazol y anfotericina B10 (López-Brea y Alarcón, 2005).

Helicobacter pylori se presenta clásicamente como bastoncillos retorcidos en espiral, mientras que su alta heterogeneidad contribuye a la presencia de varias formas celulares, que incluyen bastoncillos rectos o curvos, formas alargadas (filamentosas) o formas cocoides. La transformación morfológica a formas esféricas va acompañada de una disminución del tamaño celular y de la actividad metabólica, lo que se traduce en una transición a un fenotipo viable pero no cultivable (Krzyżek y Grande, 2020).

5. Mecanismos de infección y patogenicidad

Helicobacter pylori ingresa por la boca y desciende hasta la superficie de la capa de mucus de las células epiteliales del fundus y antro pilórico (Torres y Torres, 2016) (Figura 4).

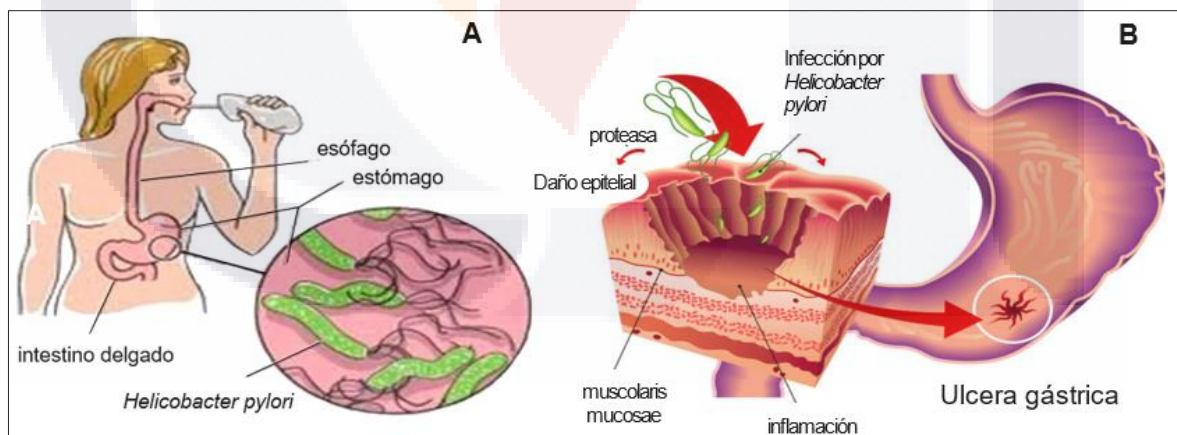


Figura 4. Mecanismos de infección por *Helicobacter pylori* (Yonezawa et al., 2015). **A.** Ingreso de la bacteria por vía oral. **B.** Desarrollo de la infección y sus síntomas

En el comienzo de la infección, *H. pylori* utiliza la actividad enzimática de la ureasa para neutralizar la condición ácida hostil. La ureasa convierte la urea en amoníaco y carbamato,

este último se descompone espontáneamente en otra molécula de amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco producido por esta reacción aumenta el pH (Kusters et al., 2006).

La motilidad mediada por flagelos es entonces requerida para que *H. pylori* se mueva hacia el epitelio gástrico del hospedero seguida por interacciones específicas entre adhesinas de la bacteria (la proteína A de unión al antígeno sanguíneo, la adhesina de unión al ácido siálico y otras proteínas de membrana externa) con los receptores de la célula del hospedero, lo que conduce al éxito de la colonización e infección persistente (Cheng-Yen et al., 2016).

En resumen, cuatro pasos son críticos para la colonización y patogenia (Figura 5) (Cheng-Yen et al., 2016):

- (1) Supervivencia en condiciones estomacales ácidas;
- (2) Movimiento hacia las células epiteliales mediante los flagelos;
- (3) Unión a los receptores del hospedero mediante adhesinas;
- (4) Daño tisular causado por la liberación de toxinas.

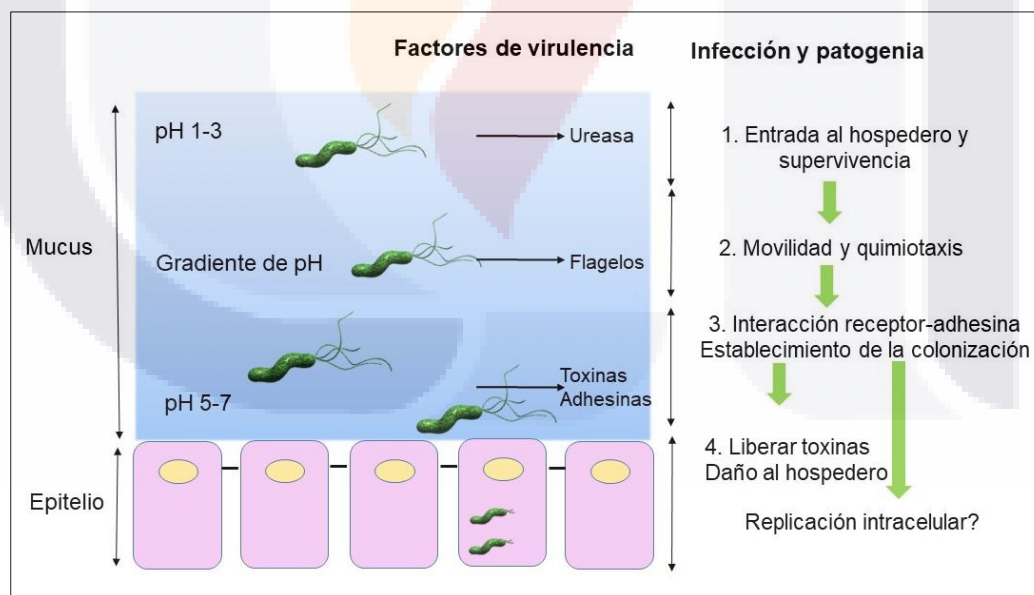


Figura 5. Diagrama esquemático de la infección y patogenia por *Helicobacter pylori* (modificado de Cheng-Yen et al, 2016).

5.1. Factores de patogenicidad y virulencia

El proceso patogénico de *H. pylori* consta de tres pasos: (1) colonización, (2) escape inmunitario e (3) inducción de enfermedades. La colonización de la mucosa se debe a un conjunto de enzimas agresivas (ureasa, mucinasa, peptidasas, etc.) que la vuelven patógena.

Además de los factores de patogenicidad como la movilidad, adhesinas en su superficie, producción de proteasas y lipasas, se encuentra también la ureasa y citotoxinas que lesionan las células epiteliales gástricas (Pop et al., 2022). Asimismo, expresa factores de virulencia, particularmente asociados a islas de patogenicidad. Libera proteínas/toxinas efectoras, como la citotoxina asociada al gen A (CagA) y la citotoxina vacuolizante A (VacA), causando daño al tejido del hospedero. Estos factores metabólicos le permiten alterar el nicho ambiental extremo para su propio beneficio (Figura 6).

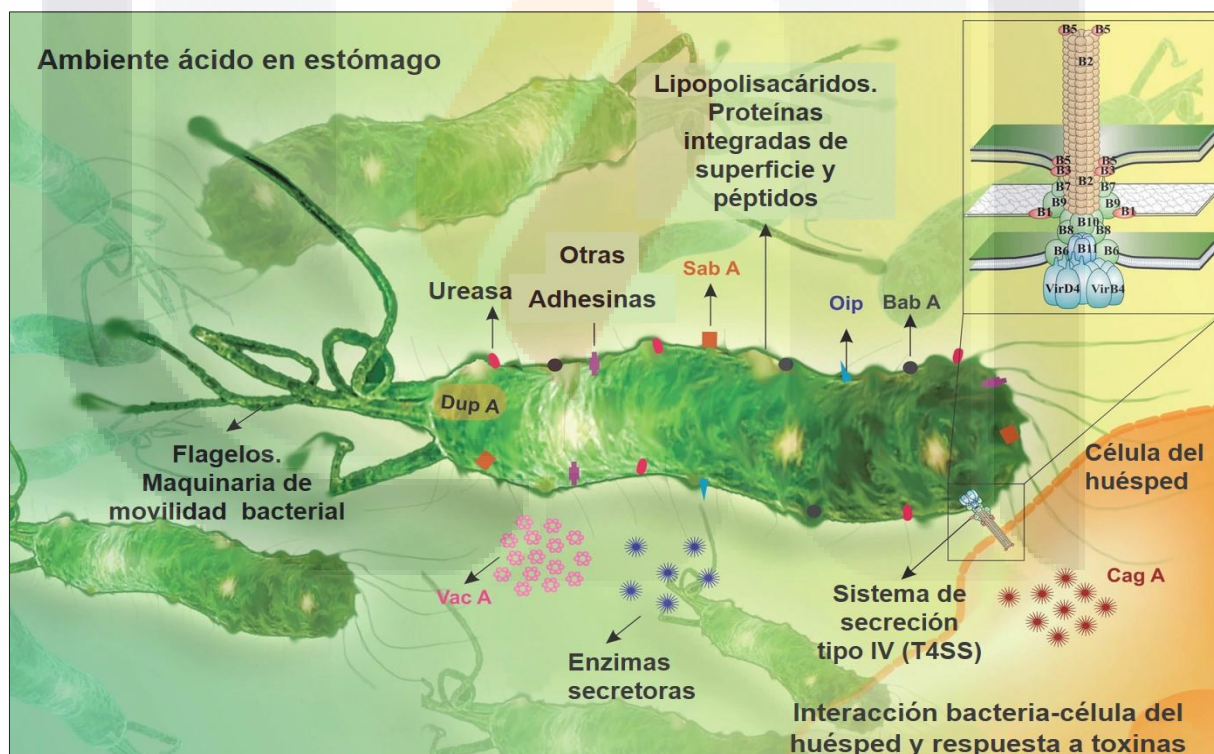


Figura 6. Factores de patogenicidad y virulencia de *H. pylori*. Los factores están involucrados ya sea en la interacción bacteria-hospedero o incluso, en la evasión del sistema inmune (Tomado de Maleki, 2019). Para las abreviaturas revisar la sección de acrónimos en este documento.

5.1.1. Adhesinas

Las adhesinas son proteínas de la superficie celular que permiten la adherencia bacteriana a las células. La adherencia de *H. pylori* a la mucosa gástrica es importante para la protección de mecanismos como el pH ácido, el moco y la exfoliación. Los factores adhesivos de *H. pylori* pertenecen a la familia más grande de proteínas de la membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés) de la bacteria, la familia Hop. La familia Hop contiene las adhesinas más conocidas de *H. pylori* como la proteína de adhesión a los antígenos de Lewis B (BabA del inglés blood antigen binding adhesión), la adhesina de unión a ácido siálico (SabA: sialic acid binding adhesión), la lipoproteína asociada a la adherencia (AlpA y AlpB: adherence-associated lipoprotein A and B), la proteína de membrana externa de *H. pylori* (HopZ: *Helicobacter pylori* outer membrane protein) y la proteína inflamatoria de membrana externa (OipA: outer inflammatory protein A) (Kalali et al, 2014).

5.1.2. Isla de patogenicidad o sistema de secreción

Los factores de virulencia bacteriana contribuyen a la respuesta inflamatoria hacia *H. pylori*, ya sea alterando las vías de señalización del hospedero importantes para mantener la homeostasis tisular en las células epiteliales o estimulando diferencialmente las células inmunitarias innatas. Tanto la isla de patogenicidad cag (PAI), CagA como VacA son las mejor caracterizadas (Kalali et al, 2014).

5.1.2.1. CagPAI

La proteína CagA es una proteína con una masa molecular de aproximadamente 140 kDa, altamente inmunogénica codificada por el gen *cagA*. Este gen está presente en aproximadamente del 50 al 70% de las cepas de *H. pylori* (Kusters et al., 2006). La integridad de *cagPAI* parece tener un papel importante en el progreso de los trastornos gastroduodenales, por lo que un intacto *cagPAI* podría verse en cepas de *H. pylori* de países con mayor tasa de cáncer gástrico (Hanafiah et al., 2020).

Dieciocho de las proteínas codificadas por *cagPAI* sirven como bloques de construcción de un aparato de secreción de tipo IV, los principales cambios celulares que ocasiona son la

interrupción de las señales mitogénicas, cambios en las uniones célula-célula y la exacerbación de la actividad de las vías inflamatorias (Oliveira et al., 2021).

Después de ingresar al citoplasma de las células gástricas, CagA es fosforilada por cinasas en los dominios EPIYA (glutamato/prolina/isoleucina/tirosina/alanina). Una vez fosforilada, la proteína puede desregular el proceso de señalización normal en las células provocando cambios en el metabolismo celular del huésped, como proliferación celular, apoptosis y mantenimiento de la estructura normal del citoesqueleto, requisito previo para la transformación neoplásica. Además, la presencia de CagA induce una mayor producción de interleucina (IL)-8 por parte de las células epiteliales que es una citocina activadora de linfocitos y neutrófilos en respuesta a infecciones bacterianas (Brasil-Costa et al., 2022). Existe entonces, un mayor riesgo de consecuencias clínicas graves de la infección con el gen A (*cagA*) positivo asociado a esta citotoxina de *H. pylori* que con la cepa negativa (Zhong et al., 2021).

5.1.2.2. VacA

Todas las cepas de *H. pylori* portan el gen *vacA*, que codifica para la proteína secretada formadora de poros o citotoxina VacA. Los niveles de expresión, la toxicidad específica del tipo celular y la gravedad de la enfermedad están relacionados con la variación de la secuencia en diferentes dominios de VacA. Es secretada por la bacteria a través de un sistema de secreción de autotransporte de tipo V y entra en las células del hospedero por endocitosis. Una vez internalizada, VacA se acumula dentro de diferentes compartimentos celulares e induce la apoptosis. Además, VacA interrumpe las conexiones estrechas de las células epiteliales y se distribuye en la lámina propia donde se encuentran las células T reclutadas en los sitios de infección. Como resultado, se inhiben la proliferación de células T y las funciones efectoras, lo que permite la persistencia de la bacteria (Muller, 2011).

La citotoxina VacA está presente en todas las cepas de *H. pylori* y su patogenicidad depende de la diversidad polimórfica en sus regiones señal (s) e media (m) en el gen que la codifica: s-región con alelos variable s1 o s2 y la m-región con alelos variables m1 o m2. Hay cuatro proteínas quiméricas que pueden generarse por la combinación de estos alelos: s1m1, s1m2, s2m1 y s2m2. Estas combinaciones de alelos determinan la actividad

vacuolizante de la citotoxina y, por ende, influyen en la patogenicidad de la bacteria (Li et al., 2019).

5.1.2.3. *dupA*

El gen *dupA* (en inglés duodenal ulcer promoting gene) es un factor de virulencia de *H. pylori* interesante, aún no completamente caracterizado que ha sido asociado a ulceración duodenal y aumento de la inflamación gástrica. Este gen ha sido considerado como un marcador de las úlceras pépticas por algunos autores, pero en otros estudios, la asociación no ha podido vincularse (Idowu et al., 2019).

6. Evasión de la respuesta inmune por *H. pylori*

El hecho de que la bacteria permanece en el estómago a una densidad alta a pesar de la respuesta del hospedero indica que, por definición, la respuesta del sistema inmunitario es ineficaz. Además, la inflamación persistente por años también apoya la noción de que la respuesta inmune está desregulada.

6.1. Inhibición en inmunidad innata

El sistema inmunitario innato representa la “primer línea de defensa” en la respuesta a patógenos. Una activación inespecífica por varios estímulos de microorganismos puede conducir a importantes efectos antimicrobianos pero también puede resultar en inflamación y lesiones debido a la liberación de sustancias inflamatorias como citocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) (Wilson y Crabtree, 2007).

Helicobacter pylori evade el sistema inmunológico innato mediante una variedad de mecanismos y uno de estos mecanismos es evitar la detección por receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés), que son proteínas que reconocen patrones de moléculas asociadas a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés). Los PAMP incluyen un gran grupo de moléculas que son parte de los microorganismos y pueden variar desde moléculas de la superficie microbiana hasta los ácidos nucleicos. La mayoría de los PRR pueden clasificarse en una de las cinco familias definidas por dominios homólogos entre los integrantes. Estas cinco familias son: los receptores tipo toll (TLR, por

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sus siglas en inglés), los receptores de lectina tipo C (CLR, por sus siglas en inglés), los receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótido o tipo NOD (NLR, por sus siglas en inglés), los receptores similares al gen I inducibles por ácido retinoico o receptores tipo RIG (RLR, por sus siglas en inglés) y los sensores de DNA citosólico (CDS, por sus siglas en inglés) (Díaz et al., 2017).

6.1.1. Estímulos que activan a NF- κ B

Varios tipos de PRR y prácticamente todos los miembros de la familia de TLRs que reconocen una gran variedad de antígenos infecciosos, convergen en algún momento en la traslocación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, por sus siglas en inglés) (López-Bojorques, 2004).

El NF- κ B es un factor de transcripción citoplásmico, su activación está estrechamente regulada por proteínas inhibidoras llamadas I κ B, unidas no covalentemente a NF- κ B, las cuales previenen su traslocación al núcleo. A través de moléculas como el factor de necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés)- α , se llega a la fosforilación y a la degradación proteosómica de I κ B α , liberándose el NF- κ B, el cual migra hasta el núcleo donde regula la expresión de varios genes, incluyendo los implicados en la inflamación y en la supervivencia celular” (Olivares et al, 2005). La variedad de estímulos que activan NF- κ B sugiere que muchas vías de transducción están involucradas en su traslocación (López-Bojorquez y Nikolaia, 2004). Dos rutas de señalización conducen a la activación de NF- κ B, la ruta clásica o canónica (Figura 7) y la ruta alternativa o no canónica.

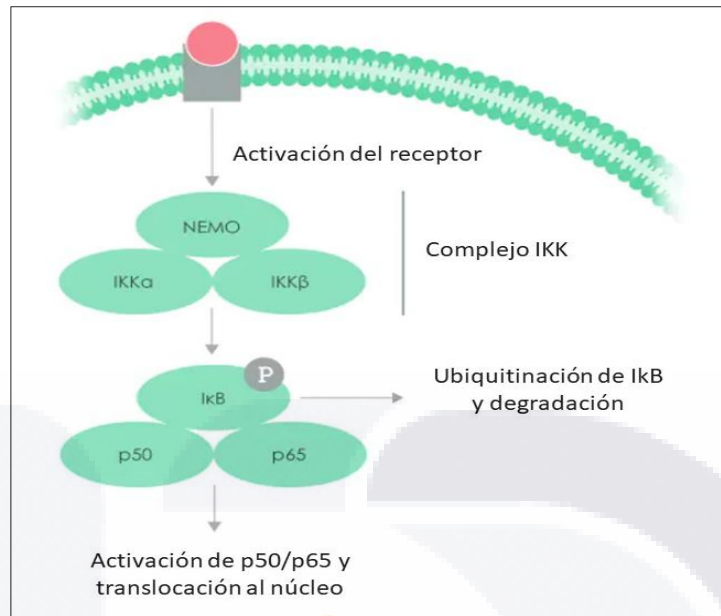


Figura 7. Ruta canónica de activación de NF- κ B. La unión del ligando a un receptor conduce al reclutamiento y activación de un complejo IKK que se compone de subunidades catalíticas IKK α y/o IKK β y de dos moléculas de NEMO. El complejo IKK fosforila a continuación el I κ B, lo que lleva a la degradación por el proteasoma. El NF- κ B se transloca a continuación al núcleo para activar genes objetivo.

6.1.2. Evasión de reconocimiento por patrones

La respuesta inmune contra *H. pylori* es iniciada por el reconocimiento de los PAMP por los PRR en las células inmunitarias epiteliales e innatas, seguida de la iniciación de la respuesta inmunitaria adaptativa, todo para eliminar patógenos. Sin embargo, *H. pylori* aplica vías de evasión de la inmunidad al tiempo que causa diferentes trastornos gastrointestinales (Karkhah et al., 2019).

Algunos de los mecanismos utilizados para evadir la respuesta inmune innata incluyen la mediación de la señalización de TLR y CLR, además del uso de mimetismo molecular. Para evitar el reconocimiento por parte de los TLR, los lipopolisacáridos (LPS) de *H. pylori* tienen cambios estructurales que reducen su detección por parte de esos receptores, lo que implica la acilación (lípidos A tetraacilados) y la ausencia de grupos fosfato en las posiciones 1' y 4' del lípidos A. (Garrido et al., 2022).

Con relación a los TLR, varios se han asociado a la respuesta inmune innata, así como a las patologías. La respuesta inmune innata inducida por *H. pylori* está mediada, al menos parcialmente, a través de TLR2 (Uno et al., 2007), el cual reconoce ácido lipoteicoico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

bacteriano y lipopéptidos que contienen cisteína di- y tri-acilada (Sokolova y Naumann, 2021). Aunque generalmente se considera que TLR2 responde al péptidoglucano y a lipoproteínas derivadas de bacterias Gram positivas y micobacterias, el LPS de *H. pylori* induce reacciones proinflamatorias, a través de TLR2 más que TLR4 (Pachathundikandi et al., 2011).

El TLR4 se relaciona con el reconocimiento de LPS presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Se ha demostrado que *H. pylori* elude la identificación por TLR4 debido a la capacidad que tiene de modificar el lípido A del LPS para generar una molécula con propiedades considerablemente menos endotóxicas en comparación a otras bacterias (Li et al., 2016; Karkhah et al., 2019).

EL TLR5 está considerado como un importante receptor de reconocimiento de flagelina, principal componente del filamento del flagelo en las bacterias. Aunque *H. pylori* desarrolla mutaciones en dicha flagelina para evadir la detección por este receptor (Tegtmeyer et al., 2020).

El TLR9 es un PRR presente de forma intracelular y ligado a la cara interna de membranas endosomales. La principal molécula reconocida por este receptor es el DNA proveniente de microorganismos y su estimulación en células del hospedero genera una activación que induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, estudios recientes realizados en ratones muestran que durante la fase aguda de la infección por *H. pylori* la estimulación de TLR9 se relaciona principalmente con mecanismos que desencadenan señales anti-inflamatorias (Andersen-Nissen et al., 2005), lo cual coloca a este receptor como un posible regulador de la actividad proinflamatoria y antiinflamatoria en presencia de DNA de *H. pylori*.

6.1.3. Inhibición de la muerte por fagocitosis

Los macrófagos, células dendríticas, células B y células del epitelio gástrico se ven influenciados durante la infección por *H. pylori* y, a su vez, contribuyen a la respuesta de la mucosa. Los macrófagos se reclutan en la mucosa gástrica infectada por *H. pylori* y ayudan en la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (Reyes y Peniche, 2019). La bacteria puede inhibir eficientemente su propia captación por los fagocitos profesionales.

Este fenotipo antifagocítico depende de los componentes de secreción de tipo IV codificados por la isla de patogenicidad de genes asociados a citotoxinas (*cag* PAI) (Lina et al., 2014), el cual es capaz de traslocar un factor bacteriano dentro de las células epiteliales que activa al NF- κ B, con la consiguiente inducción de IL-8 (Olivares et al., 2005). Sin embargo, una vez dentro del macrófago, *H. pylori* retrasa activamente la polimerización de actina y la formación de fagosomas. Los fagosomas que contienen *H. pylori* se someten a agrupamiento y fusión extensos que dan como resultado la formación de "megasomas" que contienen abundantes bacterias causando resistencia a la muerte intracelular (Lina et al., 2014).

6.1.4. Inhibición de la muerte por especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico

Helicobacter pylori produce catalasa y superóxido dismutasa para desintoxicar ROS. Además, aunque un mecanismo de defensa antimicrobiano del hospedero es la generación de NO a través de la enzima NO sintasa inducible (iNOS), *H. pylori* persiste, lo que sugiere que la producción de iNOS puede estar en un nivel subóptimo. La activación de la iNOS en macrófagos involucra a la ureasa, uno de sus factores de virulencia importantes (Lina et al., 2014).

6.2. Modulación de las funciones de células presentadoras de antígeno en la inmunidad adaptativa

Las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), representadas por macrófagos, células dendríticas y células B, internalizan el antígeno por fagocitosis o endocitosis, procesan los antígenos y los presentan a células T CD4⁺ a través de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase II. Esto lleva al inicio de la respuesta de células T específicas de antígeno.

Dentro de los perfiles de colaboración de los linfocitos T colaboradores (Th, por sus siglas en inglés) CD4⁺ que se pueden generar, se encuentran, el perfil Th1, Th2, Th17 y Treg. Las células T CD4⁺ son las células efectoras clave de la inmunidad adaptativa en la respuesta inmune a *H. pylori* en comparación con el papel relativamente inactivo de células T CD8 (Karkhah et al., 2019). La activación de las células Th1 y Th17 induce la producción de interferón (IFN)- γ , IL-17 y TNF- α (Bagheri et al., 2018).

Los monocitos y los macrófagos son importantes coordinadores de la respuesta inmune frente a los patógenos, y en el caso de *H. pylori* son probablemente activadores, junto con las células dendríticas, de la inmunidad adaptativa, al producir factores como IL-12 que estimulan las células Th1 para producir citocinas como IFN- γ (Wilson y Crabtree, 2007).

El perfil Th2, relacionado principalmente a respuestas humorales dado que participa en la activación y diferenciación de células B, cuyo factor transcripcional es GATA-3, induce la secreción de IL-4, IL-5 e IL-10. Diversos reportes indican que este perfil se relaciona con un fenotipo que permite la protección inmune hacia la infección de *H. pylori* (Garhart et al., 2003; Saldinger et al., 1998).

El perfil Th17, cuyo factor transcripcional es ROR γ t, se caracteriza por la producción de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22. Por otro lado, este perfil se asocia principalmente con mecanismos de protección frente a infecciones por bacterias extracelulares. En seres humanos el perfil Th17 es un fenotipo inflamatorio que se ha visto relacionado con la erradicación eficiente de *H. pylori* durante la colonización de la mucosa gástrica (Dewayani et al., 2021).

Las células Treg, con el factor transcripcional FoxP3, son una población de células T, en las que Tregs CD4+CD25+ son las más importantes. Estas células tienen funciones reguladoras que difieren de las células T efectoras Th1 y Th2, y se ha demostrado que suprimen la respuesta inmunitaria y, para ello, pueden secretar varias citocinas supresoras, tales como IL-4, IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF, por sus siglas en inglés)- β . Las células Treg CD4+CD25+ endógenas son capaces de suprimir la respuesta inmune de protección eficaz del hospedero frente a los patógenos invasores, lo que resulta en una infección patógena duradera (Gong et al., 2016).

Una descripción esquemática de las vías celulares implicadas en la respuesta a *H. pylori* se ilustra en la Figura 8.

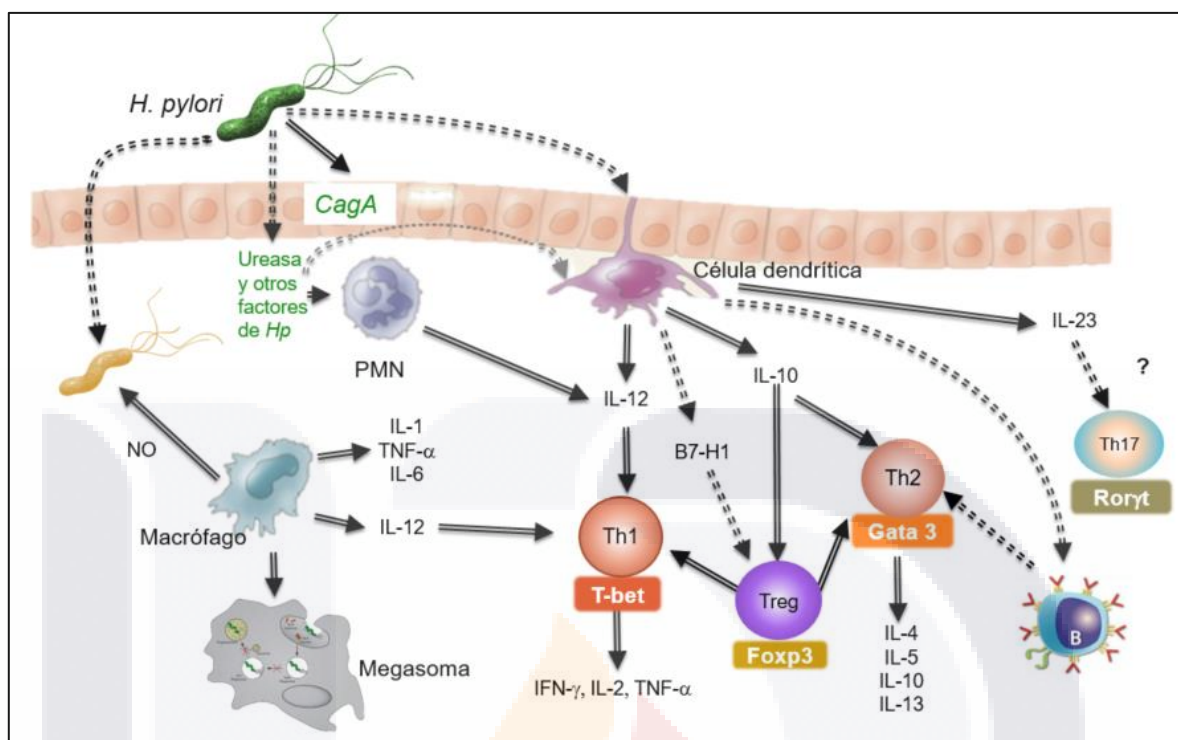


Figura 8. Esquema de la respuesta inmune frente a *H. pylori* en la mucosa gástrica. Las líneas punteadas representan componentes hipotéticos de la inmunopatogénesis. Los elementos en verde se derivan de las bacterias y en negro del hospedero (modificado de Wilson y Crabtree, 2007). Para las abreviaturas revisar la sección de acrónimos en este documento.

6.2.1. Inhibición de la proliferación y señalización de células T

Como se describió anteriormente, VacA, induce vacuolización celular en células epiteliales. *H. pylori* puede alcanzar la lámina propia y, una vez ahí, VacA puede interactuar directamente con las células T. Una vez que VacA está en el citoplasma de las células T, inhibe su proliferación y activación mediante algunos mecanismos. Una de las aproximaciones a dichos mecanismos es interrumpiendo la señalización de IL-2, que se requiere para la activación y proliferación de los linfocitos (Lina et al., 2014).

6.2.2. Evasión de respuesta humoral

Varios investigadores han demostrado que en modelos animales de infección se puede lograr una inmunidad protectora, y algunos antígenos protectores de *H. pylori* ya identificados incluyen la ureasa, VacA, CagA, catalasa y otros como las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés) GroES y GroEL (Kimmel et al., 2000).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Helicobacter pylori induce una respuesta específica humoral con la producción de anticuerpos locales y sistémicos, así como un aumento de células plasmáticas en la mucosa gástrica que producen inmunoglobulina (Ig) A. Otro anticuerpo importante es IgG que al unirse a *H. pylori* potencia la fagocitosis. Estos anticuerpos también activan el complemento por la vía clásica o alternativa. Además de esto, el papel de las IgA secretadas es importante en la neutralización de la ureasa y VacA, así como en la inhibición de la adherencia de *H. pylori* a la mucosa gástrica (Mahdi, 2014).

Aunque la mayoría de las personas infectadas por *H. pylori* desarrollan una respuesta humoral específica normalmente no es suficiente para eliminar la infección. Un estudio sugiere que niños infectados con *H. pylori* producen una baja cantidad de anticuerpos, lo que puede coincidir con más células Treg y menos células T CD4+ activadas para actuar como células auxiliares en la inducción de respuestas de células B (Soares et al., 2006). Finalmente, otro estudio realizado mostró que *H. pylori* evade el reconocimiento mediado por anticuerpos debido a la falta de unión a la superficie de los anticuerpos producidos por el hospedero. Este estudio consistió en incubar bacterias con sueros de pacientes que tenían títulos de anticuerpos detectables frente a *H. pylori*, y la unión de estos a la superficie de la bacteria fue débil, lo que sugiere otra forma en que se puede evadir la respuesta inmune del hospedero (Lina et al., 2014).

7. Formación de biopelículas o biofilms por bacterias

En la naturaleza existen dos estados en las bacterias: bacterias planctónicas (1 %) y las llamadas biopelículas (BFs) (99 %) que son colonias de microorganismos con bacterias sésiles. Las BFs se forman cuando las bacterias se adhieren a una superficie y liberan señales químicas que coordinan diferenciación y formación de su estructura, además del desarrollo de una cubierta polisacárida protectora (Sarduy y González, 2016).

Las biopelículas (BFs) se definen como el crecimiento en la interfase sólido-líquido o sólido-gas formado por las diversas poblaciones bacterianas adheridas a una superficie inerte o a un tejido vivo mediante un proceso de sedimentación formando una estructura que se mantiene cohesionadas mediante la síntesis de una matriz de exopolisacáridos (EPS) por las bacterias que conforman la BF (Gomez et al., 2013).

El término "biopelícula" (BF) fue introducido por J. W. Costerton, en 1985, en un breve informe que presenta fotos microscópicas de microcolonias de *Pseudomonas aeruginosa* que residen en muestras de esputo de una fibrosis quística en un paciente. Aunque la presencia de BFs tiene su aspecto positivo en muchos ecosistemas, las estructuras también ejercen su impacto negativo en el sector biomédico (Krzyżek et al., 2020).

En principio la formación de una BF se establece como parte de los procesos que se pueden presentar en el mecanismo *quorum sensing* (QS). El QS es un proceso de comunicación bacteriano de célula a célula que depende de la densidad de población bacteriana y está mediado por moléculas de señalización difusibles llamadas autoinductores. Las bacterias usan QS para regular diversos conjuntos de funciones, incluida la virulencia y la formación de biopelículas (Zhou et al., 2020).

La capacidad de las células de la BF para sobrevivir en el medio ambiente con concentraciones elevadas de sustancias antimicrobianas se denomina *obstinación* y es un sello distintivo de los fracasos en el tratamiento de los pacientes. Además, las células de la BF tienen significativamente menos sensibilidad a factores fisicoquímicos desfavorables y a la actividad del sistema inmunológico. La reducción de la susceptibilidad de las BFs resulta de los procesos de tolerancia pasiva a los agentes antimicrobianos, esto es, disminución del metabolismo, así como de la matriz que limita la penetración de antibióticos (Lebeaux, 2014).

Estructuralmente, las BFs están constituidas por tres componentes: a) masa microbiana; b) matriz extracelular que rodea el complejo, compuesta de EPS, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias y; c) espacios intercelulares o canales (Costerton et al., 1987).

La composición del EPS es diferente en cada bacteria y estudios recientes han puesto de manifiesto que una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales, también puede producir distintos EPS como componentes de la matriz de la BF (Díaz, 2011).

En menor cantidad se encuentran proteínas, ácidos nucleicos, y productos que proceden de la lisis bacteriana. El conjunto de polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas se conocen

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

bajo el nombre de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés). También puede hallarse materiales no bacterianos, como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, componentes sanguíneos, según sea el medio en el cual se desarrolla la BF. Además, los EPS pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes (Subhadra, 2022).

La formación de la BF está regulada por QS gracias a las señales de un autoinductor. En bacterias Gram negativas, como *H. pylori*, el principal autoinductor es la acil-homoserina lactona (Hou et al., 2022). La formación de la BF (Figura 9), conlleva un proceso sistemático de cinco fases:

- 1) Acondicionamiento de la superficie;
- 2) Adsorción reversible de la bacteria, la unión inicial está impulsada por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, así como por moléculas específicas de la superficie bacteriana;
- 3) Unión irreversible a la superficie;
- 4) Fase inicial de maduración con crecimiento y desarrollo microbiano;
- 5) Producción del exopolímero y desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras.

La biopelícula agrandada muestra una disolución focal y libera células bacterianas planctónicas que pueden propagarse a otros lugares (Cole et al., 2004; Yonezawa et al. 2015).

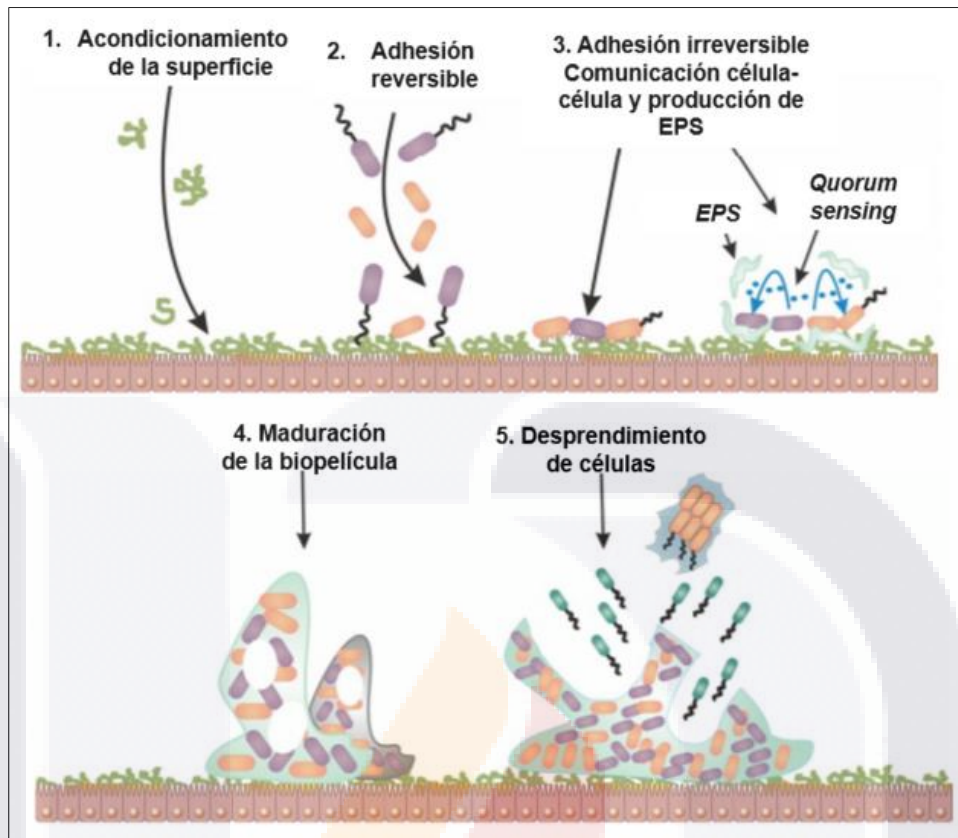


Figura 9. Representación esquemática de las etapas del desarrollo de una BF. *H. pylori* acondiciona su adhesión al sustrato, ya sea un soporte inerte o vivo y comienza a desarrollar la estructura y componentes propios de la biopelícula hasta su maduración y liberación de bacterias que formarán otras estructuras similares (Díaz-Caballero et al., 2011).

7.1. Biopelícula formada por *H. pylori*

Helicobacter pylori tiene la capacidad de residir en el estómago durante muchos años, a menudo durante toda la vida. La supervivencia de *H. pylori* en un nicho gástrico desfavorable es posible gracias a la actividad de la enzima ureasa, su forma espiral, presencia de adhesinas y producción de citotoxinas como VacA y CagA. Es cada vez más reconocido, sin embargo, que los mecanismos de adaptación de *H. pylori* en el estómago también pueden estar relacionados a la capacidad de este patógeno para formar BF (Percival, 2014). El primer estudio que muestra la capacidad de *H. pylori* para formar BF se llevó a cabo en 1999 (Stark, 1999).

Composición de las biopelículas. Las biopelículas de *H. pylori* están compuestas principalmente de carbohidratos, proteínas y DNA extracelular, pueden contener

estructuras como vesículas externas de membrana. Material similar al LPS se ha descrito como un componente de la matriz de la BF en otras bacterias y se sugiere que desempeñe un papel en su formación (Hathroubi et al., 2018).

En las primeras etapas de la formación de la BF, el DNA extracelular juega un papel importante en la estructura, en el intercambio genético y variabilidad bacteriana de la misma (Figura 10). Los carbohidratos como glucosa, fucosa y galactosa, así como N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico forman parte de las sustancias poliméricas extracelulares (SPE) de la BF de *H. pylori*. La manosa es el carbohidrato principal (hasta 80 %) en la BF madura de *H. pylori*. También se presentan ácidos grasos como el ácido tetradecanoico (C14), ácido hexadecanoico (C16) y ácido octadecanoico (C18) (Pinho et al., 2022).



Figura 10. Diagrama que muestra cambios transcriptómicos/proteómicos en *H. pylori*, durante la transición de la fase planctónica a BF (modificado de Krzyżek et al., 2020).

Se ha demostrado, además, que la proteína AlpB asociada a la adherencia, que pertenece al grupo de las proteínas de membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés), está asociada con vesículas de la membrana externa (OMV, por sus siglas en inglés) y contribuyen a la formación de BFs (Hathroubi et al., 2020).

Variabilidad fenotípica. La BF de *H. pylori* es una estructura muy compleja, que consiste en células bacterianas heterogéneas inmersas en la matriz, en las que la presencia de

espacios intercelulares y poros (canales de agua) es notable. En la matriz de la BF de *H. pylori*, además de bacterias, se pueden encontrar muchas estructuras celulares, incluidas las OMV, flagelos y pili.

En las etapas iniciales de formación de la BF, *H. pylori* se encuentra en forma de espiral, morfología muy móvil y asociada a la colonización de nuevos nichos. Después de una adhesión efectiva a la superficie y la multiplicación, se produce una transformación morfológica, que se acompaña de la creación de alta heterogeneidad de formas (espiral, en forma de varilla, curva, cocoide y forma filamentosa). Sin embargo, en el caso de un cultivo prolongado, todas las células de la BF finalmente se transforman a una forma cocoide, en la cual, se incrementa la supervivencia y tolerancia ante los efectos ambientales adversos (Krzyżek et al., 2020).

7.2. Genes asociados a formación de película en *H. pylori*

La capacidad de formación de BFs en bacterias está genéticamente controlada. Según estudios previos, uno de los genes más comunes asociados con la formación de BFs en bacterias (incluyendo *H. pylori*, *Streptococcus mutans* y *Listeria monocytogenes*) es el gen *luxS* (Cole et al., 2004).

En *H. pylori*, la expresión de *luxS* es fundamental en los mecanismos de adhesión y motilidad. Representa además un indicador significativo de la producción de BF en el que las bacterias migran y se adhieren a las microcolonias. Además del gen *luxS*, otros genes están involucrados en la formación de BFs, tal como *flaA* que codifica para un factor indispensable en el mecanismo de colonización, adhesión y formación de BFs. Igualmente, el gen de virulencia *ureA* codifica la subunidad A de la enzima ureasa requerida para la colonización y el mantenimiento del organismo en ambientes hostiles (Lucio-Sauceda, 2019). Sin embargo, los estudios de BFs de *H. pylori* se han ralentizado, en parte, por el hecho de que las cepas de esta bacteria son muy variables (Hathroubi et al., 2020).

8. Evasión inmunológica por BFs bacterianas

Las BFs bacterianas pueden subvertir la respuesta del sistema inmunológico del hospedero tanto a nivel de la respuesta inmune innata como a nivel de la respuesta adaptativa.

Los EPS de diversas bacterias interfieren con la resistencia a la muerte bacteriana inducida por diferentes constituyentes de la respuesta inmune innata incluyendo péptidos catiónicos antimicrobianos, fagocitos profesionales y factores serológicos. Dentro de los mecanismos de protección se puede considerar el efecto estérico de la estructura de la BF que limita el acceso de las células del hospedero. Las bacterias que crecen en BF activan el sistema inmunológico a través de las mismas vías que las bacterias planctónicas en crecimiento. Sin embargo, cuando residen en una BF, las bacterias están incrustadas en SPE y los PAMP clásicos están menos expuestos al sistema inmunitario. Además, los PAMP pueden regularse a la baja en bacterias en crecimiento de BF (Moser et al., 2021). Asimismo, se ha identificado que dentro de la BF de diversas bacterias se generan factores que limitan la actividad oxidativa y acciones antimicrobianas no oxidativas de células fagocíticas.

Las BF pueden presentar estrategias que controlan la acción de la respuesta inmune regulando el estado inflamatorio y reclutamiento de células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos). El antígeno Vi presente en los EPS de *Salmonella typhi* interfiere con el receptor del complemento 3 (CR3) evitando la quimiotaxis de neutrófilos y la producción de IL-8 (Marshall et al., 2015). Adicionalmente la BFs de bacterias, tales como la de *Staphylococcus aureus*, evaden el reconocimiento de TLR2 y TLR9 generando una disminución del reconocimiento de PAMPs y por consiguiente la disminución de la respuesta inmune (Rada et al., 2017).

Muchas toxinas de BFs están reguladas por la detección de mecanismos del QS que se enriquecen durante el crecimiento de la BF, y pueden matar directamente macrófagos, neutrófilos y otros leucocitos para inhibir el reconocimiento inmunológico y la actividad microbica (Yamada y Kelian, 2019).

Además de la acción directa de las BFs en el control de las actividades efectoras de los constituyentes de la respuesta inmune, se ha demostrado que componentes de la BF puede generar polarización inmunológica en células de defensa. Este mecanismo puede ser una importante estrategia para reducir las actividades antimicrobianas sobre las bacterias inmersas dentro de los EPS, permitiendo el establecimiento de infecciones crónicas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Aunque existen pocos estudios acerca de la evasión inmunológica que presenta *H. pylori* en forma de BF, Gaddy et al. (2015) demostraron que la exposición a concentraciones subinhibidoras de la proteína antimicrobiana calprotectina (CP), producida por neutrófilos y otras células mieloides del hospedero, resultaron en estructuras de lípido A alteradas. Lo que condujo a una disminución de la hidrofobicidad de la superficie y un aumento de la formación de BFs. Es decir, *H. pylori* puede eludir la respuesta del hospedero alterando su superficie celular y posterior formación de BFs.

Otro mecanismo de interferencia inmune asociado con las BFs de *H. pylori* puede ser a través de los proteomananos asociados con la matriz. Estas funciones incluyen la supresión de linfocitos B y T y la desgranulación celular, un proceso que libera varios mediadores (histamina, serotonina, serina proteasa y proteoglicanos) que afectan la barrera de la mucosa gastrointestinal. El papel de las BFs de *H. pylori* en la resistencia a los antimicrobianos y por el sistema inmunológico *in vivo* queda por dilucidar (Hathroubi et al., 2020).

III. JUSTIFICACIÓN

La infección por *H. pylori* es una de las más difundidas, se dice que cerca de la mitad de la población mundial la presenta en algún momento de su vida. Sin embargo, la prevalencia de esta infección no es homogénea, es en los países en desarrollo donde se presenta con mayor frecuencia.

Helicobacter pylori fue clasificada como carcinógeno de clase I por su asociación inequívoca con el desarrollo de cáncer gástrico, el quinto con mayor tasa de incidencia y el cuarto más mortal a nivel mundial. La OMS clasificó a *H. pylori* como de alta prioridad en una lista de 12 bacterias para las que se necesita urgentemente un nuevo tratamiento (Pinho et al., 2022).

La terapia combinada es necesaria para la erradicación exitosa de *H. pylori*. El aumento de la prevalencia de resistencia a los antibióticos en *H. pylori* representa un serio problema ya que es una de las causas importantes de fracaso de la terapia (Wong et al., 2016). Dicha resistencia pudiera estar dada por la formación de BF. La posibilidad de que *H. pylori* adopte un modo de crecimiento de BF durante la colonización de la mucosa gástrica y de las glándulas gástricas podría tener un impacto profundo en el tratamiento antimicrobiano a aplicar.

Aunque se ha demostrado que las BF dependen de proteínas de membrana, productos de genes de la isla de patogenicidad del gen asociado a citotoxinas (*cag PAI*), que expresan un sistema de secreción de tipo IV (Cag-T₄SS) y genes flagelares, aún se desconocen en gran medida cuáles son los genes necesarios para la formación de BF por *H. pylori*.

Se sabe además que, durante la infección por *H. pylori*, el hospedero genera una respuesta inmune, pero esta respuesta no logra eliminar la infección y *H. pylori* establece con éxito una infección persistente que conduce a una inflamación crónica. Varias líneas de evidencia sugieren que la respuesta inmune durante la infección por *H. pylori* juega un papel importante en la patogénesis (Linna et al., 2014).

Definir la asociación que existe entre la BF de *H. pylori* y la respuesta inmune en los perfiles de linfocitos T CD4+ cooperadores, y además establecer el comportamiento diferencial entre la BF de *H. pylori* versus la respuesta inmune contra la bacteria, servirá de base para definir tratamientos adecuados para erradicar la infección ocasionada por esta bacteria.

De ahí la importancia de establecer la asociación de BFs formadas por este microorganismo, con poblaciones celulares de respuesta inmune innata y específica.



IV. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar el efecto y asociación de la biopelícula de *Helicobacter pylori* sobre parámetros de respuesta inmune innata y adaptativa.

Objetivos específicos

1. Establecer parámetros que permitan el monitoreo de la formación de biopelículas de *H. pylori* “*in vitro*” y en un modelo “*in vivo*” de infección en ratón.
2. Determinar el efecto de la biopelícula de *H. pylori* sobre la estimulación de receptores de patrones moleculares a patógenos en leucocitos.
3. Evaluar la actividad anti-fagocítica de macrófagos sobre la bacteria planctónica y la biopelícula de *H. pylori*.
4. Definir la asociación que se establece entre las biopelículas de *H. pylori* y la modulación inmune en los perfiles de linfocitos T.

V. HIPÓTESIS

La biopelícula formada por *Helicobacter pylori* pudiera disminuir la actividad antimicrobiana de la respuesta innata y modularía la respuesta adquirida para evitar la eliminación de la bacteria.

VI. METODOLOGÍA

El desarrollo de las técnicas se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de microbiología sanitaria y ambiental de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Para el mantenimiento y confinación de animales experimentales se hizo uso del Bioterio del Centro de Ciencias Básicas.

1. Cultivo de *H. pylori* y caracterización de la bacteria

Se utilizó un aislado clínico de *H. pylori* previamente obtenido en el laboratorio identificado como A97. La bacteria se cultivó en medio base de agar sangre (BD Bioxon) con 5% de sangre de carnero desfibrinada, a una temperatura de 37 °C en condiciones microaerofílicas. Para evitar contaminación en los cultivos se adicionó una mezcla de antibióticos de selección denominada *Helicobacter pylori* selective supplement DENT (Oxoid SR0147E), la cual contiene vancomicina (0.01 mg/ml), trimetoprim (0.005 mg/ml), cefsulodin (0.005 mg/ml) y anfotericina B (0.005 mg/ml). La bacteria se caracterizó mediante tinción de Gram, así como por las pruebas bioquímicas de ureasa y catalasa. Para la prueba de ureasa se utilizaron los reactivos de ureasa (2% urea, 0.05% rojo de fenol, buffer fosfatos 0.01M, pH 6.5) y para catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%). Adicionalmente se realizó el análisis molecular para la bacteria, descrito en el siguiente apartado.

1.1. Análisis molecular de *H. pylori*

Se identificó el gen *ureC* que codifica para la fosfoglucoamina mutasa (*glmM*) de *H. pylori* utilizando el primer sentido G-HP3 5'-CTTTCTTCTCAAGCGGTTGTC-3' y el antisentido G-HP4 5'-CAAGCCATCGCCGTTTTCAGC-3' para la identificación de un producto de amplificación específico de 204 pb (Osman et al., 2015).

Primeramente, para la extracción de DNA una porción equivalente a 2 colonias de bacteria fue digerida en 500 µL de buffer de lisis (SDS, Bio-Rad 1610301 al 5 %, Tris HCl, Sigma T3253 al 0.15% y EDTA, JTBaker 0.5 M pH 8.0) adicionando 20 µL de proteinasa K (20 µg/µL en Tris HCl 10mM y CaCl₂ 20 mM) (Invitrogen cat. 25530). La digestión se realizó en baño María a 60 °C durante toda la noche. Posteriormente se procedió a la extracción con la técnica de fenol-cloroformo, utilizando 500 µL de fenol saturado (Invitrogen cat. 15513), 500 µL de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA), 500 µL de isopropanol (Sigma) y 1000 µL etanol (Sigma) al 70 %. El DNA extraído se ajustó a una concentración de 100 ng/µL en agua destilada. Las condiciones del PCR fueron: 40 ciclos a

95 °C para desnaturalización (1 min), alineamiento (40 s) a 66 °C y, 72 °C de temperatura de elongación (1 min). Posteriormente se realizó la separación electroforética de los productos de amplificación en gel de agarosa al 2.5 % en solución de Tris-borato-EDTA (TBE) y tinción con bromuro de etidio (1 µg/mL). Visualizando el patrón de bandas con un transiluminador UV (BioRad Universal Hood II Gel Doc System) software Quantity One Versión 4.6.8.

Adicionalmente, se realizó la genotipificación la región señal (*s*) y región (*m*) del gen *vacA*, así como la identificación del gen *cagA* en el aislado clínico de *H. pylori* utilizado. Para lo cual el DNA bacteriano previamente extraído se sometió a PCR (Master Mix K0171 (Thermoscientific) con iniciadores para amplificar las regiones *s* y *m* del gen *vacA*, y el gen *cagA* (Tabla 1, Figura 11). Las condiciones del PCR fueron: 40 ciclos a 95 °C para desnaturalización (1 min), alineamiento (40 s) a 54 °C y elongación (1 min) a 72 °C. Posteriormente se realizó separación electroforética en gel de agarosa al 2.5 % en buffer TBE.

Tabla 1. Secuencia de iniciadores para los genes de virulencia *vacA* y *cagA* en *H. pylori*

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Referencia
<i>VacA</i> región <i>m1</i>	VA3F	5' GGTCAAAATGCGGTCATGG 3'	290 nt	Atherton et al., 1995
	VA3R	5' CCATTGGTACCTGTAGAAAC 3'		
<i>VacA</i> región <i>m2</i>	VA4F	5' GGAGCCCCAGGAAACATTG 3'	352 nt	
	VA4R	5' CATAACTAGCGCCTTGACAC 3'		
<i>VacA</i> región <i>s1/s2</i>	VA1F	5' ATGGAAATACAACAAACACAC 3'	<i>s1</i> : 259 nt	
	VA1R	5' CTGCTTGAATGCGCCAAAC 3'	<i>s2</i> : 286 nt	
<i>CagA</i> región constante	<i>cagAF</i> D008	ACAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA	298 nt	Whagih et al., 2015
	<i>cagAR</i> R008	TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT		

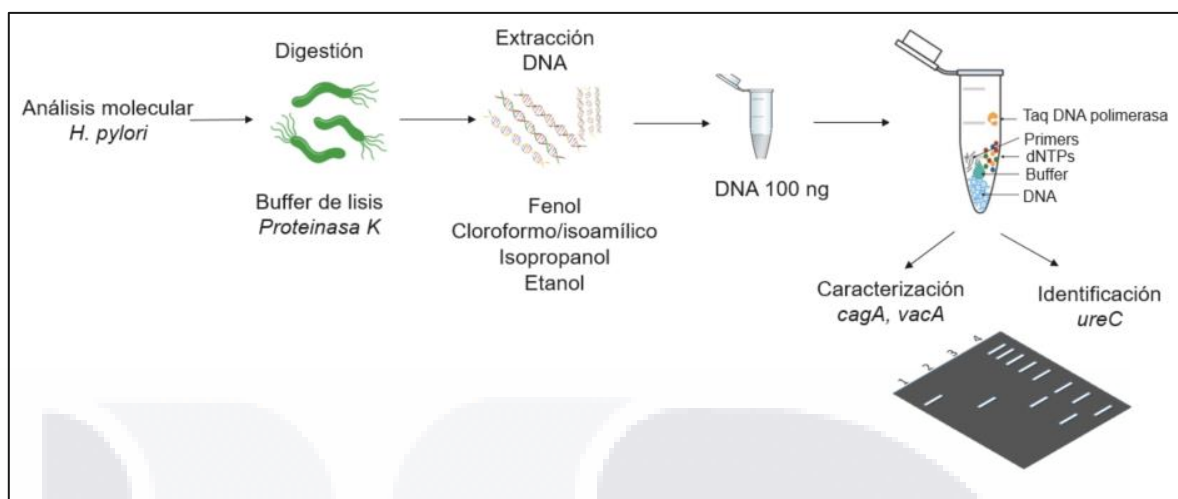


Figura 11. Caracterización molecular de *H. pylori*. Digestión de tejido gástrico, extracción de DNA y PCR para identificación de los genes *ureC*, *cagA* y *vacA*.

2. Monitoreo de biopelícula *in vitro*

2.1. Cuantificación de crecimiento bacteriano e inducción de la formación de biopelícula

Para conocer las mejores condiciones de proliferación de *H. pylori* y, a su vez, de formación de BF *in vitro*, se utilizaron suspensiones bacterianas de 1.5×10^6 bacterias/mL, ajustadas al patrón de turbidez de la escala McFarland. El índice de crecimiento bacteriano se determinó mediante lecturas espectrofotométricas a 600 nm (densidad óptica, OD) en los diferentes días de incubación estudiados (desde 2 hasta 5 días). Además, se analizaron las variaciones en el crecimiento dependiendo del tipo de medio de cultivo base utilizado y los suplementos promotores de la formación de la BF y/o crecimiento bacteriano adicionados al medio de cultivo (Figura 12).

Medios de cultivo. Se consideraron dos medios base de cultivo líquidos: infusión de Cerebro Corazón (ICC, BD Difco 211200) y caldo Brucella (BB, por sus siglas en inglés, BD BBL).

Suplementos. A los dos medios de cultivo base se les agregaron de manera independiente los siguientes suplementos promotores de la formación de la BF y/o crecimiento bacteriano: suero de ternera fetal descomplementado (FCS, por sus siglas en inglés, Sigma Aldrich F2442) al 5.0 %, β -ciclodextrina (β -CD, Sigma C-4767) al 0.1% y glucosa (Chemical Technique 1895) al 0.3%. Para evitar contaminación de los cultivos se adicionó la mezcla de antibióticos de selección (selective supplement DENT, Oxoid SR0147E).

La bacteria fue incubada a 37 °C en ambiente microaerófilico en placa de cultivo de 24 pozos (CELLTREAT, Scientific Products). El volumen final por pozo fue de 1000 µl. Para cada combinación de componentes se realizaron tres ensayos independientes. En las lecturas espectrofotométricas se utilizó como blanco de calibración del equipo, los medios ICC o BB, con los complementos β-CD, FCS, glucosa y antibiótico pero sin incluir bacteria.

2.2. Identificación y cuantificación de BF

Con la finalidad de determinar y cuantificar la formación de BF, posterior al periodo de incubación de *H. pylori* se descartó suavemente el sobrenadante de cada pozo. Se añadieron 125 µl de colorante cristal violeta 0.1% para teñir la BF formada y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Se descartó el colorante y se realizaron dos lavados suaves con agua destilada, enjuagando la placa de cultivo 3 veces y se dejó secar por una noche. En la cuantificación espectrofotométrica, a cada pozo teñido se le añadieron 1000 µl de ácido acético al 30% en agua, se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Luego se determinó la OD a 550 nm, usando ácido acético (30%) como blanco. La concentración de colorante fijado en el fondo de los pozos se consideró directamente proporcional a la formación de BF, y fue valorada por la OD determinada (O'Toole et al, 2011).

2.3. Valoración de diferentes condiciones en la formación de biopelícula por *Helicobacter pylori*

La determinación de las mejores condiciones para la formación de BF por *H. pylori* utilizando diferentes combinaciones de FCS y β-CD se evaluó tanto en placa de cultivo de 24 pozos como en caja Petri estéril (Figura 12). Para esta última determinación se sumergieron en el medio a probar, cubreobjetos estériles que sirvieron como soporte para la formación de BF y se colocaron dentro de las cajas Petri, se dejaron incubar a 37 °C en ambiente microaerófilico por 2 a 5 días. Transcurrido el tiempo determinado, los cubreobjetos se extrajeron de la caja Petri, se enjuagaron con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) (NaH₂PO₄ 1.75 mM, Na₂HPO₄ 8 mM y NaCl 75 mM, pH de 6.5) y se fijaron con formol al 10% por 15 min. Posteriormente se tiñeron con cristal violeta y carbol-fucsina para observarse al microscopio con el objetivo 100x.

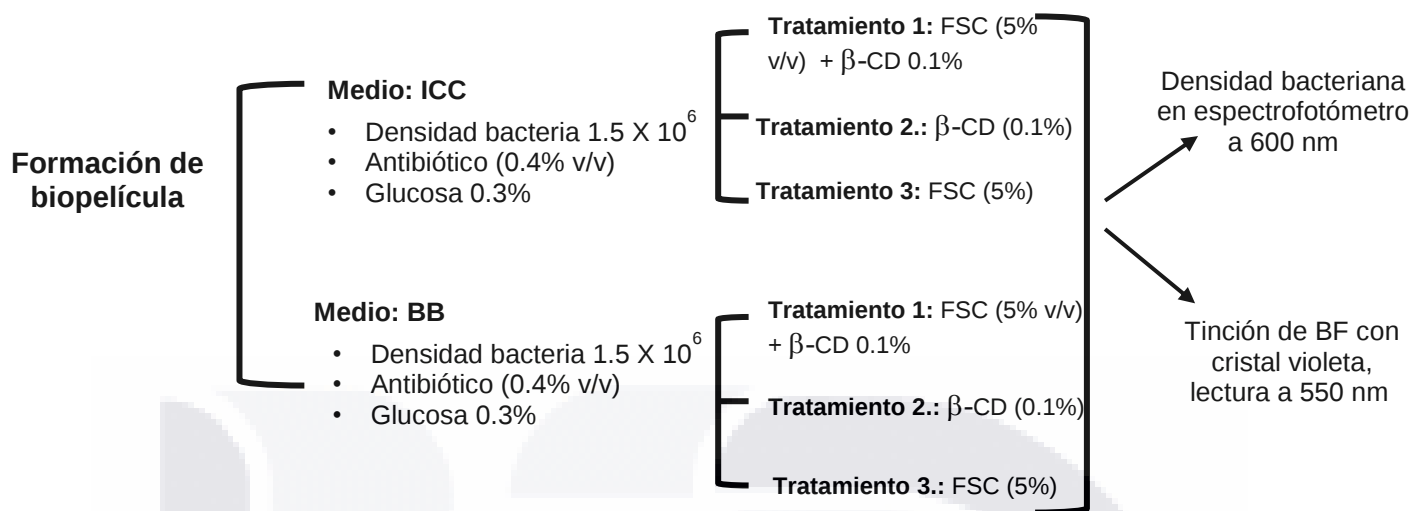


Figura 12. Diferentes combinaciones de ensayos para definir las mejores condiciones en la formación de BF para *H. pylori*. Abreviaturas: ICC, infusión cerebro-corazón; BB: caldo Brucella; FCS: Suero de ternera fetal y β -CD: ciclodextrina.

Posteriormente se realizaron ensayos en medio BB a diferentes concentraciones de FCS y albúmina de suero bovino (ASB) como un comparativo del efecto del suero de ternera fetal. Las concentraciones para ambos componentes fueron de 0, 2.5, 5.0 y 7.5 % con base al contenido proteico cuantificado por el método de Bradford y bajo las mismas condiciones de densidad de bacteria, antibiótico, glucosa y β -CD. El tiempo de incubación fue de 5 días (Figura 13).

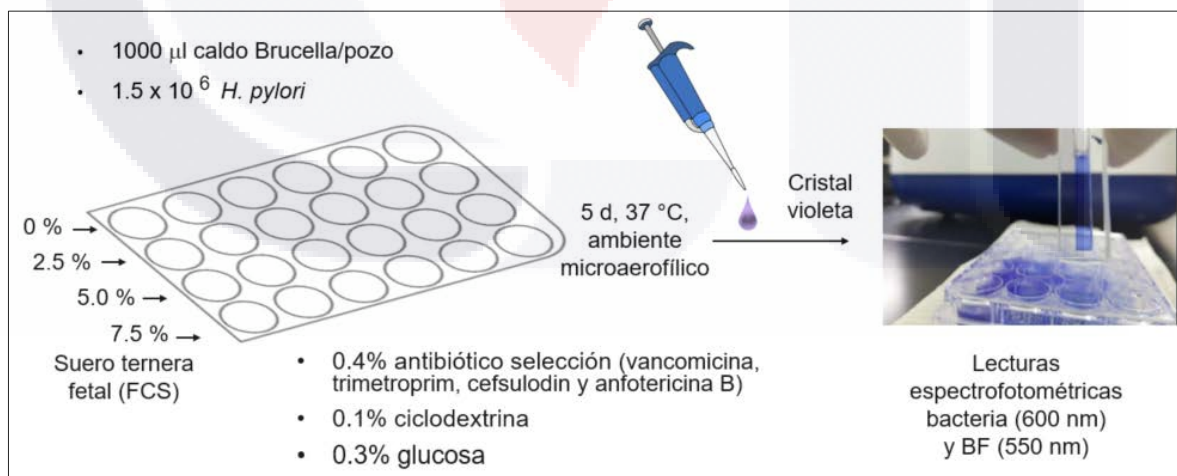


Figura 13. Formación de BF para *H. pylori* en placa de cultivo. Ensayos con diferentes concentraciones de FCS.

2.4. Análisis de imagen para cálculo de área total de formación de biopelícula

En los cubreobjetos teñidos de acuerdo al punto 2.3, se realizaron 10 capturas de imagen de forma aleatoria por cada cubreobjetos, utilizando la cámara acoplada al microscopio y con la ayuda del software del equipo (Leica Application Suite). Posteriormente estas imágenes se procesaron en el software ImageJ 1.53k con previa calibración de la escala (equivalencia en distancia de micras a píxeles). Se estableció el área total de BF en base a la intensidad de color para cada imagen y se obtuvo el valor del área de BF promedio para cada condición ensayada (Figura 14).

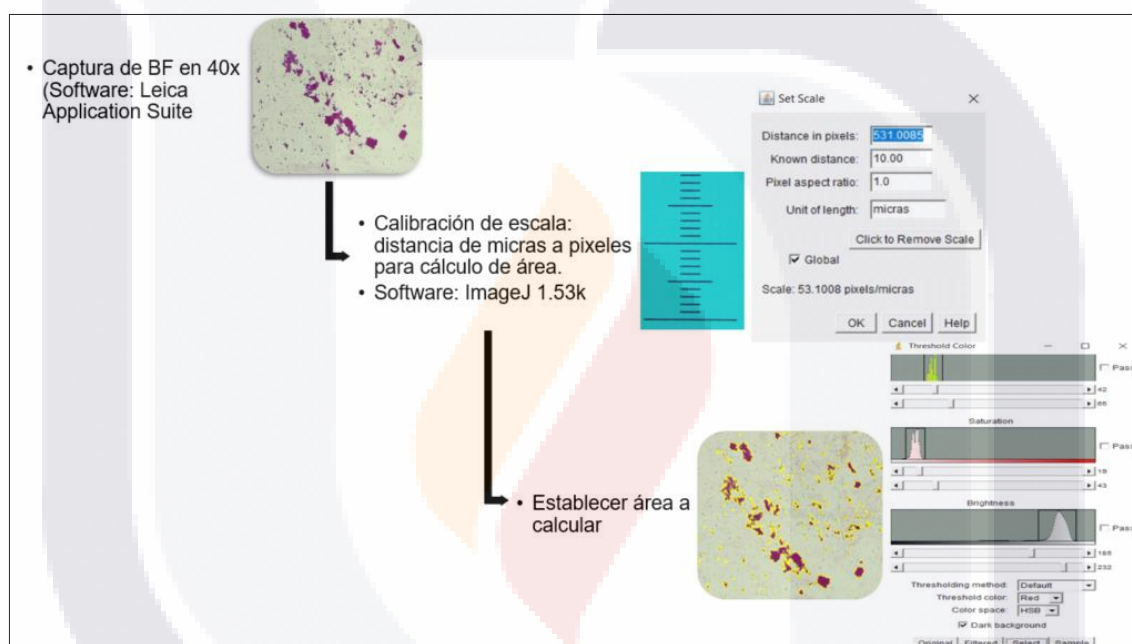


Figura 14. Diagrama de pasos para la obtención de cálculo de área de BF.

2.5. Visualización de BF in vitro en microscopía electrónica de barrido.

Para poder distinguir diferencias en la estructura de BF y la forma adoptada por la bacteria a diferentes concentraciones de FCS se realizó en placa de cultivo de poliestireno de 24 pozos, un ensayo a diferentes concentraciones de FCS (desde 0, 2.5, 5.0 y 7.5% v/v) con las mismas condiciones trabajadas con anterioridad: 1 ml de BB por pozo, 0.3% de glucosa, 0.1% de β -CD y 0.4% de antibiótico de selección. El inóculo fue de 1.5×10^6 bacterias/mL. Se incubó por 5 días a 37 °C en ambiente microaerófilico. Posteriormente se descartó suavemente el sobrenadante y se realizaron dos lavados con PBS procurando dejar caer la solución por las paredes. Se añadió entonces 1 ml de glutaraldehído al 2.5% a cada pozo

y se mantuvo por 3 h con esta solución a temperatura ambiente (~22 °C), este se descartó y lavo con PBS. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se procedió a la deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (50–100%); enseguida las muestras se llevaron a punto crítico de secado con dióxido de carbono líquido (Samadri-PVT-3D, TOUSIMIS Research Corporation, Rockville, MD, U.S.A.). Las muestras fueron recubiertas con oro (Denton Vacuum Desk II, NJ, U.S.A) y fueron analizadas en un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM-5900LV, Musashino, Tokio, Jap).

3. Monitoreo de la formación de BF *in vivo*

Con la finalidad de establecer las condiciones para el desarrollo de BF por *H. pylori* *in vivo*, se realizó un modelo experimental murino de infección por *H. pylori*. Para ello, a ratones hembra de la cepa BALB/c, de 6 semanas de vida, se les administró vía esofágica 3.0×10^7 bacterias en 200 μ l de ICC con NaHCO_3 al 0.2 M. Una segunda dosis se administró al tercer día. Al cabo de 6 semanas, los ratones se sacrificaron por sobredosis de anestesia y se realizó, en condiciones de asepsia, la disección de los animales. Se obtuvieron muestras de tejido gástrico de la zona antral y del cuerpo del estómago (Figura 15).

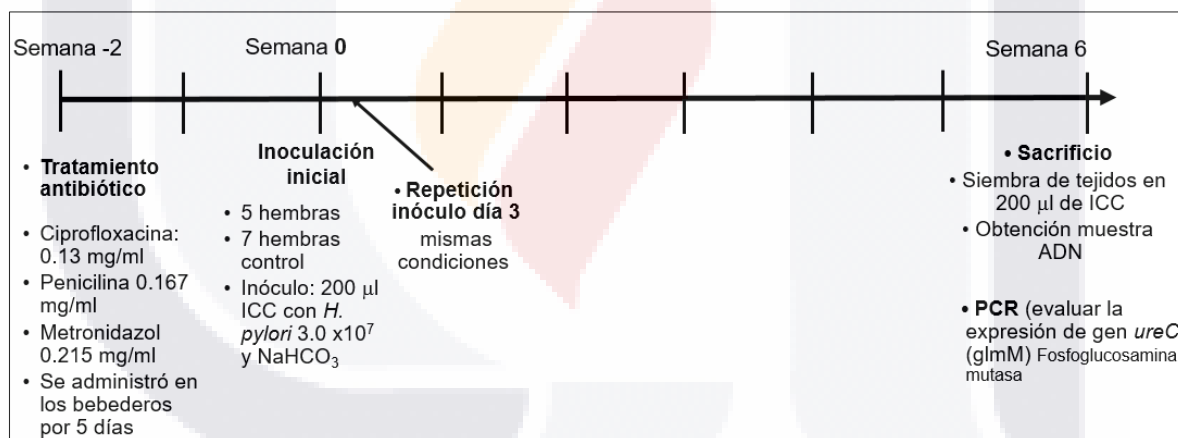
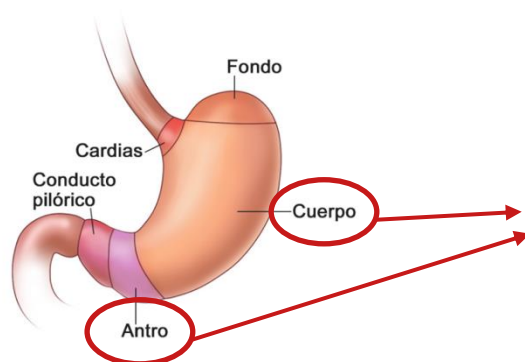


Figura 15. Modelo experimental murino de infección con *H. pylori*. Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c, un grupo fue inoculado con *H. pylori* y otro grupo se estableció como control negativo de infección, administrando en estos últimos, sólo el medio ICC con NaHCO_3 . El sacrificio se realizó a las 6 semanas.

Con las muestras de tejido gástrico se realizaron las determinaciones de: **1)** análisis microbiológico y **2)** presencia del gen *ureC* que indicaría la presencia de la bacteria.



Se tomaron 3 muestras de cada región.

Figura 16. Regiones estomacales muestreadas. Se muestrearon cuerpo y antro de estómago de ratones hembra de la cepa BALB/c con 6 semanas de vida.

3.1. Análisis microbiológico en tejido gástrico

Para el análisis microbiológico se maceraron las muestras de tejido en 200 μ l de ICC, y de este macerado se realizaron diluciones (1:200) para sembrar, por medio de la técnica de goteo en placa, 5 μ l en placa de agar sangre (5%) con la mezcla de antibióticos selectivo para *H. pylori*. Se incubaron al menos 5 días para observar posibles colonias con características correspondientes a *H. pylori*.

3.2. Identificación molecular gen *ureC*

Para la identificación molecular del gen *ureC*, que constituye un indicador de la presencia de la bacteria *H. pylori*, las condiciones de extracción y de detección del gen, se realizaron de acuerdo a lo descrito en el punto 1.1 de esta misma sección de metodología.

4. Expresión de genes relacionados a formación de BF *in vitro*

Para evaluar la expresión de genes bacterianos asociados a la presencia o ausencia de BF, se utilizó RT-PCR en punto final para definir en cuáles de estos genes se mostraba una expresión diferencial en BF respecto a bacteria planctónica (Tabla 1) (Lucio-Sauceda et al., 2019),

La BF se obtuvo de acuerdo al punto 2.5, por incubación de *H. pylori* en placa de 24 pocillos (5 días en caldo BB con glucosa al 0.3%, β -CD al 0.1% y antibiótico). Transcurridos los 5 días se descartó el sobrenadante y se raspó suavemente el fondo de los pozos inoculados. Al precipitado obtenido del fondo de los pozos, se añadió PBS a cada pozo para resuspender la BF y transferir el líquido a microtubos de 1.5 ml. Se realizó extracción de RNA añadiendo 750 μ l de TRIzol (ambion, 15596026), se incubó por 5 min a temperatura

ambiente y se le agregaron 200 μ l de agua. Posteriormente se añadió cloroformo para centrifugar y obtener una fase acuosa la cual se recuperó y se le agregó isopropanol, posteriormente se centrifugó y se obtuvo una pastilla. Se agregó etanol y se obtuvo nuevamente una pastilla o gel que se resuspendió en agua.

Simultáneamente se realizó extracción de RNA a partir de bacteria planctónica, un cultivo de bacteria previamente sembrada, fue cosechado con hisopo en placa de agar sangre a 72 h de crecimiento.

El RNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría (260 nm) y se realizó además una separación electroforética en gel de agarosa al 1.25% que permitió visualizar la integridad del RNA.

Después se realizó síntesis de cDNA por RT-PCR. Previo a ello y para eliminar la contaminación del DNA genómico, se llevó a cabo la digestión de DNA utilizando DNAsa I (grado de amplificación de DNAsa) (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.). La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, la enzima se inactivó con 1 μ l de EDTA (25 mM) y 10 min de calentamiento a 65°C.

La RT del RNA total se realizó utilizando un kit de Superscript VILO (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.), según el protocolo del fabricante. Los cDNA resultantes se cuantificaron por espectrofotometría a 260 nm y se ajustaron a una concentración de 200 ng/ μ l. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C y se amplificaron para los genes mostrados en la tabla 2.

Tabla 2. Genes de expresión diferencial para el desarrollo de BF

Gen	Forward 5´-3´	Reverse 5´-3´	Longitud fragmento (nt)	Referencia
<i>ureA</i>	CTG ATG GGA CCA AAC TCG TAA	TTG CCT TCG TTG ATA GTG ATG	109	Lucio-
<i>omp18</i>	TGC ACG ATC TCA TCT AAA GTC TC	CGG GAC TAT CAT CGC TTC TAT TT	87	Sauceda et
<i>lpxD</i>	GTT TAG GCT CAT TCA CGC TTT G	TCG TGG ATA ACC CGC ATT TAG	93	al, 2019
<i>flaA</i>	CAG TAT AGA TGG TCG TGG GAT TG	GAG AGA AAG CCT TCC GTA GTT AG	127	Urrutia-baca et al, 2018
<i>luxS</i>	CTA AAT TCT GTG CGC CCT CTA A	ACG ATG CAA GAC GTG CTA AA	100	
<i>16s RNAr</i>	GGA GTA CGG TCG CAA GAT TAA A	CTA GCG GAT TCT CTC AAT GTC AA	127	

5. Efecto de la BF de *H. pylori* sobre la estimulación de receptores de patrones moleculares a patógenos en leucocitos

5.1. Activación de NF- κ B

Como un indicador de la activación del factor transcripcional NF- κ B, se evaluaron mediante inmunoblot, a los extractos proteicos de células estimuladas (leucocitos humanos) con componentes de la BF por un lado y, en otro ensayo independiente, pero en las mismas condiciones, con extracto de *H. pylori* en estado planctónico.

Se obtuvieron muestras de sangre humana por punción venosa utilizando tubo vacutainer con ácido cítrico, citrato de sodio y dextrosa (ACD) como anticoagulante. Las muestras fueron centrifugadas (2800 rpm) por 20 min. Se tomó el anillo de leucocitos y estos se diluyeron en la misma cantidad de solución salina fisiológica (SSF). La sangre diluída se añadió a tubos Eppendorf que contenían 500 μ l de ficoll (LymphoprepTM LYS 3773). Posteriormente los tubos fueron centrifugados (5000 rpm) por 2 min, y el anillo formado se colectó en un tubo limpio. Cuando fue necesario, se utilizó cloruro de amonio 0.15 M para lisar eritrocitos residuales. Se lavó la pastilla obtenida con SSF (3800 rpm) por 2 min, y la pastilla se resuspendió en 500 μ l de SSF para el conteo de leucocitos obtenidos por cámara de Neubauer con la técnica de azul trypan y posterior estimulación con sonicado de bacteria y BF.

5.2. Obtención de sonicado de bacteria y BF

Un cultivo de *H. pylori* de 72 h fue cosechado con hisopo estéril de la superficie del cultivo en agar sangre, se resuspendió en PBS (NaH_2PO_4 1.75 mM, Na_2HPO_4 8 mM y NaCl 75 mM y pH de 7.2). A su vez, se recuperó la BF formada por *H. pylori*, conforme a la metodología descrita en el apartado 3.3, resuspendida en PBS y se colocó en recipiente estéril el cual se mantuvo en baño de hielo. Tanto la bacteria como la BF resuspendidos en PBS fueron sometidas a sonicación por sonda (Sonicor ultrasonic processor UP 400A 50/60Hz ciclos) a pulsos de 10s en el nivel 4; 10 pulsos para la bacteria y 5 pulsos para la BF. Se cuantificó su contenido proteico por el método de Bradford. El sonicado obtenido se almacenó a -20 °C para su uso posterior.

5.3. Estimulación de leucocitos con sonicado de bacteria y BF

Para el ensayo de estimulación de NF- κ B, en una microplaca de 24 pozos, se utilizaron un millón de leucocitos por pozo de estimulación con un volumen total de 1000 μL /pozo. Se utilizó como testigo LPS de *Escherichia coli* (Sigma 0111:B4) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de medio Roswell Park Memorial Institute-RPMI), y de manera independiente, 25 y 50 μL de sonicado de *H. pylori* (bacteria en estado planctónico) y de BF de *H. pylori*. Las condiciones fueron 2h a 37 °C en cámara húmeda.

Se realizó la extracción de la fracción proteica total para cada pozo con los distintos tratamientos. Se descartó el sobrenadante de cada pozo y se añadió 200 μL con buffer de lisis con soluciones tampón (agente amortiguador de ácido sulfónico zwitteriónico-HEPES de Sigma, KCl, MgCl_2 y Ditiotretitol-DTT de Sigma, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, PMSF de Sigma, como inhibidor de proteasas, Tritón X-100 (1%) y SDS al 0.1%). Se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó as 12 000 rpm a 4 °C por 15 min. Se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford y se almacenó a -80 °C.

En SDS-PAGE, el porcentaje de acrilamida en el gel fue del 10 % y se realizó tinción con el colorante azul de Comassie (Sigma-aldrich B0770) al 0.2% en metanol-agua destilada-ácido acético).

Para la transferencia de proteínas del gel a la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés), la membrana fue sumergida en metanol previamente a la

transferencia. Posteriormente, la membrana se dejó secar y se realizó un proceso de bloqueo con leche en polvo al 5% en TTBS por 1 h. Se utilizó un anticuerpo anti-pIKB- α (sc-8404) diluido en leche en polvo al 5% en TTBS (Tris Buffered Saline con Tris HCL-Sigma, NaCl y Tween 20-Biorad) para la identificación de NF- κ B. El análisis se considera cuantitativo mediante la normalización con la identificación en el inmunoblot de una proteína de expresión constitutiva (β -actina sc-517582). Los anticuerpos primarios anti-pIKB- α y β -actina se utilizaron a concentración 1:250. El anticuerpo secundario (Goat Anti-Mouse IgG Fc conjugated to Alkaline Phosphatase, ab98710) se utilizó a concentración de 1:4000. El revelado se realizó con fosfatasa (Sigma B5655) en agua destilada (Figura 17).

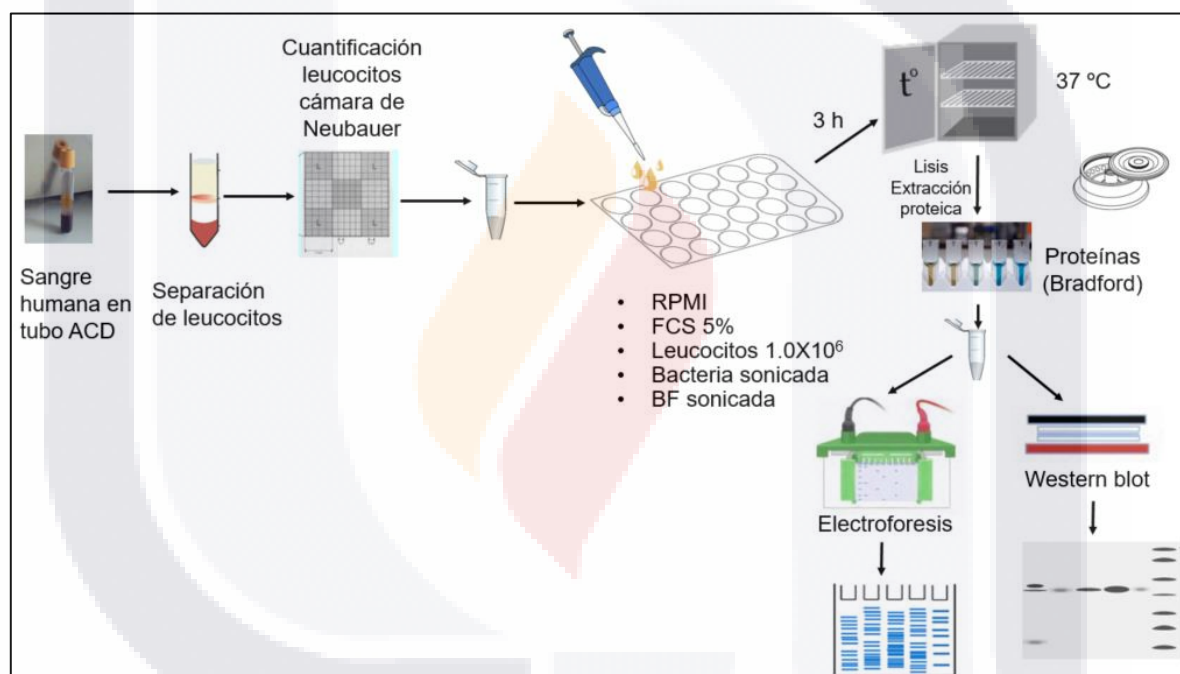


Figura 17. Estimulación de leucocitos con bacteria planctónica, BF de *H. pylori* y LPS de *E. coli* como control positivo.

La intensidad de las bandas en la membrana fue leída por medio de un transluminador UV (Biorad Universal Hood II Gel Doc System) y se midió la intensidad (píxeles) mediante el software Quantity One Versión 4.6.8.

6. Actividad anti-fagocitaria de la BF

6.1. Actividad de células fagocíticas vs. *H. pylori* y BF de *H. pylori*

Se obtuvieron células fagocíticas de peritoneo de ratón los cuales se sembraron en placas de cultivo. Las células fueron infectadas con extracto sonificado de *H. pylori* en estado planctónico y, en pozos independientes, con extracto sonificado de la BF de *H. pylori*. Posteriormente se añadió bacteria en proporción 1:1 y después de 1 h de interacción las células fueron lavadas con PBS. Se realizó una lisis celular con agua destilada, mediante un ensayo de recuperación bacteriana, el número de bacterias intracelulares viables fueron determinadas por conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) (Guilhen et al., 2019) (Figura 18).

Ratones hembra de la cepa BALB/c de seis semanas de vida, fueron inoculados con 1 ml de tioglicolato en agua destilada (caldo tioglicolato NIH BD Bioxon®, No. 211721), en la cavidad peritoneal. Se permitió la respuesta inflamatoria para proceder a la eutanasia a los 3 días. Con 3 ml de RPMI, se cosecharon las células fagocíticas, aspirando el líquido del peritoneo. Las células fueron colectadas en un tubo cónico en hielo. El exudado fue centrifugado y el sedimento resuspendido en medio RPMI con suero de ternera fetal (FCS) al 5 % para contabilizar células fagocíticas.

Las células se ajustaron a ~500 000 células totales/pozo/ml (Zhang, et al., 2008). Y a cada pozo, después de media hora de estabilización, se añadieron desde 10 hasta 50 µl de extracto sonificado de *H. pylori*, y en pozos independientes, extracto sonificado de la BF de *H. pylori*. Los sonicados se obtuvieron siguiendo la metodología descrita en el punto 4.2 y se mantuvieron en incubación en cámara húmeda a 37 °C por media hora.

Posteriormente se añadió un aislado de bacteria *Staphylococcus aureus* (catalasa+, coagulasa+, termonucleasa+) previamente resuspendida en medio ICC, a proporción de 1:1 y la placa fue incubada en cámara húmeda por 1 h a 37 °C.

Luego de 1 h y para eliminar las bacterias extracelulares, se añadió gentamicina (120 µg/ml) por espacio de 1 h. Se retiró suavemente el medio RPMI de los pozos y las células fagocíticas se lavaron con PBS. Luego, las células fueron lisadas agregando agua destilada para liberar bacterias intracelulares. Las bacterias se cuantificaron por dilución decimal en

serie y placas en agar ICC. El número de bacterias viables se expresó como CFU/células fagocíticas (Daw et al., 2012).

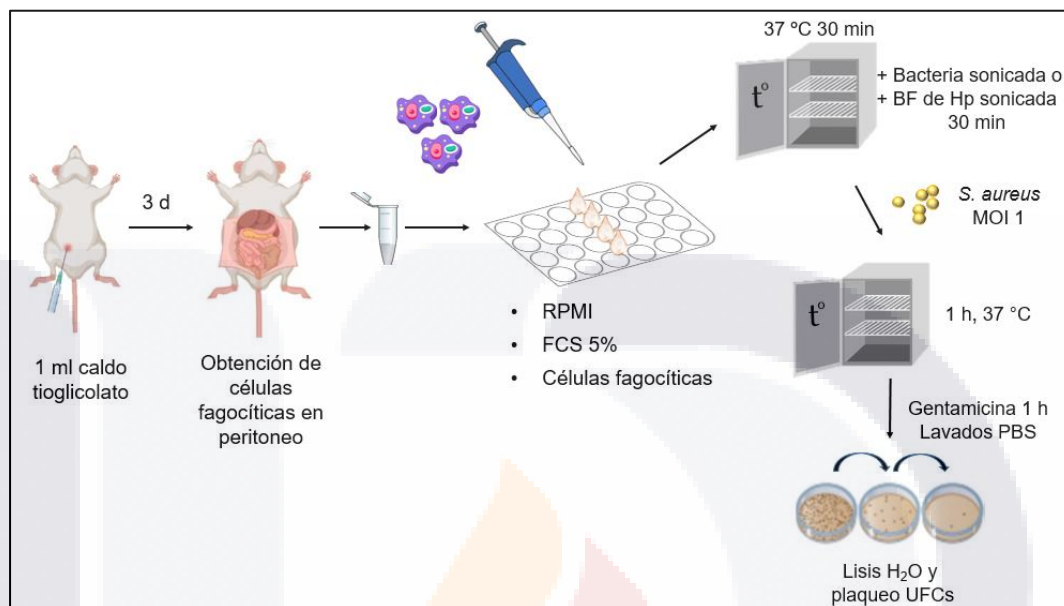


Figura 18. Metodología de la estimulación de células fagocíticas en peritoneo de ratón con extracto sonificado de bacteria planctónica y biopelícula de *H. pylori*.

6.2. Actividad de células PMNs humanas con sonificado de *H. pylori* y BF de *H. pylori*

A partir de sangre periférica humana de voluntarios donantes sanos, se obtuvieron células PMNs-neutrófilos, los cuales se purificaron mediante centrifugación durante 45 min a 700 g a temperatura ambiente en un gradiente de densidad discontinuo preparado con Lymphoprep (Fresenius Kabi Norge AS) y Medio Histopaque-1119 (Sigma-Aldrich). Los eritrocitos fueron lisados por choque osmótico en una solución de NH₄Cl 0.15 M. Las células fueron lavadas dos veces con PBS y se resuspendieron en RPMI 1640 para su cuantificación y determinación de viabilidad y pureza. Se realizó la cuantificación en cámara de Neubauer, y la viabilidad de los neutrófilos se determinó mediante la prueba de exclusión de azul tripán.

Los neutrófilos se mantuvieron en microtubos (1 x 10⁶ células/pozo) en RPMI (1 ml/pozo) con FCS al 5 %. Las células después de estabilizarlas por media hora a 37 °C, fueron estimuladas con extracto sonificado de *H. pylori* en estado planctónico (10 y 30 µg de proteína total) y, en pozos independientes, con extracto sonificado de la BF de *H. pylori* (10 y 30 µg de proteína total) durante 30 min a 37 °C. Posteriormente se añadió bacteria *S. aureus* catalasa+, coagulasa+, termonucleasa+ en proporción 1:1 por 1 h a 37 °C.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Luego de 1 h de interacción los microtubos fueron centrifugados a 10 000 rpm por 7 min. Se retiró suavemente el medio RPMI y se añadió 1000 µl de agua destilada para liberar bacterias intracelulares. Se realizaron diluciones decimales y 100 µL de la dilución se inoculó por siembra masiva en agar Sal y Manitol. Se incubó 24 h a 37°C. El número de bacterias viables se expresó como UFC/mL. Los experimentos se realizaron por duplicado, y las medias y los errores estándar fueron determinados para cada experimento. La significación estadística de los resultados se determinó mediante comparaciones por pares.

Para evaluar el porcentaje de neutrófilos fagocíticos se realizaron frotis de los diferentes tratamientos realizados los cuales se tiñeron por Wright-Giemsa expresando el % de neutrófilos que fagocitan de un total de 200 células.

7. Modulación inmune de BF sobre los perfiles de linfocitos T

7.1. Análisis de RT-PCR en tiempo real para determinar perfiles Th1, Th2, Th17 y Treg en mucosa gástrica.

Se obtuvieron biopsias gástricas humanas de 37 pacientes con sintomatología relacionada a gastritis aguda o crónica y otros padecimientos asociados. Una fracción de cada biopsia se procesó para la extracción de DNA y detección del gen *ureC* (punto 1.1 de esta misma sección de metodología). Asimismo, el RNA total fue extraído a partir de la segunda fracción del tejido gástrico que se obtuvo, de acuerdo a la sección 3.3 de esta metodología, utilizando un protocolo orgánico con TRIzol (Ambion cat. 15596026). El RNA fue cuantificado por espectrofotometría a 260 nm y la integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Para eliminar la contaminación de DNA genómico, se realizó una digestión de DNA utilizando 2U de DNasa I (Invitrogene, Thermo Fisher Scientific, Inc.) por microgramo de RNA. La muestra fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos, para posteriormente inactivar la enzima agregando 1 µL de EDTA (25 mM) y aplicar un calentamiento de 65 °C durante 10 minutos.

Transcripción inversa (RT)

La retrotranscripción se realizó a partir de 2.5 µg de RNA total utilizando el kit VILO Superscript (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc) siguiendo el protocolo del fabricante. El cDNA obtenido fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm para

posteriormente realizar la dilución de la muestra a una concentración de 200 ng/μl. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

Análisis de expresión génica

El cDNA obtenido del tejido gástrico de pacientes fue analizado mediante PCR cuantitativo utilizando el kit Express SYBR qPCR Super Mix Universal (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Inc). Se determinaron los niveles de expresión de los genes bacterianos *luxS* y *16s ribosomal* así como los factores de transcripción humanos Th1: T-bet; Th2: Gata 3; Th17: ROR γT y T_{reg}: Foxp3 (Ning-Fei et al., 2014). La expresión del gen GAPDH a partir de las muestras se utilizó como control de normalización. Todos los primers utilizados fueron adquiridos de la compañía T4OLIGO (ADN Sintético SAPI de CV), las secuencias de los oligonucleótidos correspondientes se indican en la **Tabla 3**. El análisis fue desarrollado en el equipo de PCR en tiempo real StepOne™ 48-well (Fisher Scientific). Las condiciones de amplificación utilizadas fueron: desnaturalización inicial 50 °C por 2 minutos y 95 °C por 10 minutos; seguidos de 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 1 minuto a 60 °C para alineación y amplificación. (Espinoza-Contreras et al., 2020). El cálculo de expresión diferencial entre los grupo de pacientes con alta y baja expresión del gen *luxS* (*luxS*^{+/+} vs *luxS*^{+/-} respectivamente) fue determinada mediante un análisis de cuantificación relativa usando el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak y Schmittgen, 2001).

Tabla 3. Genes de expresión para perfiles transcripcionales de Th1, Th2, Th17 y Treg en mucosa gástrica.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Amplicón	Referencia
<i>T-bet/ TBX21</i>	Forward	CAACAACCCCTTTGCCAAAG	108 nt	Yang et al 2007
	Reverse	TCCCCAAGCAGTTGACAGT		
<i>GATA3</i>	Forward	AGAACCGGCCCTTATGAA	71 nt	Yang et al 2007
	Reverse	AGTTCGCGCAGGATGTCC		
<i>RORγt</i>	Forward	GACCCACACCTCACAATTGAAGT	125 nt	Deng et al 2021
	Reverse	AGTAGGCCACATTACACTGCT		
<i>FOXP3</i>	Forward	5'-CTCATGATAGTGCCTGTGTCCTCAA-3'	92 nt	Zang et al 2017
	Reverse	5'-AGGGCCAGCATAGGTGCAAG-3'		
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3'	122 nt	Ivanov et al 2006
	Reverse	5'-CCATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG-3'		

8. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de comparación de medias por *t* de Student, en los análisis relacionados con la comparación de BF y bacteria planctónica. Se aplicó análisis de varianza en el desarrollo de BF *in vitro* para crecimiento de la bacteria y formación de BF, así como en el cálculo de área total de formación de BF en diferentes condiciones. Mientras que para medir la actividad de células fagocíticas en peritoneo de ratón y neutrófilos ante bacteria planctónica o BF se realizaron pruebas *t* de Student.

Con respecto a la modulación inmune de BF sobre linfocitos T, se realizó un análisis de correlación bivariada. Para la correlación de los niveles de expresiones del gen *16s ribosomal* de *H. pylori* así como de los factores de transcripción humanos *ROR γ t*, *GATA3*, *Tbet* y *FoxP3* con respecto a los niveles de RNAm del gen bacteriano *luxS*, se realizó un análisis de correlación bivariada mediante el método de Spearman. Las correlaciones positiva/negativa se presentaron considerando los siguientes rangos del factor de correlación Rho de Spearman (ρ): Muy alta correlación, $\rho > +/- 0.9$; Alta correlación, $+/- 0.9-0.7$; Moderada, $+/- 0.7-0.5$; Baja, $+/- 0.5-0.3$; Sin correlación, $+/- 0.3 > \rho$ (Mukaka, 2012).

VII. RESULTADOS

1. Caracterización de *H. pylori*

A fin de caracterizar el aislado clínico de *H. pylori* (A97) utilizado, se realizó el análisis microbiológico de esta bacteria, incluyendo análisis microscópico, pruebas bioquímicas e identificación molecular. Las colonias observadas en el medio agar sangre se presentaron como colonias pequeñas circulares, transparentes y no hemolíticas características que corresponde a la morfología colonial típica de *H. pylori*. Microscópicamente se observaron bacilos ligeramente espirilares y formas cocoides Gram negativas y la bacteria fue tanto ureasa como catalasa positiva (Figura 19A-B).

Molecularmente, el producto de amplificación observado en el gel de agarosa, a partir del DNA extraído en el cultivo de *H. pylori*, presenta una banda ligeramente por encima de los 200 pb que corresponde al fragmento de 204 pb esperado para el gen *glmM*. Como control negativo se utilizó DNA de *Lactobacillus rhamnosus* con el cual no se presentó banda de amplificación como en *H. pylori* (Figura 19 C carril 2).

Caracterización de los factores de virulencia

En la bacteria utilizada se demostró la expresión génica de los factores de virulencia CagA y VacA. En la bacteria se identificó la amplificación correspondiente al gen *cagA* (asociado a citotoxina A). En el caso del gen correspondiente a la citotoxina VacA, la bacteria presentó la variante polimórfica *s2/m2* pues se generaron las amplificaciones correspondientes (fragmentos de 286 y 352 nt respectivamente) (Figura 19 C).

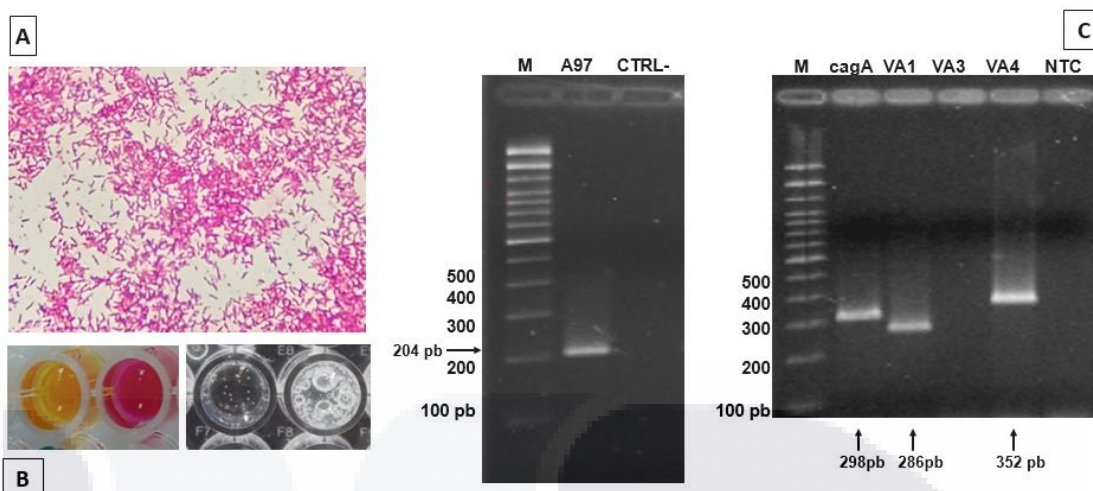


Figura 19. Pruebas de verificación de la especie *H. pylori*. **A.** Tinción de Gram, se observan formas de bacilos Gram negativos. Se distinguen formas espirales y algunas formas cocoides. **B.** Pruebas enzimáticas de ureasa (izquierda) y catalasa (derecha), en ambos casos, resultaron positivas. **C.** Electroforesis en gel de agarosa mostrando la banda en 204 pb que confirma la presencia del gen *ureC* de *H. pylori*. Marcador de peso (M); carril 1, DNA de la bacteria aislada y carril 2, DNA de un cultivo de *Lactobacillus rhamnosus*. En **C.** derecha; caracterización de genes *cagA* y *vacA*. La bacteria contiene el gen de virulencia *cagA* (298 pb) y los fragmentos VA1 con 286 pb correspondiente a *s2* y VA4 con 352 pb correspondiente a *m2*.

2. Evaluación de la formación de BFs *in vitro*

2.1. Adición de β -ciclodextrina (β -CD) y uso de caldo *Brucella* (BB).

Se realizó una comparación con medio ICC y BB, señalado en la Figura 12 (sección 2.1). El crecimiento de *H. pylori* se desarrolló a 2, 3, 4 y 5 días adicionando β -CD y FCS. En un comparativo de la cinética de crecimiento para ambos medios suplementados con β -CD y FCS, se observó que existe una diferencia significativa en crecimiento, para todos los días probados. En ensayos con β -CD y FCS, sólo β -CD o sólo FCS, la bacteria muestra un mayor crecimiento en ambos medios cuando son suplementados con ambos: β -CD y FCS, y además el crecimiento de la bacteria fue siempre mayor para BB. En los medios con β -CD sin añadir FCS, el crecimiento es menor tanto para BB como para ICC. Se observó además que el tratamiento de BB con β -CD y FCS fue significativamente diferente al resto de los tratamientos (Figura 20).

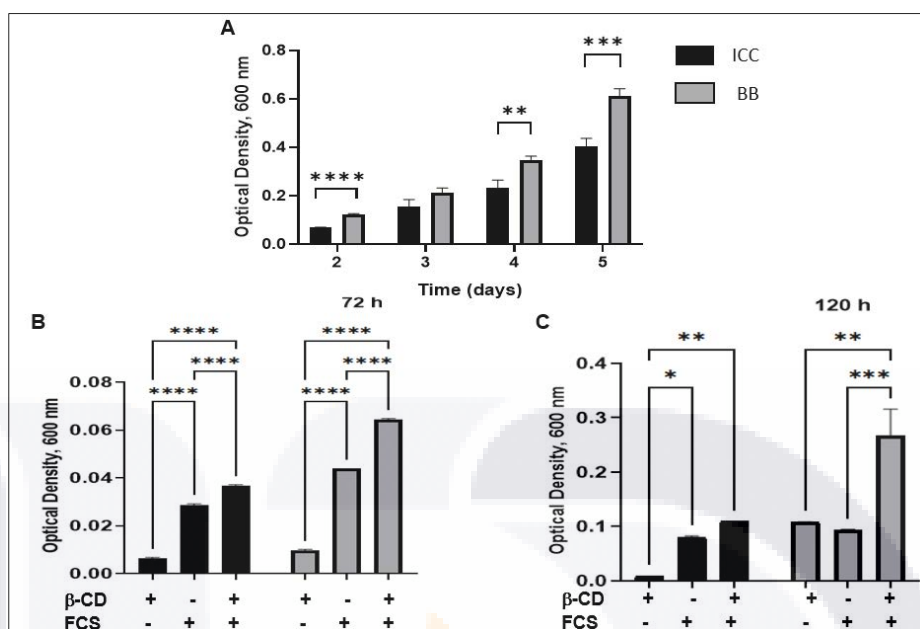


Figura 20. Crecimiento de *H. pylori* en ICC o BB, OD a 600 nm. El crecimiento de la bacteria es mayor conforme se incrementa el tiempo (**A**). Se prueban diferentes condiciones en placa de cultivo A 72 (**B**) y 120 h (**C**). El mayor crecimiento de la bacteria se da en el medio BB con β -CD y FCS y el menor crecimiento es para ambos medios con β -CD pero sin FCS. Cada condición se realizó por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor promedio. Se realizaron prueba t de Student en **A** y ANDEVA unidireccional con prueba *post hoc* de Tukey en **B** y **C** ($P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$ y $P \leq 0.0001^{****}$).

Crecimiento de *H. pylori* en BB con ASB y FCS a diferentes concentraciones.

Posteriormente, para asociar el componente proteico relacionado al FCS en la formación de BF, se realizaron experimentos en los que se cuantificó el crecimiento de la bacteria y formación de BF. En esta ocasión el tiempo de incubación fue a 5 días en BB y en las condiciones de: glucosa al 0.3 %, β -CD 0.1 % y antibiótico de selección. Se probaron las concentraciones de 0, 2.5, 5.0, 7.5% de ASB y FCS en contenido proteico en ensayos independientes. Los resultados indicaron que conforme se incrementaba la concentración de estos componentes y, por tanto, de proteína, aumenta en ambos casos el índice de crecimiento de la bacteria y disminuía la formación de BF expresadas ambas mediciones en OD a 600 y 550 nm respectivamente (Figura 21).

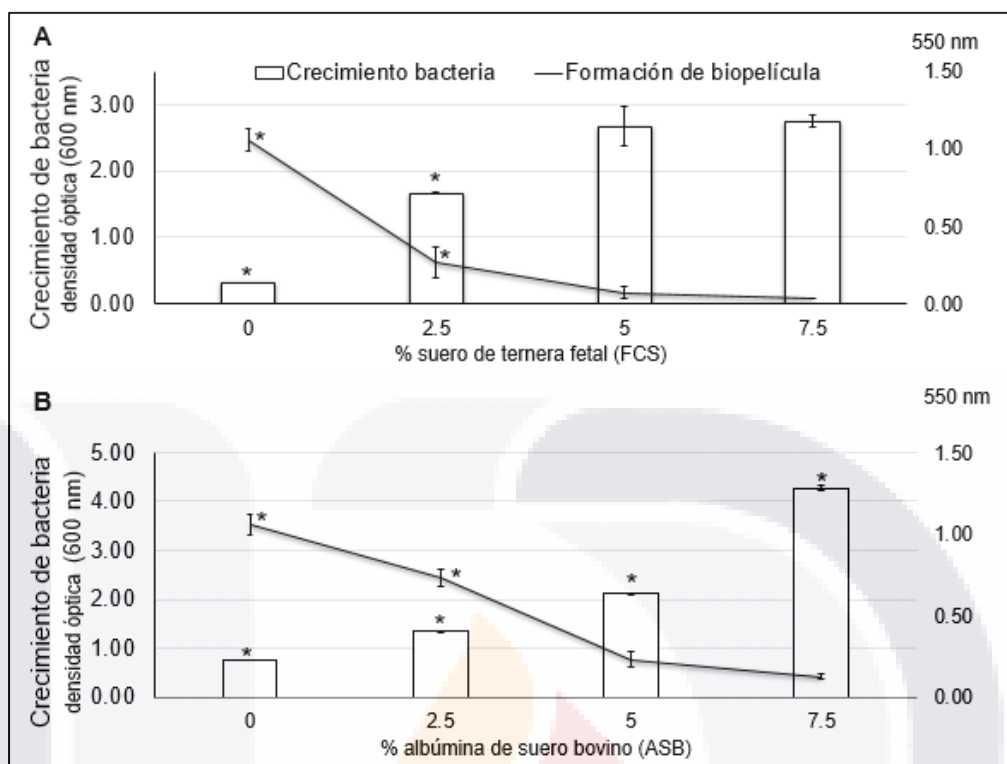


Figura 21. Crecimiento y formación de BF por *H. pylori*. Diferentes concentraciones de FCS y ASB son probadas con 5 días de incubación en medio BB. A mayor concentración de FCS y ASB se presenta un mayor crecimiento, pero disminuye la formación de BF (* $P \leq 0.05$).

2.2. Identificación y cuantificación de BF

En la comparación de los medio BB e ICC con el uso los complementos β -CD y FCS para cuantificar de la formación de BF. Se observó una mayor formación de BF con el complemento β -CD tanto en ICC como en BB, obteniendo las OD más altas (0.019 ± 0.007 y 0.54 ± 0.003 respectivamente) con respecto a los medios suplementados con ambos y solamente con FCS. Por tanto, el mayor desarrollo de BF entonces, no fue en las condiciones en las que se observó mayor crecimiento de bacteria (Figura 22). Se presentó una diferencia estadística significativa en la comparación de medias por pares, cada tratamiento resulta diferente a excepción de ICC con FCS e ICC con ambos componentes (β -CD y FCS).

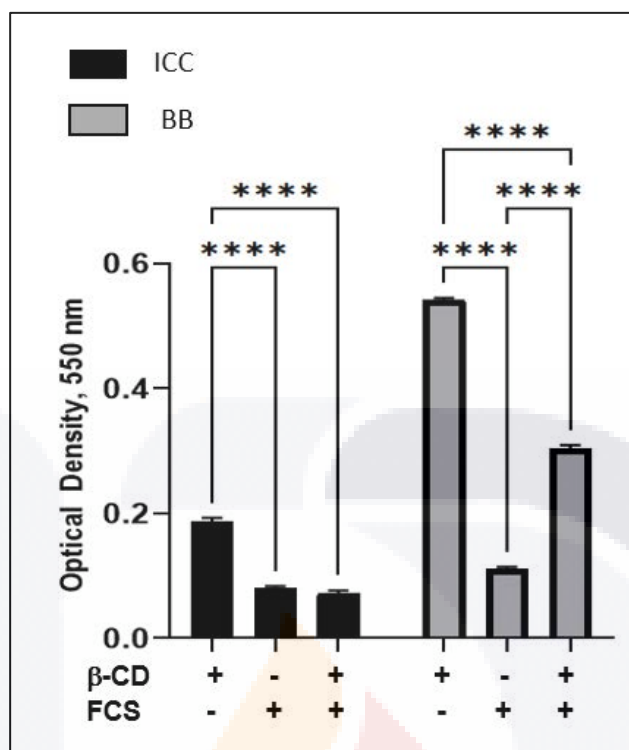


Figura 22. Lecturas de OD para BFs desarrolladas en diferentes condiciones a 72 h. Con experimentos en medio ICC y BB, la BF se forma en mayor cantidad para medio BB en cualquier condición respecto a ICC y además, adicionando solamente β -CD, la OD es mayor en ambos medios con respecto a las otras condiciones. Cada ensayo se realizó por triplicado ($P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.001^{***}$ y $P \leq 0.0001^{****}$).

Cinética de formación de BF en ICC vs. BB

Así como se observó en la cinética de crecimiento, al medir la formación de BF en ambos medios siempre fue mayor formación en el medio BB. En el quinto día la diferencia del valor de OD para BB se incrementó 2 veces con respecto a ICC (2.062 ± 0.273 vs 1.037 ± 0.186). Al realizar la comparación de medias para cada día, en todos los casos hubo una diferencia estadísticamente significativa, la diferencia entre las medias, es mayor a la dispersión de los valores dentro de cada día o tratamiento (Figura 23).

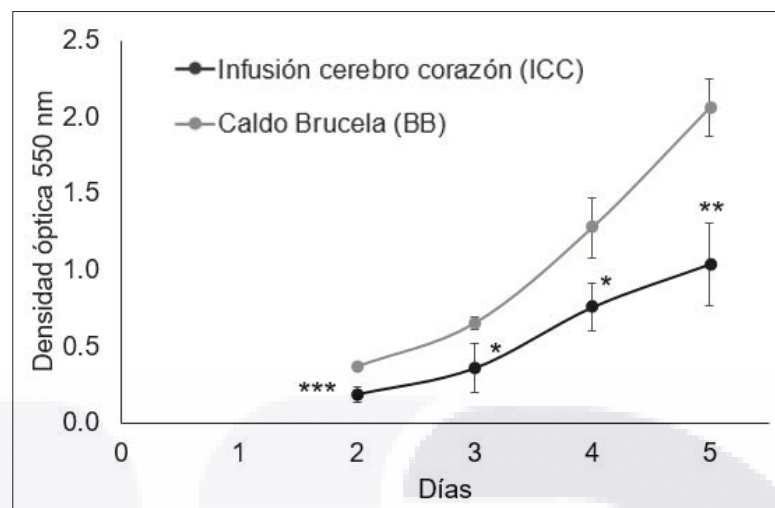


Figura 23. Cinética para la formación de BF comparando medio ICC vs. BB. Se observa a través de los días una mayor OD y formación de BF en medio de BB. Cada condición se realizó por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor promedio. Se realizó prueba *t* de Student para cada día ($P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$ y $P \leq 0.001^{***}$).

Visualización microscópica de formación de BF por *H. pylori*

Los cubreobjetos introducidos dentro del medio de cultivo de ICC en caja Petri, se tiñeron con cristal violeta y otros con carbol-fucsina. Se observaron al microscopio para analizar la formación de BF. Se observaron al microscopio, agregados celulares (microcolonias) desde el día 3 (Figura 24). Para los experimentos en los que se comparó medio ICC y BB, se observó que para el uso de medio BB adicionado con β -CD se visualizan BFs más desarrolladas y estructuradas. Asimismo, para todas las condiciones ensayadas con medio BB, se visualiza un mejor desarrollo de BF con respecto a ICC (Figura 25).

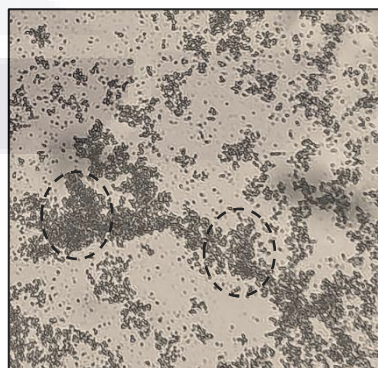


Figura 24. Formación de agregados en experimento realizado para formación de BF en cubreobjetos inmersos en medio de cultivo a 40x. Se observan agregados de bacterias con una incubación de 3 días (líneas punteadas) que indicaron el inicio de formación de BF por parte de *H. pylori*.

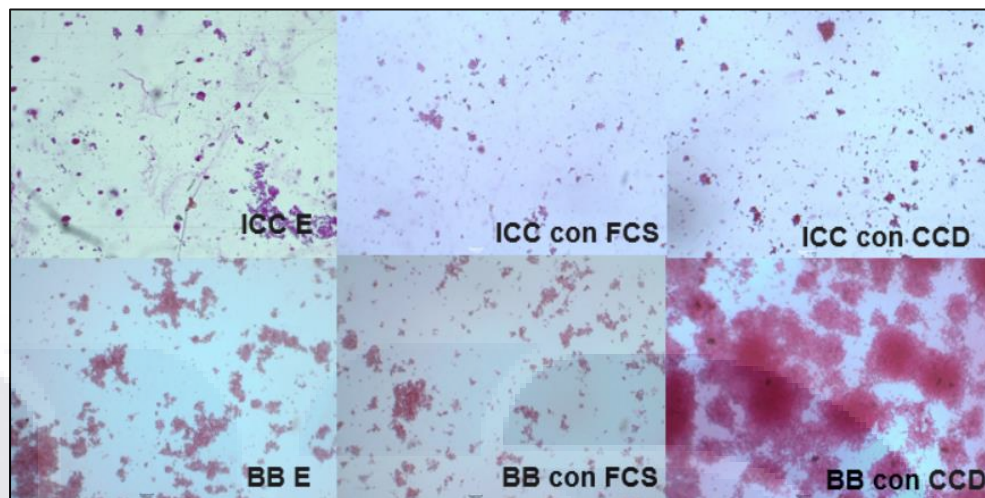


Figura 25. Desarrollo de BF en diferentes condiciones a 40x en cubreobjetos a 5 días de crecimiento. Arriba izquierda: BF desarrollada en medio ICC con ambos complementos (E), en el centro arriba con FCS y derecha arriba con β -CD. Abajo izquierda: medio BB con ambos complementos (E), centro abajo: con FCS y derecha abajo, medio ICC con β -CD. El desarrollo más notorio es con medio BB con ambos complementos y con β -CD solamente. El crecimiento en ICC es muy pobre.

2.3. Cálculo de área total con BF

El cálculo de área en la que se desarrolló BF se realizó por campo de visualización en el microscopio. Se calibró la distancia en píxeles a micras y por medio del contraste en áreas que el software ImageJ detectó, se arrojó un área promedio de desarrollo de BF (Figura 26). Al realizar la cuantificación del área de BF para cada tratamiento, se encontró una diferencia significativa para el tratamiento de BB con β -CD (235.305 ± 8.18), con respecto al resto de las condiciones (Tabla 4).

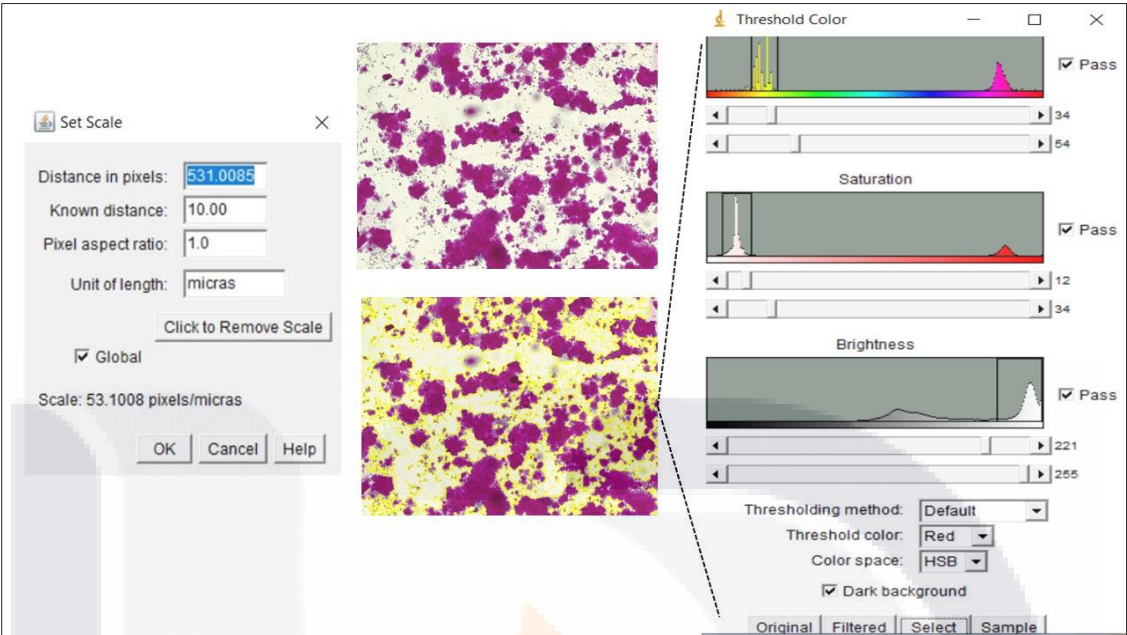
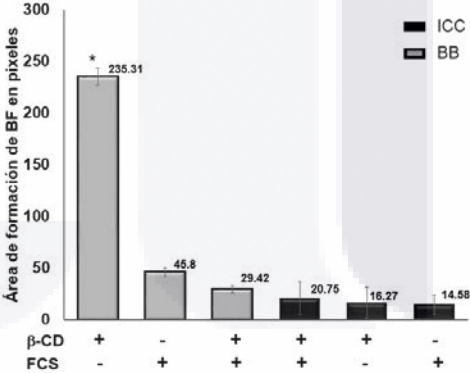


Figura 26. Cálculo de área promedio de BF con el software Image J 1.53. Con una previa calibración de pixeles a micras, se ajustó la imagen para que por medio del contraste, se cuantificaran las áreas con desarrollo de BF vs. fondo sin color.

Tabla 4. Áreas promedio de BF calculadas (10 lecturas)

Medio y componentes	Media	Agrupación
BB con β-CD	235.31 ± 8.18	A
BB con FCS	45.80 ± 3.93	
BB β-CD + FCS	29.42 ± 3.52	B C
ICC β-CD + FCS	20.75 ± 15.52	B C
ICC con β-CD	16.27 ± 48.74	B C
ICC con FCS	14.58 ± 9.13	C



Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Se indica el valor medio ± SD

2.4. Visualización de BF in vitro en microscopía electrónica

Adicionalmente, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) también fue valorado el efecto de los distintos porcentajes de FCS sobre la formación de BF. Se identificó que conforme fue disminuyendo el porcentaje de FCS, se presentó un incremento en la generación de la estructura de la BF. En ausencia de suero se alcanza la mayor estructuración de BF, la cual fue disminuyendo a partir de la aplicación FCS (2.5%) y manteniendo una pobre formación en presencia de los otros porcentajes de suero analizados (5 y 7.5%) (Figura 5A, 5B, 5C y 5D). En ausencia de FCS, se pudo distinguir dentro de la BF una variada morfología de la bacteria que incluyo formas cocoides y bacilo espirilares, identificándose la presencia de flagelos en algunos bacilos. La BF por SEM fue identificada como la presencia de estructuras irregulares que son diferentes a una morfología celular y en la que, además, se presentan inmersas, diferentes formas bacterianas (Figura 27).

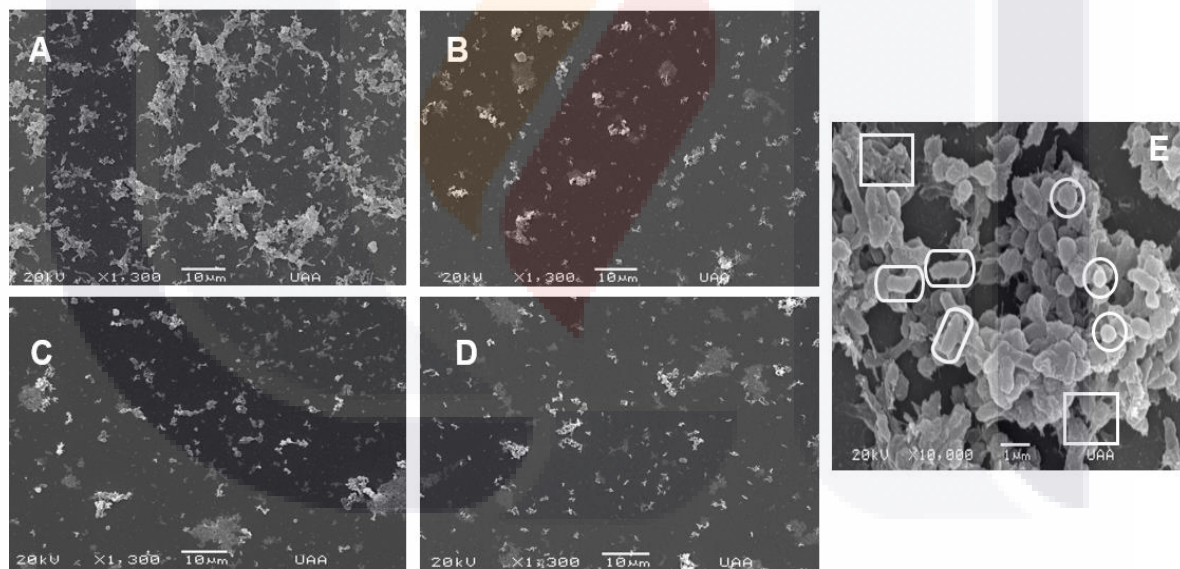


Figura 27. Biopelícula de *Helicobacter pylori* por microscopía electrónica, Imágenes en 1300X. Una mayor estructuración de la biopelícula se aprecia en **A**, que es la desarrollada en las condiciones con caldo Brucella y 0.3% de glucosa, 0.1% de ciclodextrina, 0.4% de antibiótico de selección y 1.5×10^6 bacterias de inóculo inicial. En **B**, **C** y **D**, se añade componente en el caldo Brucella de suero de ternera fetal a 2.5, 5.0 y 7.5% respectivamente, lo que no permite un desarrollo de biopelícula tan eficiente como en **A** con 0%. En **E**, se observan algunas estructuras adoptadas por la bacteria a 10 000X como bacilos (óvalo) o cocos (círculo) y componentes no celulares (cuadro).

3. Formación de BF *in vivo*

3.1. Modelo experimental murino de infección por *H. pylori*

De acuerdo con los objetivos originales del proyecto de tesis se planteó analizar el efecto *in vivo* de la BF de *H. pylori* sobre parámetros inmunológicos en un modelo de infección experimental en ratón. Por lo que posterior a la inoculación de la bacteria en los animales y transcurrido el periodo considerado para permitir la colonización gástrica (6 semanas), se buscó demostrar que la bacteria realmente hubiera infectado los ratones de experimentación, realizando el análisis del tejido gástrico por cultivo y estudio molecular.

Análisis de tejido gástrico mediante cultivo

Los tejidos macerados y sembrados en agar sangre, se incubaron en las mismas condiciones en las que la bacteria crece. Se aislaron y resembraron las colonias con características similares a *H. pylori*. Pasadas 72 h de la resiembra, las pruebas bioquímicas (catalasa y ureasa) resultaron negativas para las colonias aisladas. Adicionalmente se realizó tinción de Gram de cada uno de los aislados bacterianos obtenidos, la morfología identificada en todas las bacterias analizadas se presentó distinta a la correspondiente a *H. pylori*.

Análisis molecular de tejido gástrico

Para la detección de DNA de *H. pylori* en los tejidos aislados de ratones infectados se realizó el aislamiento de DNA a partir de tejido gástrico y se probaron los genes correspondientes a la detección de la presencia de la bacteria (Figura 28). En la amplificación por PCR de las muestras de tejido gástrico de los ratones infectados, se encontraron bandas del gen *ureC* para: A2, A4, C4, A5 y A6. Se introdujeron además muestras control que consistieron en ratones sin infectar a los cuales se les tomó muestra de antro y cuerpo del estómago. La temperatura de alineamiento se estableció en 66 °C (Figura 29).

Identificación molecular de *H. pylori* con *ureA*

Se realizó la detección molecular de los genes *16S*, *ureA*, *cagA*, *vacA* para confirmar la presencia de la infección por *H. pylori* en las muestras gástricas de ratón. Se presentaron bandas en algunas de las muestras de ratones infectados, aunque también en muestras que sirvieron como control. El fragmento del gen *ureA* con el que se trabajó, es el que

presenta mayor consistencia en los resultados. Sin embargo, la infección en ratones no pudo ser confirmada (Figura 30). Por lo anterior se consideró como una estrategia alternativa para el estudio *in vivo* del efecto de la BF sobre los parámetros inmunológicos, el análisis de tejido gástrico humano a partir de pacientes con la infección de la bacteria (Se describe en apartado 6 de resultados).

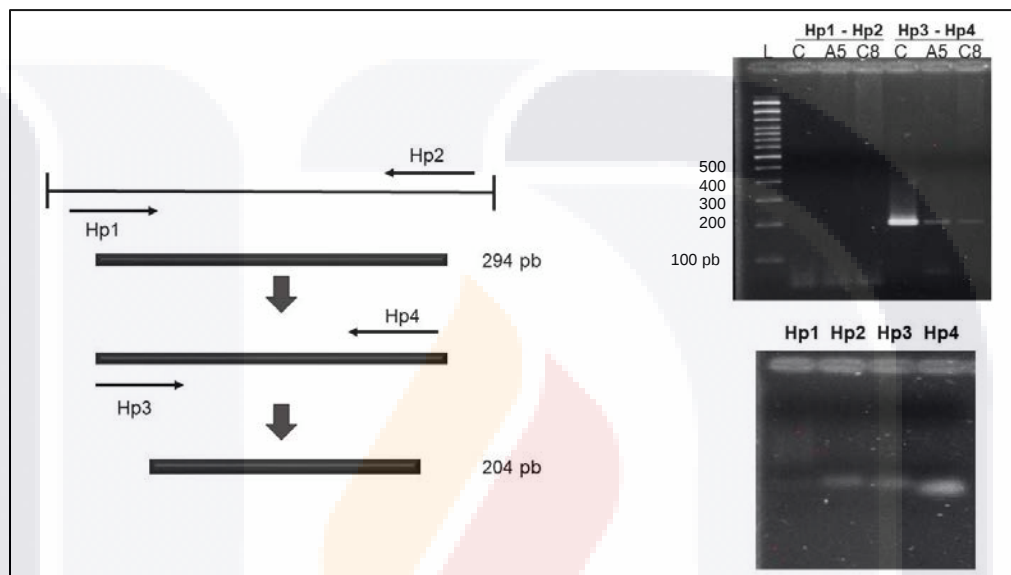


Figura 28. Primers utilizados para la identificación del gen *ureC*, que indicarían la presencia de la infección en las muestras de ratones infectados. De lado izquierdo de la figura, se muestran los fragmentos a probar al realizar la PCR. Lado derecho, geles de agarosa con la identificación de los fragmentos amplificados para dos muestras de DNA aislado de antro pilórico (A) y cuerpo gástrico (C), imagen inferior lado derecho: migración de oligonucleótidos.

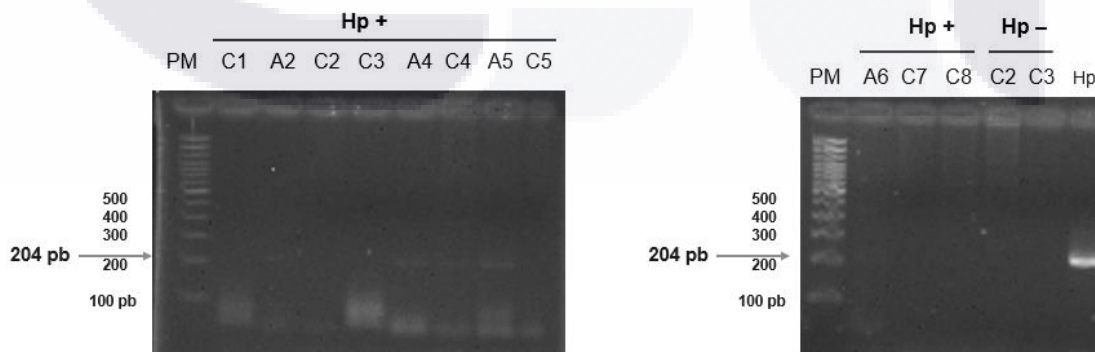


Figura 29. PCR para fragmento Hp3-Hp4 del gen *ureC*. Se distinguen bandas a 204 pb en: A2, A4, C4, A5 y A6 de los ratones infectados. C2 y C3 en la segunda imagen a la derecha, corresponden a muestras de tejido gástrico en ratones no infectados (Hp -). El carril Hp en la segunda imagen es DNA de bacteria planctónica.

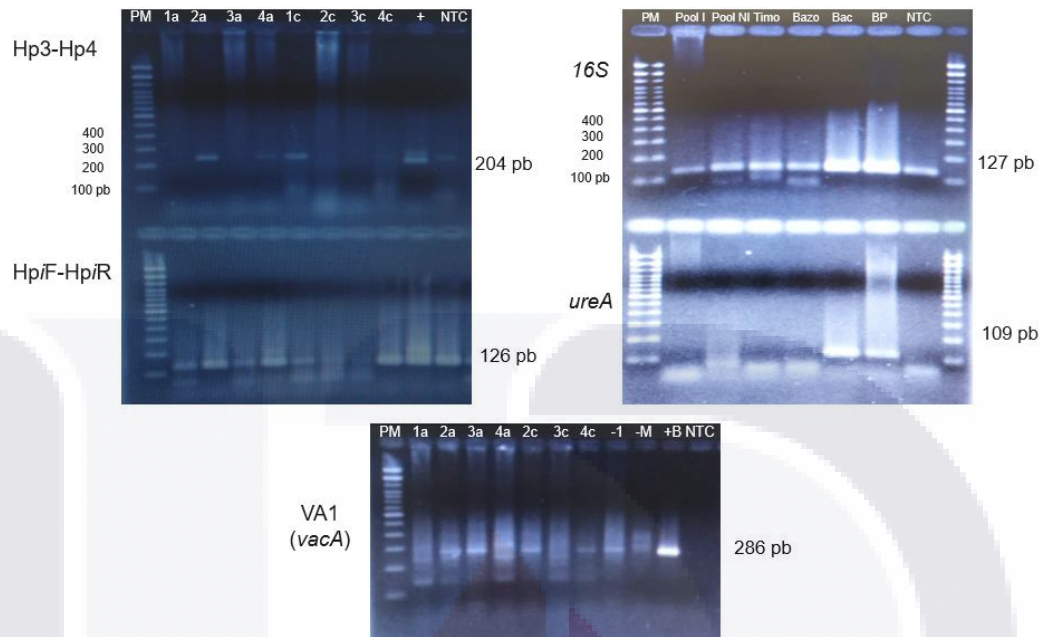


Figura 30. Muestras de DNA en biopsias gástricas de cuatro ratones infectados (muestras identificadas como 1a, 2a, 3a, 4a, 1c, 2c, 3c y 4c) y de controles negativos (timo y bazo de ratones no infectados) son probados en fragmentos de los genes *16S*, *ureA* y *vacA*, además del gen *ureC* (fragmentos identificados como Hp3-Hp4 y HpI-F-HpI-R) como indicadores de infección por *H. pylori*. Los controles positivos fueron DNA de bacteria en estado planctónico y DNA extraído de biopelícula (BF) formada por *H. pylori*. Se presentaron bandas en las muestras de ratones infectados pero, en algunos casos también en los controles negativos como timo, bazo, músculo (-M) y Pool NI que es DNA de muestras gástricas a partir de ratones no infectados. Sólo en el gen *ureA* se presentan bandas únicamente en los controles positivos correspondientes a DNA de bacteria y BF.

3.2. Análisis de expresión de genes bacterianos indicadores de BF in vivo

Como parte de la implementación del análisis *in vivo* de BF, se buscó identificar genes bacterianos que pudieran estar asociados a la formación de esta estructura, pero mostrando un comportamiento de expresión diferencial entre BF y la bacteria planctónica. Lo anterior con la finalidad de utilizar la expresión génica como un indicador de la presencia de BF en la mucosa gástrica. En este análisis se realizó la extracción de RNA a partir de bacteria en estado planctónico y bacteria en estado de BF para posteriormente determinar la expresión de los genes bacterianos *ureA*, *Omp18*, *lpxD*, *flaA* y *luxS* mediante RT-PCR de estas muestras. Simultáneamente se realizó el análisis de expresión del gen constitutivo *16S*. Para evaluar de una mejor manera las diferencias de expresión entre ambos estados bacterianos la amplificación de PCR se realizó tanto a 30 como a 40 ciclos. El análisis en geles de agarosa de los productos de RT-PCR para 30 ciclos de amplificación muestran la

expresión diferencial entre la forma planctónica y la BF de los genes *ureA* y *luxS* esto evaluado por la intensidad de bandas. El gen *16S* de expresión constitutiva presento la misma intensidad de las bandas en ambas muestras (Figura 31). Cuando se analizó el patrón de expresión a 40 ciclos se encontró que en el caso *ureA* se identifica expresión en ambos estados bacterianos pero encontrando expresión diferencial nuevamente en *luxS*. Adicionalmente a 40 ciclos se identificó expresión de *lpxD* sólo en el estado planctónico, situación no identificada a 30 ciclos, señal de una expresión diferencial, pero con bajo nivel de mensajero (Figura 31).

Posteriormente se realizó una repetición de PCR exclusivamente para *lpxD* y *luxS* tanto a 40 como a 30 ciclos para confirmar los resultados. Se visualizó la diferencia en intensidad de bandas con un patrón semejante a los resultados anteriores (Figura 32). Lo que permitió definir que estos dos genes pueden funcionar para monitorear la presencia o ausencia de BF en los ensayos in vivo. Aunque se consideró más adecuado el uso del gen *luxS* por presentar mayores niveles de mensajero en la forma planctónica en relación con *lpxD*, esto en base a la comparación de la intensidad de banda de ambos genes tanto a 30 como a 40 ciclos

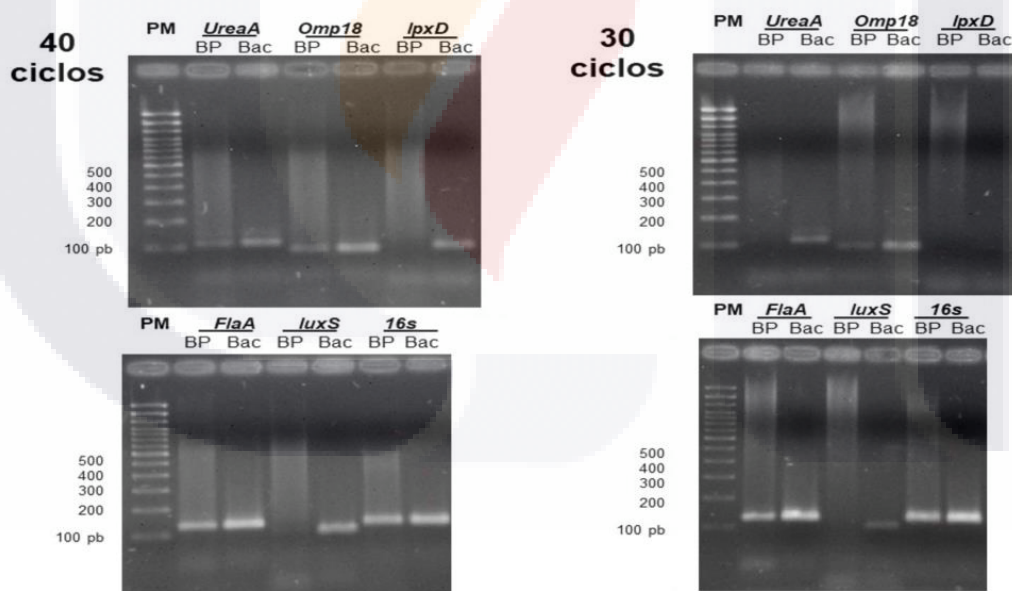


Figura 31. PCR de muestras de BF y bacteria planctónica para genes asociados a formación de BF. 5 genes son probados para distinguir su expresión diferencial en BF y bacteria de *H. pylori* en estado planctónico. Se realiza en 40 y 30 ciclos y se prueba además el gen constitutivo denominado 16s. Los genes *lpxD* y *luxS* son los que arrojan una diferencia más marcada en intensidad de bandas, tanto en 40 ciclos como en 30 ciclos.

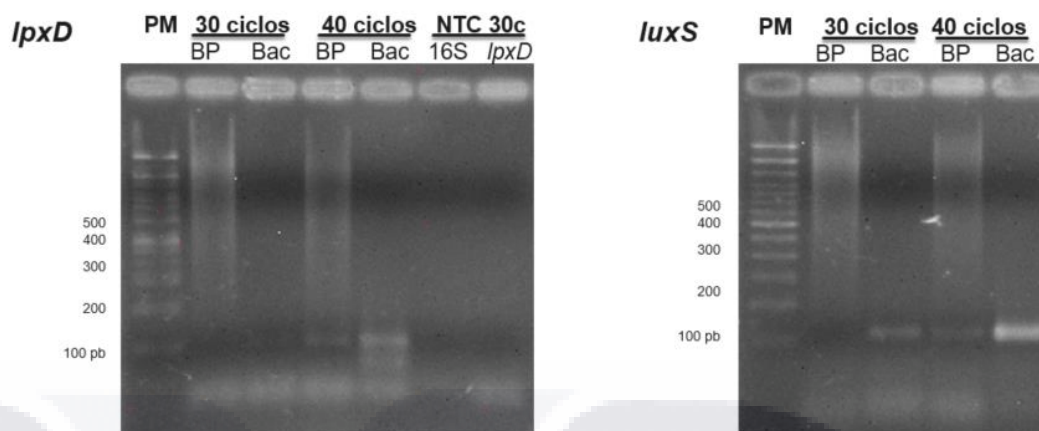


Figura 32. PCR para genes *lpxD* y *luxS* asociados a BF. Se distingue la diferencia en intensidad de bandas tanto en 30 como en 40 ciclos.

4. Estimulación de receptores de patrones moleculares a patógenos en leucocitos

4.1. Caracterización de sonicado de bacteria y BF

La bacteria y BF sometidos a sonicación, fueron probados a siembra en agar sangre en las mismas condiciones de crecimiento para *H. pylori* y además en agar ICC a 37 °C por 24 h. De esta forma fue como se comprobó que el sonicado no presentara bacterias viables de *H. pylori* o contaminación bacteriana de otro microorganismo. Además, se realizó un análisis electroforético con tinción posterior de azul de Coomassie que permitió observar la presencia de proteínas, así como su integridad (Figura 33 F). También se cuantificó, espectrofotométricamente (595 nm), la concentración de proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) tanto del sonicado de bacteria planctónica como de la BF por el método de Bradford, contra una curva de concentración de albúmina sérica bovina.

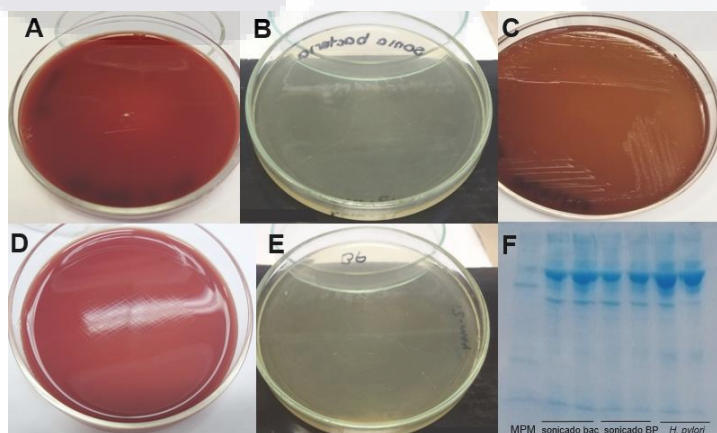


Figura 33. Siembra de sonicado de bacteria y BF de *H. pylori* para comprobar el no crecimiento de la bacteria o bien, alguna contaminación. En **A.** y **D.** siembra en agar sangre de sonicado de bacteria y BF respectivamente. En **B.** y **E.** siembra de ambos sonicados en ICC. En **C.**, cultivo característico de *H. pylori* y en **F.** análisis de sonicado en SDS-PAGE para comprobar la integridad de las proteínas.

4.2. Condiciones de estimulación de leucocitos

Utilizando como estandarización del método, un extracto proteico de leucocitos estimulados con LPS de *E. coli* a 1.5 $\mu\text{g/ml}$, se realizaron diversos experimentos que implicaron el uso de diferentes diluciones de anticuerpo, así como diferentes concentraciones de extracto proteico que permitieron establecer las diluciones de trabajo adecuadas para el anticuerpo anti- de $\text{IKB}\alpha$, así como anti- β -actina. De esta forma se encontró que en diluciones de 1:250 de ambos anticuerpos y una concentración de 70 $\mu\text{g/ml}$ en los extractos proteicos se detectaron bandas para las proteínas de referencia β -actina y para $\text{IKB}\alpha$ (Figura 34).

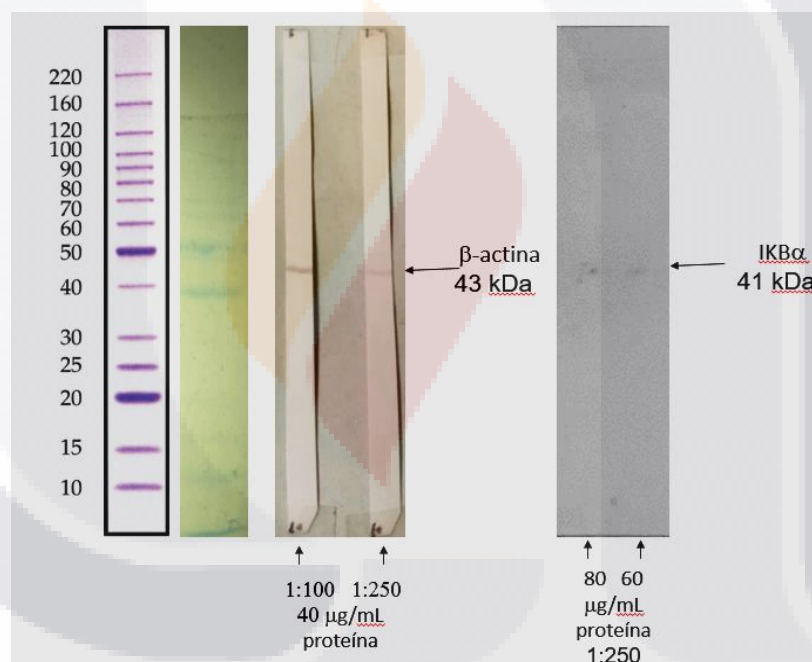


Figura 34. Electroforesis e inmunoblot en extracto de lisis total. Tanto en el gel teñido con azul de comassie como en la membrana de pvdf.

4.3. Expresión de $\text{IKB}\alpha$ y β -actina en leucocitos humanos estimulados con sonicado de bacteria y BF

La expresión de la fracción $\text{IKB}\alpha$ ($\text{NF}\kappa\text{b}$) se calculó como un índice en relación con la intensidad de banda de $\text{IKB}\alpha$ y la proteína constitutiva β -actina. Así, al someter a

estimulación leucocitos humanos con sonicado de bacteria *H. pylori*, se observó una expresión más alta con respecto al blanco (leucocitos sin estimular con un valor de 0.63) siendo de 0.69 cuando se añadió 35 μg y de 0.73 cuando se añadió 50 μg de sonicado. Para el testigo de LPS (*E. coli*) el índice con respecto a β -actina fue de 0.73, similar a 50 μg de sonicado de bacteria. Por otro lado, para el ensayo de estimulación con BF de *H. pylori*, la expresión de $\text{IKB}\alpha$ (NF- κB) fue mayor con respecto a la proteína constitutiva β -actina (índices >1). El índice fue mayor con respecto al blanco en el tratamiento de LPS (4.88 vs. 4.12) y con 15 μg de extracto de BF fue de 5.52. Sin embargo, con 30 μg de sonicado de BF el índice fue menor (3.14 veces) que el blanco en ese ensayo, es decir, a mayor cantidad de componentes de BP podría haber una menor activación de este factor de transcripción (Figura 35).

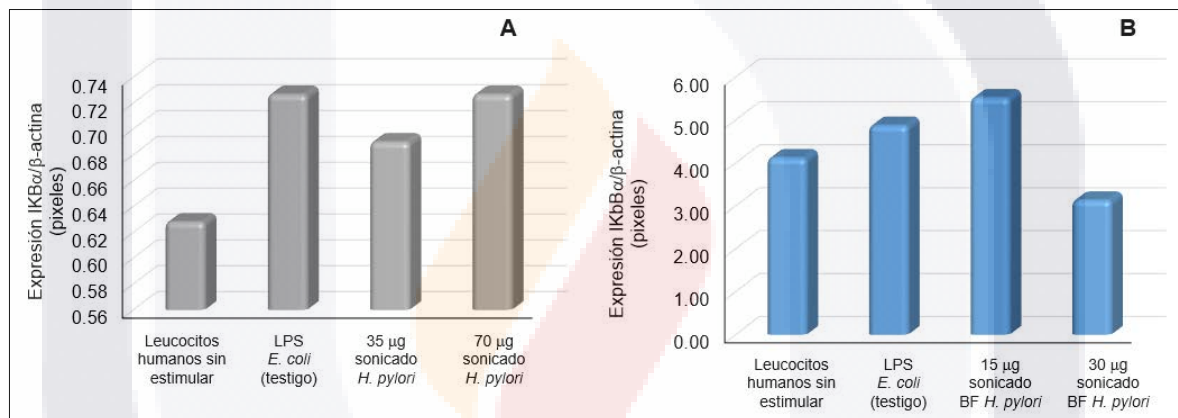


Figura 35. Intensidad de bandas en membranas pvdF en técnica Western blot, normalizadas con control de β -actina. **A.** Corresponde a los tratamientos de leucocitos humanos estimulados con sonicado de bacteria y **B.** correspondiente a los estimulados con sonicado de BF de *H. pylori*

5. Actividad antifagocitaria de la BF

5.1. Caracterización de *Staphylococcus aureus*

Se realizaron las pruebas para caracterizar a la bacteria *S. aureus* de acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014, y la cepa de trabajo resultó catalasa+, coagulasa+, termonucleasa+, enzimas que constituyen factores de virulencia en esta especie (Figura 36).

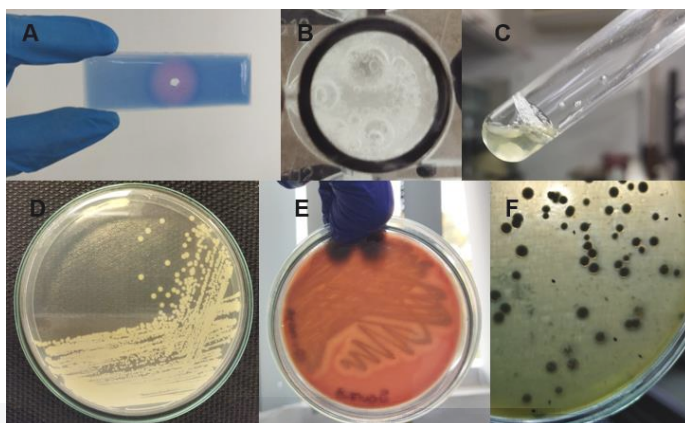


Figura 36. Pruebas de caracterización de *S. aureus*, de acuerdo a la NOM-210-SSA1-2014. **A.** Prueba de term nucleasa (+). **B.** Prueba de catalasa (+). **C.** Prueba de coagulasa (+). **D.** Colonias de *S. aureus*. en agar ICC redondas, convexas de color amarillo-dorado. **E.** Prueba de hemólisis y **F.** Siembra en agar Baird Parker y el desarrollo de colonias color negro con halo de lipólisis.

5.2. Estandarización del conteo de *Staphylococcus aureus* para el proceso de fagocitosis

Se realizó una curva de McFarland con 10 estándares (BaSO_4) que permitió obtener una aproximación de las UFC/mL para *S. aureus* y ajustar con precisión el MOI de 1 en la interacción con las células fagocíticas (Figura 37). Además, utilizando las DO de los diferentes puntos de la escala McFarland, se realizó plaqueo mediante diluciones seriadas en agar sal y manitol para confirmar que la densidad celular utilizado coincidía contra las UFC/mL (Figura 38).

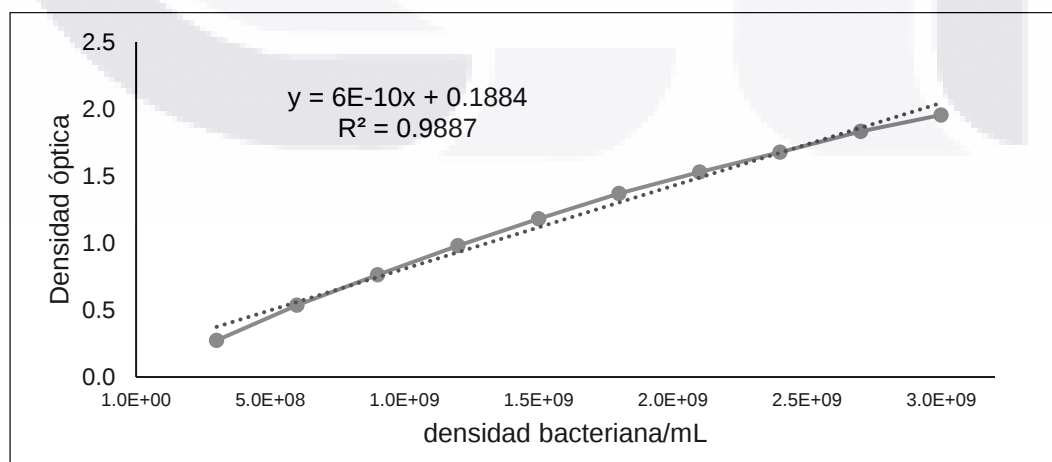


Figura 37. OD para *S. aureus* de la escala McFarland para los ensayos de fagocitosis.

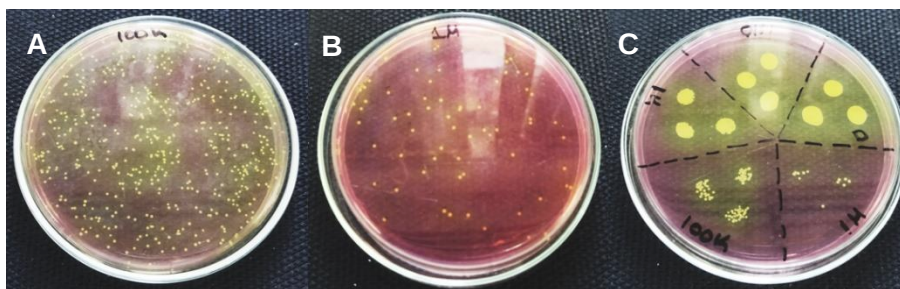


Figura 38. Dilución en serie para establecer las UFC/mL para *S. aureus*, para los ensayos de fagocitosis. En **A**, colonias de *S. aureus* con dilución 1×10^5 , **B** dilución 1×10^6 y en **C** Prueba de goteo para cada dilución realizada.

5.3. Unidades formadoras de colonia de *S. aureus* y fagocitosis en ensayos con células de peritoneo de ratón

Se realizaron diferentes ensayos con las células obtenidas de peritoneo de ratón en los cuales se probaron ciertos volúmenes de sonicado con diferentes equivalencias en contenido proteico de sonicado de *H. pylori* y de BF. Tomando como referencia el 100% de las UFC en células del peritoneo en interacción con *S. aureus*, se encontró que al adicionar sonicado, disminuía progresivamente el número de UFC conforme aumentaba la cantidad de sonicado (en Figura 39-A establecido el volumen añadido en base proteica), desde $93.8 \pm 4.5 \%$ para $8 \mu\text{g}$; $83.0 \pm 16.3 \%$ para $20 \mu\text{g}$; $81.0 \pm 16.3 \%$ para $37.5 \mu\text{g}$; y $52.0 \pm 16.0 \%$ para $75 \mu\text{g}$; aunque sólo se presentó diferencia significativa con la mayor cantidad utilizada que fue de $75 \mu\text{g}$ ($50 \mu\text{L}$) de sonicado de bacteria. Así mismo y para los ensayos con BF, se encontró que las UFCs disminuyeron significativamente a dosis de 15 y $30 \mu\text{g}$ de proteína sonicada de BF, con respecto a las UFCs encontradas en células del peritoneo sin adicionar sonicado de BF (100%). Aunque se presentó un incremento $89.8 \pm 4.5 \%$ para $55 \mu\text{g}$ (Figura 39-B). Es decir, la eliminación de las bacterias por las células fagocíticas se fue incrementando conforme se aumentaba la cantidad de sonicado, a excepción de la mayor cantidad de sonicado de BF añadida, existiendo diferencia significativa de este tratamiento con respecto al resto de tratamientos que se añadió sonicado de BF (15 y $30 \mu\text{g}$).

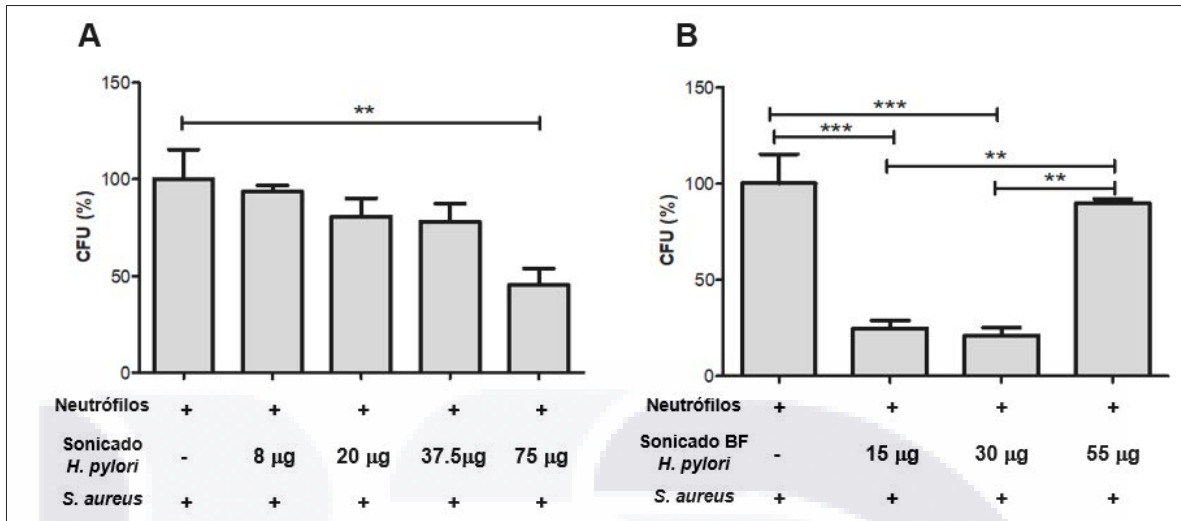


Figura 39. Ensayo de UFCs con células de peritoneo de ratón. Se realizó la estimulación de células fagocíticas de peritoneo con extracto sonificado de bacteria (**A**) y de forma independiente con sonificado de BF de *H. pylori* (**B**). Cada condición se realizó por triplicado. Las barras de error representan las desviaciones estándar para cada valor promedio. Se realizó prueba t de Student para cada tratamiento ($P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$ y $P \leq 0.001^{***}$).

Se obtuvo un ensayo de fagocitosis con diferentes concentraciones en base proteica del sonificado tanto de bacteria planctónica como de BF. En ellos se observó que el porcentaje de células fagocitando fue disminuyendo conforme aumentaba la concentración de sonificado y, además, fue menor para los tratamientos con BF. Presentándose una disminución de hasta el 55% en el tratamiento de 55 µg de sonificado de BF. Esto pudiera indicar una inhibición del proceso de fagocitosis, conforme se encuentra en el medio una mayor cantidad de partículas de sonificado (Figura 40).

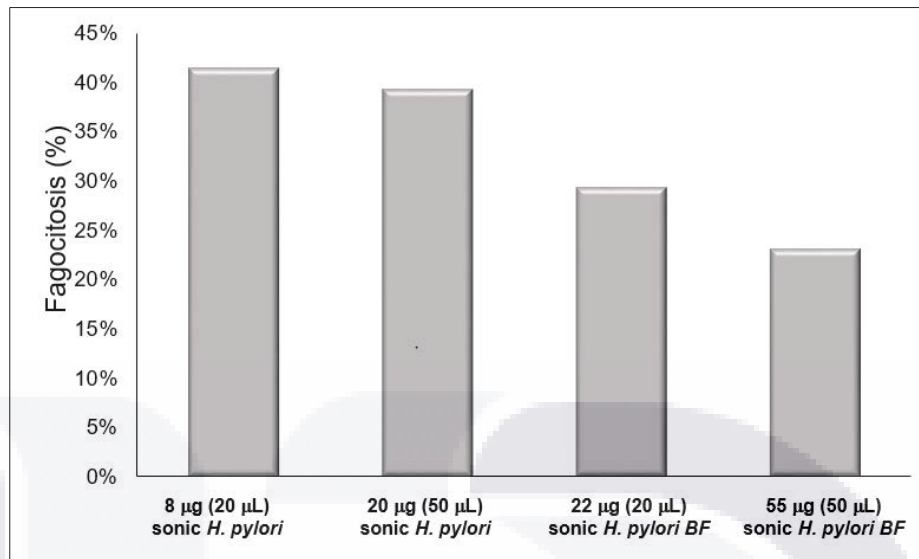


Figura 40. Ensayo de fagocitosis con células de peritoneo de ratón. Se realizó la estimulación de células fagocíticas de peritoneo con extracto sonificado de bacteria y de forma independiente con sonificado de BF de *H. pylori*. Se obtuvo un único ensayo para cada condición y las lecturas en cada laminilla fueron para 200 células fagocíticas.

5.4. Unidades formadoras de colonia de *S. aureus* y fagocitosis en ensayos con neutrófilos humanos.

Al igual que en los experimentos con células fagocíticas de peritoneo de ratón, se presentó una disminución de las UFCs conforme se incrementaba la concentración de sonificado de bacteria, aunque no de manera significativa. Y en presencia de 10 µg de BF sonicada, la viabilidad de *S. aureus* se incrementó con $84 \pm 16.19\%$, pero disminuyendo significativamente hasta un $44 \pm 13.47\%$ con 30 µg de BF sonicada con respecto a 10 µg de BF (Figura 41).

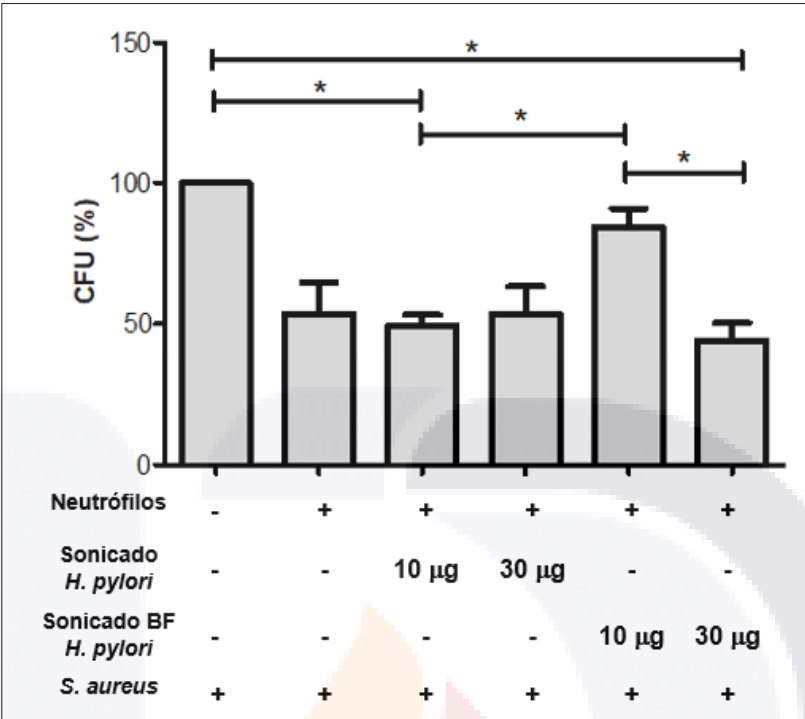


Figura 41. UFC de *S. aureus* en ensayos con neutrófilos obtenidos de sangre periférica humana. Las barras de error representan el error estándar para cada valor promedio. Se realizaron pruebas t de Student ($P \leq 0.05^*$).

Por otro lado, al realizar los ensayos en los que se estimulan PMN humanos ante sonicado de bacteria y BF de *H. pylori* para posteriormente inducir la fagocitosis con *S. aureus* se encontró un 30.69±6.97% de fagocitosis cuando no se añade sonicado vs. un porcentaje de fagocitosis dependiente del tipo y la cantidad de sonicado añadido. Se encontró que en presencia de 30 µg de BF sonicada hubo aproximadamente la mitad (15.38±6.29%) de fagocitosis. Al igual que con las células fagocíticas de peritoneo de ratón, pudiera indicar una inhibición del proceso de fagocitosis, conforme se encuentra en el medio una mayor cantidad de partículas de sonicado. Resaltando que la concentración de sonicado en base proteica para este ensayo, ya se encontraba estandarizada (Figura 42).

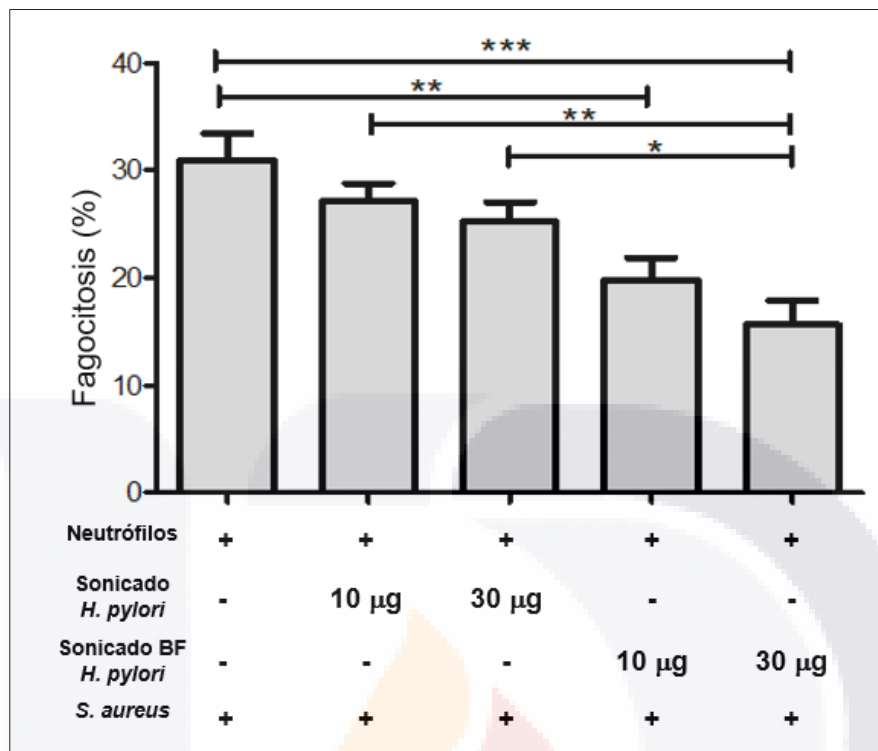


Figura 42. Ensayo de fagocitosis con neutrófilos obtenidos de sangre periférica humana. Las barras de error representan el error estándar para cada valor promedio. Se realizaron pruebas t de Student ($P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$ y $P \leq 0.001^{***}$).

5.5. Visualización al microscopio de células fagocíticas en peritoneo de ratón

Por medio de tinción de Giemsa-Wright, se estableció la viabilidad de las células de peritoneo a lo largo de todo el experimento y además se distinguieron las células que han fagocitado tanto el material sonificado como la bacteria añadida (Figura 43). Se distinguieron también en los ensayos, las células que presentaron deformación debida al proceso de interacción con el estímulo (sonificado) y *S. aureus* (Figura 44).

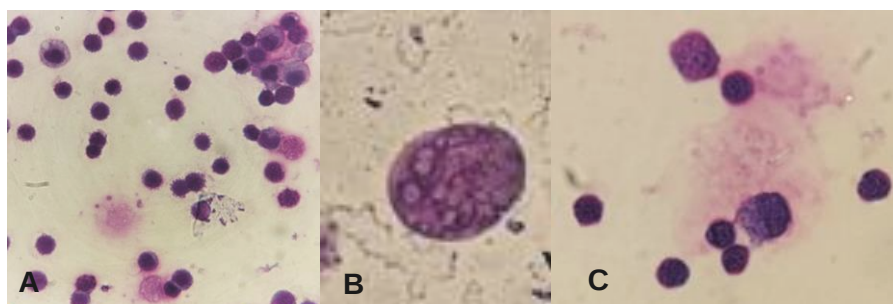


Figura 43. Imágenes al microscopio (100x) con tinción Giemsa-Wright en las que se distinguieron el tipo de células extraídas antes del proceso de fagocitosis (A), células en las que se distinguen vacuolas con material fagocitado (B) y (C).



Figura 44. Imágenes al microscopio (100x) con tinción Giemsa-Wright. Se aprecian los cambios morfológicos de PMN humanos ante la estimulación con sonicatedo de *H. pylori*.

6. Modulación inmune de BF sobre los perfiles de linfocitos T

6.1. Análisis de biopsias gástricas humanas

Debido a que no se logró comprobar la infección de *H. pylori* en los ensayos realizados utilizando ratones Balb/c, se procedió posteriormente a identificar la infección y monitoreo de biopelícula en biopsias gástricas humanas. A partir de 37 pacientes con diferentes patologías gástricas (Figura 44) se detectó la presencia del gen *ureC* mediante un producto de PCR de 204 pb, en 18 pacientes, estas muestras fueron consideradas positivas a la infección de *Helicobacter pylori* (Hp+).

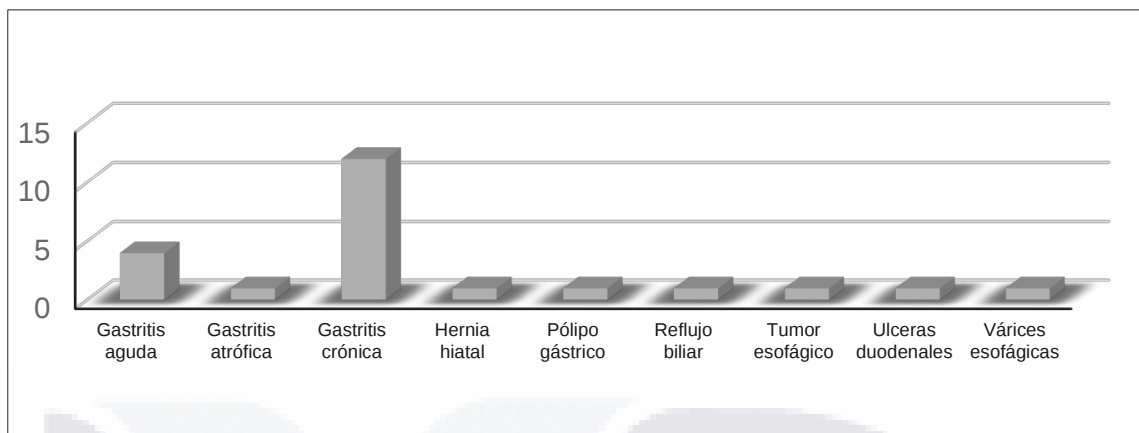


Figura 45. Patologías gástricas de 18 pacientes en los que se detectó la presencia de *H. pylori*. Destaca principalmente gastritis crónica en frecuencia.

Considerando únicamente los 18 pacientes *H. pylori* positivos evaluados por el gen *ureC* de *H. pylori* se realizó el análisis de expresión por PCR en tiempo real para determinar el nivel de expresión del gen *luxS* para cada uno de los pacientes. En este análisis de PCR en tiempo real se encontraron valores de Ct (Ciclo Threshold) de entre 29.4 hasta 48.5. Dado que la baja expresión de *luxS* se relaciona con la presencia de BF, se organizaron los pacientes Hp+ en 2 grupos, *luxS*-/+ (baja expresión de *luxS* ($35 \leq Ct$) ($n=7$) y *luxS*+/+ (alta expresión de *luxS* ($Ct < 35$) ($n=11$)). Representando estos grupos de pacientes el nivel de asociación a la presencia de BF o bacteria planctónica en la mucosa gástrica analizada. En la Figura 45 se muestra el género y edad en relación a la expresión de *luxS* para los pacientes positivos.

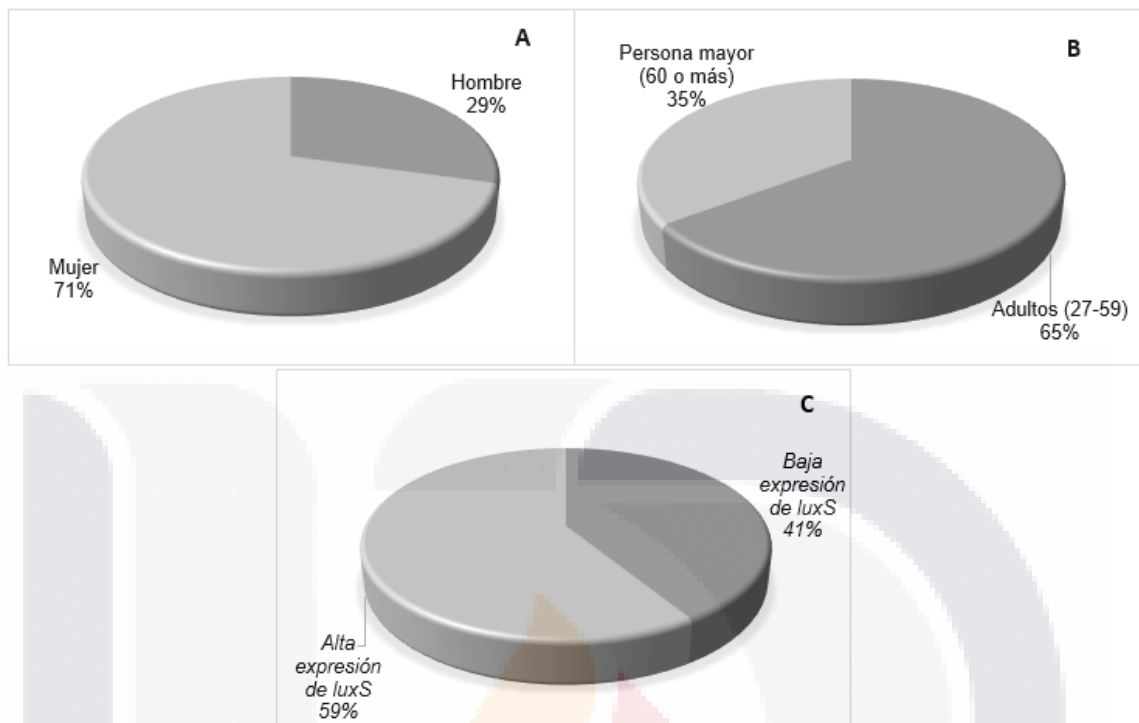


Figura 46. Estadísticas generales de los pacientes positivos a la presencia de *H. pylori*. **A.** Género. **B.** Edad y **C.** Baja expresión +/- (presencia de BF) y alta expresión +/+ (no presencia de BF) del gen *luxS*.

6.2. Expresión relativa de genes transcripcionales asociados a la presencia de *H. pylori*

Posteriormente, considerando los grupos formados en base a la expresión de *luxS*, se desarrolló el análisis de PCR en tiempo real para los factores transcripcionales correspondientes a cada perfil de linfocito T (Tbet, GATA3, FoxP3 y ROR- γ t) y del gen constitutivo GAPDH. Encontrando que los mayores incrementos de expresión relativa se presentaron en el grupo *luxS* -/+ para el gen ROR- γ t (relacionado con el desarrollo y función de las células th17) con una expresión 42 veces mayor con respecto al grupo *luxS* +/+ (bacteria planctónica) y para el gen FoxP3 (asociado a un perfil supresor) con un incremento de 4.9 veces en relación a este mismo grupo. Si bien en los perfiles de los genes T-bet y GATA3 la diferencia entre el grupo de pacientes de baja y alta expresión de *luxS* es significativa estadísticamente, en estos se observó solo un ligero descenso de expresión en el grupo *luxS* -/+ (0.5 y 0.13 veces respectivamente) (Figura 47).

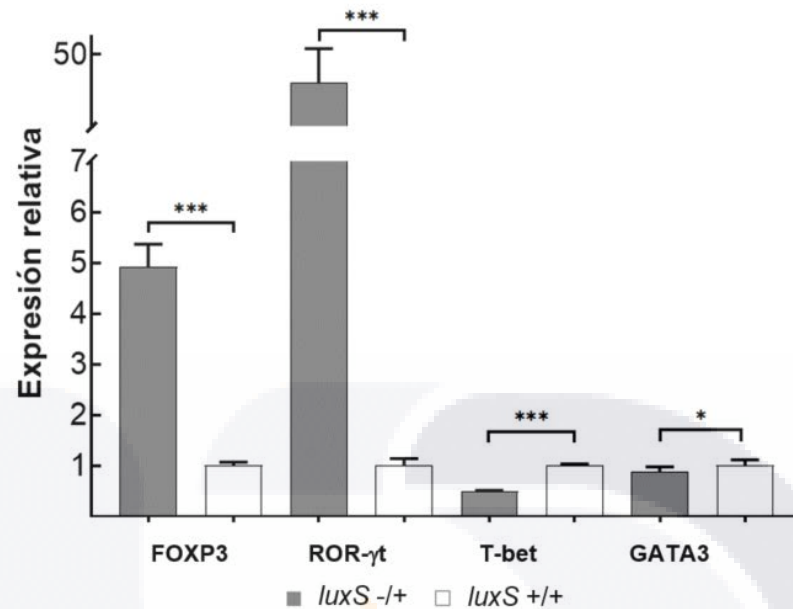


Figura 47. Expresión relativa para FOXP3, ROR- γ t, Tbet y GATA3 respecto a los pacientes con baja expresión de *luxS* (-/+). Se realizaron pruebas t de Student con respecto al grupo control (*luxS* +/+) ($P \leq 0.05^*$, $P \leq 0.01^{**}$ y $P \leq 0.001^{***}$).

6.3. Coeficiente de Spearman en perfiles transcripcionales

Una vez realizado la PCR cuantitativa para los 4 perfiles transcripcionales en los pacientes con *luxS* -/+ (presencia de BF) con *luxS* +/+ como control en estudio, se estableció la correlación de Spearman (ρ) que en este caso nos evalúa el nivel de asociación que tiene la expresión de los distintos genes analizados con respecto a ambos grupos de pacientes. Se encontró una alta correlación de la expresión del factor transcripcional *Tbet* así como una expresión media en el grupo de pacientes de alta expresión. A su vez, en el grupo de pacientes de baja expresión de *luxS* (presencia de BF), se encontró una alta correlación para el gen FoxP3 (Tabla 5 y Figura 48).

Tabla 5. Valores de correlación de Spearman (ρ) para los perfiles transcripcionales asociados a la presencia de *H. pylori* con base en la baja y alta expresión del gen asociado a BF.

	<i>luxS</i> (+/+)	valor $p < 0.05$	<i>luxS</i> (-/+)	valor $p < 0.05$
<i>16sHP</i>	0.400	0.286	0.393	0.383
<i>FoxP3</i>	0.576	0.082	0.929	0.003
<i>RORγT</i>	0.333	0.347	0.214	0.645
<i>TBET</i>	0.903	0.000	0.286	0.535
<i>GATA3</i>	-0.309	0.385	-0.107	0.819

Correlación |0.9-1.0| muy alta, |0.7-0.9| positiva, |0.5-0.7| moderada y |0.3 a 0.5| baja correlación.

Estos valores indica que la presencia de BP pudiera estar relacionada con la inducción de un perfil regulador (0.929 para *Foxp3* en el grupo *luxS* -/+). Por otro lado, el grupo *luxS*+/+ presenta una muy alta correlación (0.905) con el perfil transcripcional *Tbet* (formas planctónicas podrían estimular el desarrollo de perfil Th1). Los niveles de expresión de *ROR- γ t* y *GATA3* presenta correlaciones bajas en el grupo *luxS*+/+ (0.333 y -0.309 respectivamente) indicándonos que las formas planctónicas pudieran relacionarse más con perfiles Th17 y baja respuesta humoral.

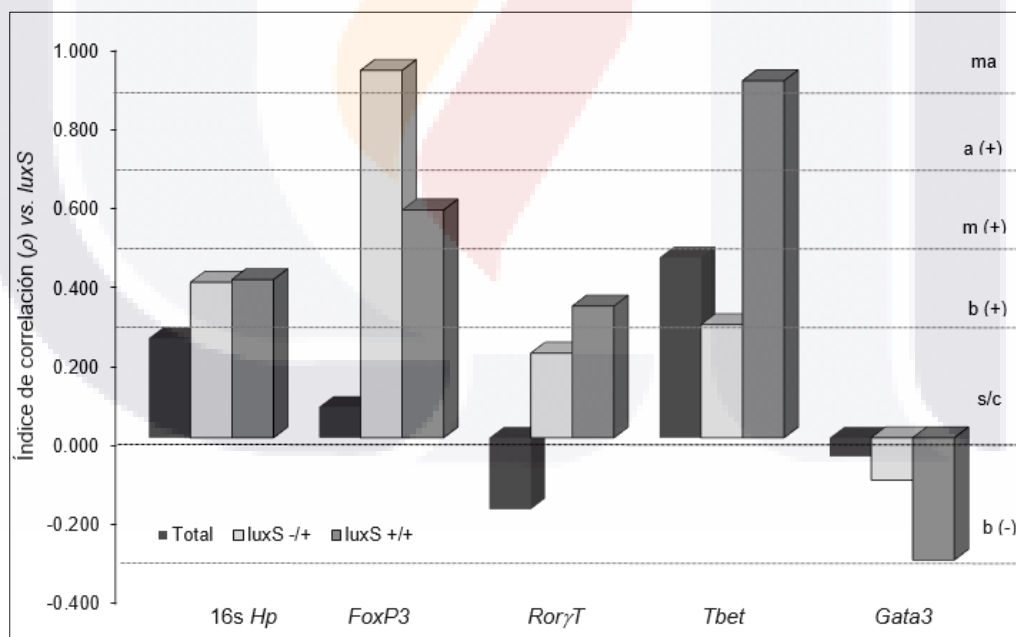


Figura 48. Análisis de correlación bivariada de Spearman de los distintos factores transcripcionales y el nivel de expresión de gen 16s ribosomal de *H. pylori* (16sHP) considerando el total de pacientes ($n=18$) y la separación de los grupos *luxS*-/+ ($n=11$) y *luxS*+/+ ($n=7$). Se grafica el valor de correlación de Spearman (ρ) del nivel de expresión de cada factor transcripcional en relación al nivel de expresión del gen *luxS*. Se indica los rangos de correlación Spearman: muy alta correlación positiva, ma(+); alta correlación positiva, a(+), moderada correlación positiva, m(+), baja correlación positiva o negativa, b(+) ó (-); Sin correlación (s/c).

VIII. DISCUSIÓN

Se realizaron las pruebas bioquímicas para caracterizar a *Helicobacter pylori* que es una bacteria que desarrolla ureasa, una enzima que convierte a la urea en amoníaco, esta enzima neutraliza la acidez del estómago y le permite sobrevivir a la bacteria. Por otro lado, la enzima catalasa, conduce a la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno protegiéndose del ambiente tóxico de esta molécula. En la caracterización de la cepa de trabajo se encontraron diferentes morfologías que adopta la bacteria, se tiene referencia que en cultivos se pueden distinguir tanto formas espirales como cocos y otras formas que son degenerativas (Krzyżek y Grande, 2020).

La cepa de trabajo es *cagA* + y la citotoxina VacA está presente en la forma s2. El desarrollo de la enfermedad causada por *H. pylori* está íntimamente relacionado con el genotipo de la bacteria, y uno de los principales factores determinantes está presente en los genes de virulencia del microorganismo. Se destaca *cagA*, debido a que se ha encontrado que facilita la proliferación de células cancerígenas (Guzman y Pazos, 2023).

La cepa de *H. pylori* mostró capacidad de desarrollar BF *in vitro* tanto en soporte de poliestireno como en vidrio. De acuerdo con Krzyżek et al. (2020), desde 1999, el conocimiento sobre este tema se ha ampliado significativamente, y la presencia de BFs de *H. pylori* ha sido demostrada en estudios utilizando superficies de plástico o vidrio, cultivos celulares, biopsias gástricas de animales o humanos, e incluso superficies vegetales o agua.

Los medios líquidos comunes para *H. pylori* comienzan con una base compleja, como caldo Brucella, caldo de infusión de cerebro y corazón (BHI) o medio Ham's F-12, que luego se complementan con suero y fuentes de carbono adicionales (Hathroubi et al., 2018). En ensayos iniciales se utilizó ICC como medio para el desarrollo de BF, sin embargo, la bacteria mostró un bajo desarrollo de esta al compararse posteriormente con BB, que resultó un medio de cultivo más adecuado no solo para la proliferación de la bacteria sino para el desarrollo de BF.

Además, Krzyżek et al. (2020) afirman que en experimentos de laboratorio se ha mostrado que el bajo contenido de suero (2%) y el cultivo de tres días es óptimo para el crecimiento máximo de biopelículas de *H. pylori*. En nuestros experimentos realizados se encontró que, la ausencia de FCS, permite un mayor desarrollo de BF con respecto a los medios adicionados con este suero y otros suplementos. Por otro lado, el uso de ASB en las mismas concentraciones que FCS, tuvo un efecto similar, indicando que existen componentes proteicos que favorecen el crecimiento de la bacteria, pero impiden su adhesión y por tanto, la formación de BF.

El mejor tiempo para el desarrollo de BF se encontró a los 5 días de incubación ya que se obtuvo la mayor cantidad de BF sin desarrollar contaminación por otros microorganismos. Respecto a los complementos adicionados al medio, la presencia de componentes como β -ciclodextrina y glucosa, permiten un crecimiento mayor de la bacteria, y además una mayor generación de BF. Esto coincide con lo reportado por autores como Waldrop et al. (2014), que indican que el aporte de carbohidratos tales como la glucosa, incrementa la producción de EPS.

El mejor crecimiento de BF con la ausencia de FCS en el medio, coincide con lo expuesto por Hathroubi y colaboradores (2018), ya que el suero se usa comúnmente para complementar los medios líquidos de *H. pylori* y así promover el crecimiento planctónico, pareciera que el uso de medios ricos y complejos para el crecimiento de biopelículas *in vitro* no reflejan necesariamente el entorno natural que *H. pylori* encuentra *in vivo* lo que probablemente impida la activación metabólica hacia el desarrollo de la BF que constituye una forma de protección a la bacteria.

Por otro lado, en los experimentos de modelo de infección de ratones con *H. pylori* no se logró evidenciar la presencia de la bacteria en las muestras de tejido gástrico extraído, una explicación puede ser la baja concentración de inóculo administrado. Ya que aunque en algunos ratones si se detectó la banda característica por electroforesis para el gen *ureC* de identificación de la bacteria, no se logró encontrar en todas las muestras.

Es importante además lograr para futuros experimentos del modelo murino de infección, un ambiente y alimentación que impidan la contaminación con otros agentes infecciosos para

asegurar la infección por *H. pylori*, y así evitar la aparición de bandas por PCR atribuibles a otras especies relacionadas.

Además, aunque en la siembra del macerado de tejido se presentó enmascaramiento con otras colonias de características diferentes a *H. pylori*. Si la bacteria se encontraba en el macerado, es probable que no haya podido ser identificada debido al crecimiento simultáneo de otras bacterias.

En la detección e identificación molecular de la infección, se pueden utilizar además del gen *ureC*, otros como *16S* y *ureA*. En el caso de las muestras de tejido gástrico, el fragmento del gen *ureA* fue el que mostró mayor consistencia en la identificación debido a que no se presentaron bandas en tejidos de ratones no infectados. Por lo que detección de la presencia de este gen podría constituir una prueba fiable además de *ureC*, en próximos experimentos en nuestro laboratorio con esta cepa de trabajo.

Los genes probados de acuerdo con lo reportado por Lucio-Sauceda et al. (2019) como relacionados a BF, se expresaron de forma diferencial en BF y bacteria planctónica. Se obtuvieron bandas en el gel de agarosa que corresponden a los genes que se están expresando activamente en el estadio planctónico y con menor intensidad cuando la bacteria desarrolla BF. Es decir, existe una mayor expresión de los genes que se han relacionado a la formación de BF, cuando un cultivo se encuentra en estado planctónico y no cuando la bacteria se encuentra en forma de BF. Se consideró, además, durante la obtención de cDNA, la digestión de DNA del genoma de la bacteria para identificar únicamente productos de amplificación provenientes de la expresión génica, que permitiría ver la expresión de estos genes tanto en BF como en bacteria planctónica.

Asimismo, se consideró evaluar la expresión de los genes a 30 y a 40 ciclos de PCR. En 40 ciclos se aseguraba una cantidad de copias total con el agotamiento de los reactivos o moléculas añadidas en la reacción. Y a 30 ciclos se alcanzaría el equilibrio en la fase logarítmica en cuanto al número de copias amplificadas en la reacción.

Los genes probados disminuyeron su expresión en el estadio de BF, pero de manera más acentuada los genes *luxS* y *lpxD* mostraron un mayor contraste en la intensidades de banda

en las dos formas planctónica o de BF. Al comparar esta diferencia de intensidad en las bandas, se seleccionó como referencia el gen *luxS* ya que tanto a 30 como a 40 ciclos la diferencia seguía siendo marcada, no siendo así para *lpxD*. De acuerdo con Krzyżek et al. (2020), hay una posible relación inversa entre la producción de *luxS* y la transición a la fase de biopelícula. Los genes *luxS* y *lpxD* constituyen indicadores de los cambios metabólicos de la bacteria cuando se encuentra en forma de BF o en su estado planctónico.

En la detección del factor nuclear NF- κ B se buscó establecer si existe una expresión diferencial con respecto a la estimulación de los componentes celulares de *H. pylori* vs. los componentes moleculares presentes en la BF de esta bacteria y que estos últimos fueran más atribuibles a los componentes no bacterianos (como EPS, eDNA, etc.). La presencia de la fracción proteica IKB α reportada como un índice en relación a la proteína constitutiva β -actina, se incrementó conforme la cantidad de sonificado de bacteria fue agregada. De acuerdo a Teng y colaboradores (2013), *H. pylori* regula la activación de NF- κ B y la expresión de los genes relacionados con la inflamación, aunque no existen estudios en los que se determine si la fase en la que se encuentre la bacteria pudiera estar influyendo en una mayor o menor regulación del factor transcripcional NF- κ B. Además, en el caso del sonificado de BF, la presencia de IKB α en la mayor concentración utilizada (30 μ g), disminuyó respecto al resto de los tratamientos, incluyendo el blanco de leucocitos sin estimular. Este resultado pudiera explicarse debido a un efecto inhibitorio de enmascaramiento por parte de los componentes la BF, aunque se requieren de repeticiones a dicho ensayo para confirmar el resultado. Además, se debe contemplar una estandarización más exhaustiva de la técnica con variables que incrementen su sensibilidad.

Por otro lado, con el proceso de sonicación se buscó recrear procesos de descomposición-fragmentación de los patógenos, que se llevan a cabo en la respuesta inmune innata y a su vez inducen diferentes tipos de respuesta que involucran procesos desde inflamatorios hasta de modulación. Los componentes bacterianos difieren de los que se encuentran en la BF y dicha composición podría dar lugar a una respuesta diferencial en el sistema inmune, especialmente si se logran obtener estos disgregados de la BF con la menor cantidad de bacterias. Se han caracterizado con anterioridad, los elementos que conforman la BF en *H. pylori* y se ha encontrado que pueden encontrarse monosacáridos como fucosa,

galactosa, glucosa y otros (Fauzia et al., 2024). Sin embargo, resulta importante caracterizar en estudios futuros, tanto los constituyentes químicos como el tamaño de partícula de los sonicados de la bacteria y de la BF.

En los resultados se encontró una disminución de las UFCs, conforme se incrementaba la cantidad de sonication tanto de bacteria como de BF. Y con respecto al proceso de fagocitosis, se encontró de igual forma un decremento, al aumentar la cantidad de sonication (de ambos tipos). Esto puede ser debido a que en el sonication de BF de *H. pylori*, se encuentran componentes que podrían alterar la capacidad fagocítica de los neutrófilos. Aunque existen aspectos que podrían incluirse en futuros experimentos como el empleo de material inerte como testigo que permita descartar un efecto de saturación de las células (neutrófilos) y no tanto de una modulación inmune de los compuestos que la bacteria produzca. Se han realizado con anterioridad experimentos de fagocitosis con *H. pylori* y PMN (Ramaro et al., 2000 y Thai et al., 2023), sin embargo en este estudio se introdujeron dos variables que resultaron innovadoras, como fue el uso de material obtenido por sonication tanto de la bacteria planctónica como de la BF para evaluar el efecto de estos sobre la respuesta fagocítica sobre otras bacterias, que en este caso fue *S. aureus*.

Finalmente, en el estudio de perfiles transcripcionales relacionados a la infección con *H. pylori*, se estableció en primer lugar, una expresión relativa de estos factores entre el grupo de alta expresión de *luxS* (+/+) y que se asoció con la presencia de la infección pero en una forma planctónica y el de baja expresión de este mismo gen, pero relacionado con la presencia de BF. Los perfiles FoxP3 y ROR- γ t presentaron una notable diferencia en expresión relativa entre los dos grupos mencionados. El primer factor (Foxp3) asociado a la proliferación de células T reguladoras y el segundo (ROR- γ t) relacionado al desarrollo de células con perfil th17 (proinflamación con la participación de neutrófilos). Estos dos perfiles transcripcionales presentaron para estos resultados, una mayor expresión en el grupo de pacientes con baja expresión de *luxS*, que apoyaría el fundamento que la persistencia de la infección por *H. pylori* se debe a mecanismos de evasión de la respuesta inmune por parte de la bacteria en su forma de BF. Y, por otro lado, en los valores de correlación de Spearman (ρ) la alta correlación de Tbet en el grupo de alta expresión de *luxS* +/+ (asociada a la forma planctónica y no presencia de BF), explicaría la activación de perfiles celulares Th1 relacionados con virus y bacterias intracelulares y, nuevamente una alta correlación

para FoxP3 en el grupo de baja expresión de *luxS* -/+, confirmaría lo encontrado para el mismo perfil en el valor de expresión relativa.

IX. CONCLUSIONES

Helicobacter pylori es una bacteria asociada a patologías gástricas que presenta una alta prevalencia a nivel mundial. Dicha prevalencia puede estar dada al emplear mecanismos de infección que le permiten evadir eficientemente el sistema inmunológico del hospedero. A su vez, la evasión del sistema inmunológico puede deberse a la capacidad de esta bacteria de formar biopelículas (BF).

Helicobacter pylori desarrolla biopelículas *in vitro* en soportes de poliestireno (placa de cultivo ELISA) como en borosilicato (cubreobjetos). Esta bacteria puede desarrollar BF en caldo de infusión cerebro-corazón así como en caldo Brucella. Sin embargo, el uso de caldo Brucella como medio de crecimiento, suplementado con glucosa, antibiótico de selección para *H. pylori*, y β -ciclodextrina como fuente de energía constituye una de las mejores condiciones para la formación de BFs por esta bacteria. Y el tiempo adecuado para su formación es alrededor de 120 h.

Se ha encontrado que las mejores condiciones de crecimiento de la bacteria planctónica no son necesariamente las mejores condiciones para desarrollo de BF. El uso de β -ciclodextrina favorece la formación de BF, pero al suplementar el medio de cultivo con suero como el de ternera fetal, se promueve una mayor proliferación de la bacteria planctónica pero no el desarrollo de BF.

La bacteria activa la expresión de algunos genes y modula o disminuye la expresión de otros para su supervivencia. De esta forma, se encontró que, de una manera más notoria con respecto a otros genes, los genes identificados como *luxS* y *lpxD* pueden constituir una herramienta eficaz para distinguir si la bacteria se encuentra en estado planctónico o bien como BF. Ya que se expresan diferencialmente en un estadio u otro al efectuarse cambios metabólicos para desarrollar BF.

Por otro lado, el proceso de fagocitosis, la intensidad de la activación del factor transcripcional NF- κ B, y el efecto bactericida de las células fagocíticas, pudiera verse afectado por la presencia de componentes de la BF que, de forma diferencial a los componentes de la bacteria en estado planctónico, permitirían una regulación de la respuesta inmune que permitiera a *H. pylori* la persistencia de su infección.

De esta forma, al realizar ensayos *in vitro* con partículas sonicadas de bacteria y BF, se pudo observar si existe una respuesta inmune distinta entre partículas bacterianas y componentes de la BF aunque deben realizarse más estudios posteriores que confirmen dichos hallazgos.

Finalmente, al relacionar el desarrollo de BF (por medio del gen *luxS* de *H. pylori*) en biopsias gástricas humanas, con la expresión de factores transcripcionales (ROR γ t, GATA3, Tbet y FoxP3) relacionados a esta infección, se puede afirmar que existe una mayor expresión relativa del factor transcripcional FoxP3 (relacionado al desarrollo de las células T reguladoras) en los pacientes con baja expresión de *luxS* (presencia de BF).

La biopelícula de *H. pylori* induce una respuesta reguladora del sistema inmune lo que permite que la infección persista y por ello se deben desarrollar terapias más efectivas para su erradicación.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, T., Baquero, M., Domingo, D., López-Brea, M y Royo, G. 2004. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Procedimientos en Microbiología Clínica. ISBN: 84-609-392-0
- Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MK, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. J Biol Chem. 1995 Jul 28;270(30):17771-7. doi: 10.1074/jbc.270.30.17771. PMID: 7629077.
- Bagheri N, Salimzadeh L, Shirzad H. The role of T helper 1-cell response in *Helicobacter pylori*-infection. Microb Pathog. 2018 Oct;123:1-8. doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.033. Epub 2018 Jun 21. PMID: 29936093.
- Bakhti SZ, Latifi-Navid S, Safaralizadeh R. *Helicobacter pylori*-related risk predictors of gastric cancer: The latest models, challenges, and future prospects. Cancer Med. 2020 Jul;9(13):4808-4822. doi: 10.1002/cam4.3068. Epub 2020 May 4. PMID: 32363738; PMCID: PMC7333836.
- Balanzá, Ricardo, Somerville, Nicole, Rojas-Mendoza, Fernando, & Aguilar-Olivos, Nancy E.. (2020). Características endoscópicas del linfoma gástrico primario. Endoscopia, 32(1), 7-13. Epub 04 de octubre de 2021.<https://doi.org/10.24875/end.20000013>
- Borlace, G. N., Jones, H. F., Keep, S. J., Butler, R. N., & Brooks, D. A. (2011). *Helicobacter pylori* phagosome maturation in primary human macrophages. Gut pathogens, 3(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-3-3>
- Borka Balas R, Meliț LE, Mărginean CO. Worldwide Prevalence and Risk Factors of *Helicobacter pylori* Infection in Children. Children (Basel). 2022 Sep 6;9(9):1359. doi: 10.3390/children9091359. PMID: 36138669; PMCID: PMC9498111.
- Brasil-Costa, I.; Souza, C.d.O.; Monteiro, L.C.R.; Santos, M.E.S.; Oliveira, E.H.C.D.; Burbano, R.M.R. *H. pylori* Infection and Virulence Factors cagA and vacA (s and m Regions) in Gastric Adenocarcinoma from Pará State, Brazil. Pathogens 2022, 11, 414. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040414>
- Cava, F., Cobas, G. 2003. Dos décadas de *Helicobacter pylori*. VacciMonitor, 12(1): 10. Recuperado en 20 de marzo de 2021, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2003000100001&lng=es&tlng=es
- Cheng-Yen Kao, Bor-Shyang Sheu, Jiunn-Jong Wu, *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis, Biomedical Journal, Volume 39, Issue 1, 2016, Pages 14-23, ISSN 2319-4170, <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>.

- Cole SP, Harwood J, Lee R, She R, Guiney DG. Characterization of monospecies biofilm formation by *Helicobacter pylori*. J Bacteriol. 2004; 186(10):3124–32. doi: 10.1128/jb.186.10.3124-3132.2004. PMID: 15126474; PMCID: PMC400600.
- Costerton, J.W.; Chen, G.; Gersey, T.I.; Ladd, J.G.; Nickel, M. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 41:435-64
- Daw K, Baghdayan AS, Awasthi S, Shankar N. Biofilm and planktonic *Enterococcus faecalis* elicit different responses from host phagocytes in vitro. FEMS Immunol Med Microbiol. 2012 Jul;65(2):270-82. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00944.x. Epub 2012 Mar 8. PMID: 22333034; PMCID: PMC3366019.
- Dewayani A, Fauzia KA, Alfaray RI, Waskito LA, Doohan D, Rezkitha YAA, Abdurachman A, Kobayashi T, I'tishom R, Yamaoka Y, Miftahussurur M. The Roles of IL-17, IL-21, and IL-23 in the *Helicobacter pylori* Infection and Gastrointestinal Inflammation: A Review. Toxins (Basel). 2021 Apr 28;13(5):315. doi: 10.3390/toxins13050315. PMID: 33924897; PMCID: PMC8147029.
- Deng Y, Yang Q, Yang Y, Li Y, Peng H, Wu S, Zhang S, Yao B, Li S, Gao Y, Li X, Li L, Deng Y. Conditional knockout of *Tsc1* in ROR γ t-expressing cells induces brain damage and early death in mice. J Neuroinflammation. 2021 May 6;18(1):107. doi: 10.1186/s12974-021-02153-8. PMID: 33957945; PMCID: PMC8101034.
- Díaz C. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. 2011.
- Díaz-Caballero, A., Vivas, R., Puerta, L., Ahumado, M., Arévalo, L., Cabrales, R y Herrera, A. Biopelículas como expresión del mecanismo de *quorum sensing*: Una revisión. Av Periodon Implantol. 2011; 23, 3: 195-201. Recuperado en 21 de marzo de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852011000300005&lng=es&tlng=es.
- Díaz Martín, D., Úbeda Cantera, M., López Suárez, A., y Álvarez de Mon Soto, M. Respuesta inmune innata y sus implicaciones fisiopatológicas, Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, Volume 12, Issue 24, 2017, Pages 1388-1397, ISSN 0304-5412, <https://doi.org/10.1016/j.med.2016.12.009>.
- Fauzia, KA, Effendi, WI, Alfaray, RI, Malaty, HM, Yamaoka, Y. y Mifhussurur, M. (2024). Mecanismos moleculares de formación de biopelículas en *Helicobacter pylori* . Antibióticos , 13 (10), 976. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13100976>
- Ferreira, P. y Terramoto, S. 2002. Linfoma Malt gástrico: Revisión. Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina - N° 119 – Septiembre 2002
- Gaddy JA, Radin JN, Cullen TW, Chazin WJ, Skaar EP, Trent MS, Algood HMS. 2015. *Helicobacter pylori* resists the antimicrobial activity of calprotectin via lipid A modification and associated biofilm formation. mBio 6:e01349 –15. doi: 10.1128/mBio.01349-15. PMID: 26646009; PMCID: PMC4669380.

- Garhart C A, J. G. Nedrud, F. P. Heinzl, N. E. Sigmund, and S. J. Czinn, "Vaccine-induced protection against *Helicobacter pylori* in mice lacking both antibodies and interleukin-4," *Infection and Immunity* (2003), vol. 71, no. 6, pp. 3628–3633.
- Garrido-Treviño LF, López-Martínez M, Flores-Hinojosa JA, Tijerina-Rodríguez L, Bosques-Padilla F. Empiric treatment vs susceptibility-guided treatment for eradicating *H. pylori*: Is it possible to change that paradigm using modern molecular methods? *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*. 2022 Jul-Sep;87(3):330-341. doi: 10.1016/j.rgmxen.2022.06.003. Epub 2022 Jun 28. PMID: 35778343.
- Gil, Marielsa. (20 de noviembre de 2018). *Helicobacter pylori*: características, morfología, hábitat. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/helicobacter-pylori/>.
- Gomez, J., Gómez-Lus, M., Bas, P., Ramos, C., Cafini, F., Maestre, J., & Prieto, J. 2013. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Esp Quimioter*, 26(2) 97-102.
- Gong Y, Tao L, Jing L, Liu D, Hu S, Liu W, Zhou N, Xie Y. Association of TLR4 and Treg in *Helicobacter pylori* Colonization and Inflammation in Mice. *PLoS One*. 2016 Feb 22;11(2):e0149629. doi: 10.1371/journal.pone.0149629. PMID: 26901645; PMCID: PMC4762684.
- Guilhen C, Miquel S, Charbonnel N, Joseph L, Carrier G, Forestier C, Balestrino D Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *NPJ Biofilms Microbiomes* (2019) 24;5(1):25. doi: 10.1038/s41522-019-0098-1.
- Guzmán, K. A., & Pazos, A. (2023). *Helicobacter pylori*: Microorganismo patógeno o mutualista en poblaciones colombianas. *Universidad Y Salud*, 25(1), A1-A6. <https://doi.org/10.22267/rus.232501.292>
- Espinoza-Contreras J, Idalia Torres-Ruiz M, Ariel Waller-González L, De Jesús Ramírez-García J, Torres-López J, Ventura-Juárez J, Verónica Moreno-Córdova E, Ernesto López-Ramos J, Humberto Muñoz-Ortega M, Eugenia Vargas-Camaño M, González-Segovia R. Immunological markers and *Helicobacter pylori* in patients with stomach cancer: Expression and correlation. *Biomed Rep*. 2020 May;12(5):233-243. doi: 10.3892/br.2020.1285. Epub 2020 Mar 4. PMID: 32257186; PMCID: PMC7100142.
- Hanafiah A, Razak SA, Neoh HM, Zin NM, Lopes BS. The heterogeneous distribution of *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island reflects different pathologies in multiracial Malaysian population. *Braz J Infect Dis*. 2020 Nov-Dec;24(6):545-551. doi: 10.1016/j.bjid.2020.10.005. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33157035; PMCID: PMC9392095.
- Hathroubi, S., Hu, S. y Ottemann, K. 2020. Genetic requirements and transcriptomics of *Helicobacter pylori* biofilm formation on abiotic and biotic surfaces. *npj Biofilms and Microbiomes* (2020) 6:56 <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00167-3>
- Hathroubi, S., Servetas, S. L., Windham, I., Merrell, D. S., & Ottemann, K. M. (2018). *Helicobacter pylori* Biofilm Formation and Its Potential Role in Pathogenesis.

- Microbiology and molecular biology reviews: MMBR, 82(2), e00001-18.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-18>
- Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, Malfertheiner P, Graham DY, Wong VWS, Wu JCY, Chan FKL, Sung JJY, Kaplan GG, Ng SC. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017 Aug;153(2):420-429. doi: 10.1053/j.gastro.2017.04.022. Epub 2017 Apr 27. PMID: 28456631.
- Hou C, Yin F, Wang S, Zhao A, Li Y, Liu Y. *Helicobacter pylori* Biofilm-Related Drug Resistance and New Developments in Its Anti-Biofilm Agents. *Infect Drug Resist*. 2022 Apr 5;15:1561-1571. doi: 10.2147/IDR.S357473. PMID: 35411160; PMCID: PMC8994595.
- Hussein NR, Argent RH, Marx CK, Patel SR, Robinson K, Atherton JC. *Helicobacter pylori* dupA is polymorphic, and its active form induces proinflammatory cytokine secretion by mononuclear cells. *J Infect Dis*. 2010 Jul 15;202(2):261-9. doi: 10.1086/653587. PMID: 20533870.
- Idowu, A., Mzukwa, A., Harrison, U. et al. Detection of *Helicobacter pylori* and its virulence genes (cagA, dupA, and vacA) among patients with gastroduodenal diseases in Chris Hani Baragwanath Academic Hospital, South Africa. *BMC Gastroenterol* 19, 73 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12876-019-0986-0>
- Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121-33. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.035. PMID: 16990136.
- Jesaitis A, Franklin M J, Berglund D, Sasaki M, Lord C, Bleazard J B, Duffy J E, Beyenal H, Lewandowski Z, Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *J Immunol* (2003); 171(8):4329-39. doi: 10.4049/jimmunol.171.8.4329.
- Kalali, B., Mejías-Luque, R., Javaheri, A., & Gerhard, M. 2014. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Mediators of inflammation*, 2014, 426309. <https://doi.org/10.1155/2014/426309>
- Karkhah A, Ebrahimpour S, Rostamtabar M, Koppolu V, Darvish S, Vasigala VKR, Validi M, Nouri HR. *Helicobacter pylori* evasion strategies of the host innate and adaptive immune responses to survive and develop gastrointestinal diseases. *Microbiol Res*. 2019 Jan;218:49-57. doi: 10.1016/j.micres.2018.09.011. Epub 2018 Oct 6. PMID: 30454658.
- Kimmel B, Bosserhoff A, Frank R, Gross R, Goebel W, Beier D. Identification of immunodominant antigens from *Helicobacter pylori* and evaluation of their reactivities with sera from patients with different gastroduodenal pathologies. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):915-20. doi: 10.1128/IAI.68.2.915-920.2000. PMID: 10639463; PMCID: PMC97222.

- Krzyżek P, Grande R. Transformation of *Helicobacter pylori* into Coccoid Forms as a Challenge for Research Determining Activity of Antimicrobial Substances. *Pathogens*. 2020; 9(3):184. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030184>
- Krzyżek, P., Grande, R., Migdał, P., Paluch, E. y Gościński, G. 2020. Biofilm Formation as a Complex Result of Virulence and Adaptive Responses of *Helicobacter pylori*. *Pathogens*. 2020 Dec 18;9(12):1062. doi: 10.3390/pathogens9121062. PMID: 33353223; PMCID: PMC7766044.
- Kuipers EJ, Uytterlinde AM, Peña AS, Roosendaal R, Pals G, Nelis GF, Festen HP, Meuwissen SG. Long-term sequelae of *Helicobacter pylori* gastritis. *Lancet*. 1995 Jun 17;345(8964):1525-8. doi: 10.1016/s0140-6736(95)91084-0. PMID: 7791437.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical microbiology reviews*, 19(3), 449–490. <https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05>
- Ladrón-de-Guevara L, Bornstein-Quevedo L, González-Huezo S, Castañeda-Romero B, Costa FG, di Silvio-López M. *Helicobacter pylori* eradication in Mexico with a levofloxacin-based scheme versus standard triple therapy: Results from an open-label, randomized, noninferiority phase iiib trial. *Rev Gastroenterol Mex (Engl Ed)*. 2019 Jul-Sep;84(3):274-283. English, Spanish. doi: 10.1016/j.rgmx.2018.04.005. Epub 2018 Jul 27. PMID: 30060902.
- Lebeaux, D.; Ghigo, J.-M.; Beloin, C. 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2014, 78, 510–543. doi: 10.1128/MMBR.00013-14. PMID: 25184564; PMCID: PMC4187679.
- Lewis, N. D., Asim, M., Barry, D. P., de Sablet, T., Singh, K., Piazzuelo, M. B., Gobert, A. P., Chaturvedi, R., & Wilson, K. T. (2011). Immune evasion by *Helicobacter pylori* is mediated by induction of macrophage arginase II. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 186(6), 3632–3641. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003431>
- Li H, Liao T, Debowski AW, Tang H, Nilsson HO, Stubbs KA, Marshall BJ, Benghezal M. Lipopolysaccharide Structure and Biosynthesis in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2016 Dec;21(6):445-461. doi: 10.1111/hel.12301. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26934862.
- Li Liang, Zhong Zhang, Wei Bo, Min Zhang, Xuguang Wang: Association of different genotypes of *Helicobacter pylori* with CDX2 expression in intestinal metaplasia and gastric cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2019;12(9):11666-11674.
- Lina T., Alzahrani S., Gonzalez J., Pinchuk I., Beswick E.J., Reyes V.E. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.* 2014;20:12753–12766. doi: 10.3748/wjg.v20.i36.12753. PMID: 25278676; PMCID: PMC4177461.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

López-Bojorquez, Lucia Nikolaia. (2004). La regulación del factor de transcripción NF- κ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. Revista de investigación clínica, 56(1), 83-92. Recuperado en 28 de abril de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-83762004000100012&lng=es&tlng=es.

Lopez-Brea y Alarcón. 2005. Abordaje de la infección por *Helicobacter pylori*. GH CONTINUADA. MARZO-ABRIL 2005. VOL. 4 N.º 2

Lucio-Sauceda, D. G., Urrutia-Baca, V. H., Gomez-Flores, R., De La Garza-Ramos, M. A., Tamez-Guerra, P., & Orozco-Flores, A. (2019). Antimicrobial and Anti-Biofilm Effect of an Electrolyzed Superoxidized Solution at Neutral-pH against *Helicobacter pylori*. BioMed research international, 2019, 6154867. <https://doi.org/10.1155/2019/6154867>

Mărginean CO, Meliț LE, Săsăran MO. Traditional and Modern Diagnostic Approaches in Diagnosing Pediatric *Helicobacter pylori* Infection. Children (Basel). 2022 Jul 1;9(7):994. doi: 10.3390/children9070994. PMID: 35883980; PMCID: PMC9316053.

Mahdi, BM. (2014). Immune Response to *Helicobacter pylori*. In (Ed.), Trends in *Helicobacter pylori* Infection. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/57480>

Maleki Kakelar, H., Barzegari, A., Dehghani, J. et al. Pathogenicity of *Helicobacter pylori* in cancer development and impacts of vaccination. Gastric Cancer 22, 23–36 (2019). <https://doi.org/10.1007/s10120-018-0867-1>

Marshall, B., y Robin Warren, J. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration, The Lancet, Volume 323, Issue 8390, 1984, Pages 1311-1315, ISSN 0140-6736, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(84\)91816-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(84)91816-6)

Moser C, Jensen PØ, Thomsen K, Kolpen M, Rybtke M, Lauland AS, Trøstrup H, Tolker-Nielsen T. Immune Responses to *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. Front Immunol. 2021 Feb 22;12:625597. doi: 10.3389/fimmu.2021.625597. PMID: 33692800; PMCID: PMC7937708.

Müller, A., Oertli, M., & Arnold, I. C. 2011. H. pylori exploits and manipulates innate and adaptive immune cell signaling pathways to establish persistent infection. Cell communication and signaling: CCS, 9(1), 25. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-25>

Ning-Fei Ji , Yu-chun Xie, Ming-shun Zhang, Xin Zhao, Hui Cheng, Hong Wang, Kai-sheng Yin, Mao Huang. Ligustrazine corrects Th1/Th2 and Treg/Th17 imbalance in a mouse asthma model Int Immunopharmacol 2014; 21(1):76-81. doi: 10.1016/j.intimp.2014.04.015

Nista EC, Pellegrino A, Giuli L, Candelli M, Schepis T, De Lucia SS, Ojetti V, Franceschi F, Gasbarrini A. Clinical Implications of *Helicobacter pylori* Antibiotic Resistance in Italy: A Review of the Literature. Antibiotics. 2022; 11(10):1452. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101452>

- Oleastro, M., & Ménard, A. (2013). The Role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology*, 2(3), 1110-1134. <https://doi.org/10.3390/biology2031110>
- Olivares, D., Gisbert, J. P., & Pajares, J. M.. 2005. Infección por *Helicobacter pylori* y apoptosis de las células epiteliales de la mucosa gástrica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 97(7), 505-520. Recuperado en 21 de marzo de 2021, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082005000700006&lng=es&tlng=es.
- Oliveira AKS, Silva LLL, Miguel MP, Blanco AJV, Carneiro LC, Barbosa MS. *Helicobacter pylori* cagA VIRULENCE GENE AND SEVERE ESOGASTRODUODENAL DISEASES: IS THERE AN ASSOCIATION? *Arq Gastroenterol*. 2021 Oct-Dec;58(4):468-475. doi: 10.1590/S0004-2803.202100000-85. PMID: 34909852.
- Osman EY, El-Eragi AM, Musa AM, El-Magboul SB, A/Rahman MB, Abdo AE. Detection of *Helicobacter pylori* glmM gene in bovine milk using Nested polymerase chain reaction. *Vet World*. 2015 Jul;8(7):913-7. doi: 10.14202/vetworld.2015.913-917. Epub 2015 Jul 26
- O'Toole G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp*. (2011)30; (47):2437. doi: 10.3791/2437.
- Pachathundikandi, S. K., Brandt, S., Madassery, J., & Backert, S. (2011). Induction of TLR-2 and TLR-5 Expression by *Helicobacter pylori* Switches cagPAI-Dependent Signalling Leading to the Secretion of IL-8 and TNF- α . *PLOS ONE*, 6(5), e19614. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019614>
- Parkos CA, Cochrane CG, Schmitt M, Jesaitis AJ. Regulation of the oxidative response of human granulocytes to chemoattractants. No evidence for stimulated traffic of redox enzymes between endo and plasma membranes. *J Biol Chem*. 1985 Jun 10;260(11):6541-7. PMID: 2987226.
- Percival, S. L., & Suleman, L. 2014. Biofilms and *Helicobacter pylori*: Dissemination and persistence within the environment and host. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 5(3), 122–132. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v5.i3.122>
- Pérez Bastán, J., Hernández Ponce, R., & La Rosa Hernández, B. (2021). Infección por *Helicobacter pylori* y factores asociados en adultos con sospecha clínica de úlcera duodenal. *Revista Médica Electrónica*, 43(3), 1-13. Recuperado de <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/4279>
- Pinho AS, Seabra CL, Nunes C, Reis S, L Martins MC, Parreira P. *Helicobacter pylori* biofilms are disrupted by nanostructured lipid carriers: A path to eradication? *J Control Release*. 2022 Aug;348:489-498. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.05.050. Epub 2022 Jun 15. PMID: 35654169.
- Pop R, Tăbăran AF, Ungur AP, Negoescu A, Cătoi C. *Helicobacter Pylori*-Induced Gastric Infections: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Approaches Using Silver Nanoparticles. *Pharmaceutics*. 2022 Jul 14;14(7):1463. doi: 10.3390/pharmaceutics14071463. PMID: 35890358; PMCID: PMC9318142.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Rada B. Interactions between Neutrophils and *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *Pathogens* (2017); 6(1):6.

Ramarao, N., Gray-Owen, S. D., Backert, S., & Meyer, T. F. (2000). *Helicobacter pylori* inhibits phagocytosis by professional phagocytes involving type IV secretion components. *Molecular microbiology*, 37(6), 1389–1404. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02089.x>

Reyes VE, Peniche AG. *Helicobacter pylori* Deregulates T and B Cell Signaling to Trigger Immune Evasion. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2019;421:229-265. doi: 10.1007/978-3-030-15138-6_10. PMID: 31123892; PMCID: PMC7050993.

Rio DC, Ares M Jr, Hannon GJ, Nilsen TW. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. 2010 Jun;2010(6):pdb.prot5439. doi: 10.1101/pdb.prot5439. PMID: 20516177.

Saldinger P F, N. Porta, P. Launois et al., “Immunization of BALB/c mice with *Helicobacter* urease B induces a T helper 2 response absent in *Helicobacter* infection,” *Gastroenterology* (1998), vol. 115, no. 4, pp. 891–897.

Sarduy Bermúdez, Lázaro, & González Díaz, María Elena. (2016). La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica*, 20(3), 167-175.

Soares TF, Rocha GA, Rocha AM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Carvalho AS, Bittencourt P, Oliveira CA, Faria AM, Queiroz DM. Phenotypic study of peripheral blood lymphocytes and humoral immune response in *Helicobacter pylori* infection according to age. *Scand J Immunol*. 2005 Jul;62(1):63-70. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01638.x. PMID: 16091125.

Sokolova, O., Naumann, M. Manifold role of ubiquitin in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Cell. Mol. Life Sci*. 78, 4765–4783 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03816-8>

Stark, R.M.; Gerwig, G.J.; Pitman, R.S.; Potts, L.F.; Williams, N.A.; Greenman, J.; Weinzweig, I.P.; Hirst, T.R.; Millar, M.R. 1999. Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 121–126. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00481.x. PMID: 10063642.

Subhadra, B. Special Issue: Biofilm Composition and Applications. *Coatings* 2022, 12, 1026. <https://doi.org/10.3390/coatings12071026>

Suerbaum, S. & Michetti, P. 2002. *Helicobacter pylori* Infection. *The New England journal of medicine*. 347. 1175-86. 10.1056/NEJMra020542.

Thai, T. D., Chuenchom, C., Donsa, W., Faksri, K., Sripa, B., Edwards, S. W., & Salao, K. (2023). *Helicobacter pylori* extract induces purified neutrophils to produce reactive oxygen species only in the presence of plasma. *Biomedical reports*, 19(6), 89. <https://doi.org/10.3892/br.2023.1671>

Tegtmeyer N, Neddermann M, Lind J, Pachathundikandi SK, Sharafutdinov I, Gutiérrez-Escobar AJ, Brönstrup M, Tegge W, Hong M, Rohde M, Delahay RM, Vieth M, Sticht H, Backert S. Toll-like Receptor 5 Activation by the CagY Repeat Domains of

- Helicobacter pylori*. Cell Rep. 2020 Sep 15;32(11):108159. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108159. PMID: 32937132.
- Teng, G. G., Wang, W. H., Dai, Y., Wang, S. J., Chu, Y. X., & Li, J. (2013). Let-7b is involved in the inflammation and immune responses associated with *Helicobacter pylori* infection by targeting Toll-like receptor 4. PloS one, 8(2), e56709. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056709>
- Torres J., Leal-Herrera Y., Perez-Perez G, Gómez A, Camorlinga-Ponce M, Cedillo-Rivera R. 1998. A community-based seroepidemiologic study of *Helicobacter pylori* infection in Mexico. J Infect Dis 1998; 178(4): 1089-1094. doi: 10.1086/515663. PMID: 9806039.
- Torres Jiménez, Franklin, & Torres Bayona, Carlos. (2016). Fisiopatología molecular en la infección por *Helicobacter pylori*. Revista Salud Uninorte, 32(3), 500-512. Retrieved March 25, 2022, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522016000300013&lng=en&tlng=es.
- Uno K, Kato K, Atsumi T, Suzuki T, Yoshitake J, Morita H, Ohara S, Kotake Y, Shimosegawa T, Yoshimura T. Toll-like receptor (TLR) 2 induced through TLR4 signaling initiated by *Helicobacter pylori* cooperatively amplifies iNOS induction in gastric epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007 Nov;293(5):G1004-12. doi: 10.1152/ajpgi.00096.2007. Epub 2007 Sep 13. PMID: 17855767.
- Van Zanten SJ, Dixon MF, Lee A. The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. Gastroenterology. 1999 May;116(5):1217-29. doi: 10.1016/s0016-5085(99)70025-9. PMID: 10220514.
- Vilaichone, R., & Mahachai, V. (2013). Functional Dyspepsia and *Helicobacter pylori* Infection. Dyspepsia - Advances in Understanding and Management. doi: 10.5772/56652
- Wagih HM, El-Ageery SM, Alghaithy AA. A study of RUNX3, E-cadherin and β -catenin in CagA-positive *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis in Saudi patients. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2015 Apr;19(8):1416-29. PMID: 25967717.
- Waldrop, R., McLaren, A., Calara, F., & McLemore, R. (2014). Biofilm growth has a threshold response to glucose in vitro. Clinical orthopaedics and related research, 472(11), 3305–3310. <https://doi.org/10.1007/s11999-014-3538-5>
- Wilson KT, Crabtree JE. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. Gastroenterology. 2007 Jul;133(1):288-308. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.008. PMID: 17631150.
- Wong, E., Goon, C, Chua, G., Chin A., Peters, F., Marshall, Bow., Lee, K., Vadivelu, J. y Fai, M. 2016. Comparative Genomics Revealed Multiple *Helicobacter pylori* Genes Associated with Biofilm Formation In Vitro. PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0166835 November 21.

World Gastroenterology Organisation (WGO). 2021. *Helicobacter pylori*. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/helicobacter-pylori-english-2021.pdf>

Yamada KJ, Kielian T. 2019. Biofilm-Leukocyte Cross-Talk: Impact on Immune Polarization and Immunometabolism. *J Innate Immun.* 2019;11(3):280-288. doi: 10.1159/000492680. Epub 2018 Oct 22. PMID: 30347401; PMCID: PMC6476693.

Yang XO, Panopoulos AD, Nurieva R, Chang SH, Wang D, Watowich SS, Dong C. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem.* 2007 Mar 30;282(13):9358-9363. doi: 10.1074/jbc.C600321200. Epub 2007 Feb 3. PMID: 17277312.

Yilmaz, O., Sen, N., Küpelioğlu, A. A., & Simşek, I. (2006). Detection of *H. pylori* infection by ELISA and Western blot techniques and evaluation of anti CagA seropositivity in adult Turkish dyspeptic patients. *World journal of gastroenterology*, 12(33), 5375–5378. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i33.5375>

Yonezawa H, Osaki T, Kamiya S. Biofilm Formation by *Helicobacter pylori* and Its Involvement for Antibiotic Resistance. *Biomed Res Int.* 2015;2015:914791. doi: 10.1155/2015/914791. Epub 2015 May 19. PMID: 26078970; PMCID: PMC4452508.

Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The isolation and characterization of murine macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008 Nov;Chapter 14:Unit 14.1. doi: 10.1002/0471142735.im1401s83. PMID: 19016445; PMCID: PMC2834554.

Zhang F, Pu K, Wu Z, Zhang Z, Liu X, Chen Z, Ye Y, Wang Y, Zheng Y, Zhang J, An F, Zhao S, Hu X, Li Y, Li Q, Liu M, Lu H, Zhang H, Zhao Y, Yuan H, Ding X, Shu X, Ren Q, Gou X, Hu Z, Wang J, Wang Y, Guan Q, Guo Q, Ji R, Zhou Y. Prevalence and associated risk factors of *Helicobacter pylori* infection in the Wuwei cohort of north-western China. *Trop Med Int Health.* 2021 Mar;26(3):290-300. doi: 10.1111/tmi.13517. Epub 2020 Dec 20. PMID: 33159827.

Zhang, J., Wei, B., Hu, H., Liu, F., Tu, Y., Zhao, M., & Wu, D. (2017). Preliminary study on decreasing the expression of FOXP3 with miR-155 to inhibit diffuse large B-cell lymphoma. *Oncology letters*, 14(2), 1711–1718. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6345>

Zeng J, Xie C, Zhang L, Liu X, Chan MTV, Wu WKK, Chen H. Host Cell Antimicrobial Responses against *Helicobacter pylori* Infection: From Biological Aspects to Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 19;23(18):10941. doi: 10.3390/ijms231810941. PMID: 36142852; PMCID: PMC9504325.

Zhong X, Chen O, Zhou T, Lü M, Wan J. Cytotoxin-Associated Gene A-Positive *Helicobacter pylori* Promotes Autophagy in Colon Cancer Cells by Inhibiting miR-125b-5p. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2021 Mar 2;2021:6622092. doi: 10.1155/2021/6622092. PMID: 33791049; PMCID: PMC7984907.

Zhou L, Zhang Y, Ge Y, Zhu X, Pan J. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation. *Front*

Microbiol. 2020 Oct 15;11:589640. doi: 10.3389/fmicb.2020.589640. PMID: 33178172; PMCID: PMC7593269.

