

**Determinación del estado de metilación de ADN en cultivos primarios de células epiteliales
gástricas humanas sanas infectadas con *Helicobacter Pylori* (ATCC 43504)**

Jorge Alexander Silva Sayago, Bact.

Trabajo de grado para optar por el título de: Magister En Ciencias Básicas Biomédicas

Director:

Henry Bautista Amorocho Bact.

Ms.C. PhD (C) En Ciencias Básicas Biomédicas.

Codirector:

Clara Inés Vargas Castellanos, MD.

Ms.C. En Genética Médica.

Universidad Industrial De Santander

Facultad De Salud

Escuela De Medicina

Maestría En Ciencias Básicas Biomédicas

Bucaramanga

2019

*No te rindas, por favor no cedas,
aunque el frío queme,
aunque el miedo muerda,
aunque el sol se ponga y se calle el viento,
aún hay fuego en tu alma,
aún hay vida en tus sueños,
porque cada día es un comienzo nuevo,
porque esta es la hora y el mejor momento.*

Mario Benedetti

Agradecimientos

A mi director de tesis el Doctor Henry Bautista Amorcho y codirectora la Doctora Clara Vargas, por toda su ayuda, formación, conocimiento y colaboración durante mi maestría.

A mis amados Padres, por su amor, soporte constante y por enseñarme a perseverar y creer que todo es posible.

Al Doctor Jaime Gómez Correa por permitirnos tomar las muestras en su consultorio privado de gastroenterología

Al Grupo de Investigación BACTERIAS & CÁNCER, en especial al Doctor Alonso Martinez, Doctora Tania Perez y Doctora Beatriz Salazar, por su apoyo constante y donación de la cepa de *H. pylori*.

Al Laboratorio de Investigaciones biomédicas y biotecnológicas –LIBB de la Universidad de Santander, donde se realizaron todos los ensayos del proyecto.

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (COLCIENCIAS) por la financiación de esta investigación enmarcada dentro del marco del estudio “Diseño de un modelo de cáncer gástrico en ratones SCID mediante ingeniería genética de células normales de mucosa gástrica humana” número de contrato FP44842-166-2016 convocatoria 715 del año 2015.

A mis grandes amigos, Erika Moreno, Juliana Rolon, Andrea Sierra y Gerson Quijano

Contenido

Introducción.....	18
1. Estado del arte.....	21
1.1 Epidemiología del cáncer gástrico	21
1.2 Epidemiología de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	22
1.3 Metilación de genes efectores mediados por <i>Helicobacter pylori</i>	24
2. Marco conceptual.....	29
2.1 Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i>	29
2.2 Patologías asociadas a la infección por <i>Helicobacter. Pylori</i>	30
2.3 Mecanismo de infección por <i>Helicobacter pylori</i>	31
2.4 <i>Helicobacter pylori</i> y cáncer gástrico	32
2.4.1 Efecto directo de <i>Helicobacter pylori</i> sobre células epiteliales gástricas	34
2.4.2 Efectos indirectos de <i>Helicobacter pylori</i> a través de procesos inflamatorios	35
2.5 Epigenética y fisiología de la metilación del ADN	35
2.6 Metilación del ADN en cáncer	37
3. Objetivos	38
3.1 Objetivo General.....	38
4. Materiales y métodos	39
4.1 Tipo de estudio.....	39
4.2 Consideraciones Éticas	40
4.3 Obtención tejido gástrico	40
4.3.1 Confirmación de la ausencia de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> en biopsias de antro gástrico humano.....	41

4.3.2	Aislamiento y cultivo de células epiteliales gástricas a partir de mucosa del antro gástrico humano	42
4.3.3	Confirmación del fenotipo de células epiteliales gástricas humana.....	43
4.4	Obtención, mantenimiento y confirmación del fenotipo de <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504).	44
4.5	Modelo de Infección de células epiteliales gástricas primarias humanas con <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504).....	45
4.5.1	Determinación viabilidad de <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504) en el modelo de Infección	46
4.5.2	Extracción de ADN	46
4.5.3	Determinación del estado de metilación de ADN en células epiteliales gástricas primarias y tumorales infectados con <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504).....	47
4.5.4	Determinación del estado global de metilación en células epiteliales gástricas primarias y tumorales infectadas con <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504).....	49
4.6	Análisis de resultados	49
5.	Resultados.....	50
5.1	Obtención tejido gástrico	50
5.1.1	Confirmación de ausencia de <i>Helicobacter pylori</i> en las biopsias gástricas.....	50
5.1.2	Aislamiento y cultivo de células epiteliales gástricas humanas	51
5.1.3	Confirmación del fenotipo de células epiteliales gástricas humanas	53
5.2	Confirmación del fenotipo de <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504).....	54
5.3	Determinación viabilidad de <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504)	56
5.4	Modelo de infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales humanas con <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504).....	57

5.4.1	Viabilidad de <i>Helicobacter pylori</i> (ATCC 43504) en el modelo de infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales humanas	58
5.4.2	Determinación del estado de metilación de ADN en células epiteliales gástricas primarias infectados con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504)	59
5.4.3	Confirmación del estado de metilación de ADN en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectados con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	68
5.4.4	Determinación del estado global de metilación en cultivo primarios y tumorales gástricos humanos	74
6.	Discusión.....	76
7.	Conclusiones.....	82
8.	Recomendaciones	83
	Referencias bibliográficas.....	84
	Anexos.....	93

Lista de figuras

Figura 1. Diagrama esquemático de la infección por <i>H. pylori</i> .	32
Figura 2. Mecanismo directo e indirecto de <i>H. pylori</i> en la carcinogénesis gástrica..	33
Figura 3. Algoritmo diseño experimental	39
Figura 4. Confirmación de ausencia de <i>H. pylori</i> en las biopsias gástricas.....	50
Figura 5. Cultivo primario de células epiteliales gástricas humanas primer día del aislamiento.	51
Figura 6. Cultivo primario de células epiteliales gástricas humanas tercer día del aislamiento.	52
Figura 7. Cultivo primario de células epiteliales gástricas humanas veinteaño día del aislamiento.	53
Figura 8. Confirmación del fenotipo de células epiteliales gástricas humanas	54
Figura 9. Pruebas confirmatorias para la identificación de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	55
Figura 10. Detección del gen de la Ureasa Alfa en <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	56
Figura 11. Determinación de la viabilidad de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504)	56
Figura 12. Infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales humanas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).	57
Figura 13. Determinación de viabilidad de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) durante la infección de células primarias y tumorales gástricas humanas	58
Figura 14. Validación primers empleando el control positivo de metilación (ADN humano metilado)..	60
Figura 15. Validación primers empleando polimorfonucleares de sangre periférica.	61
Figura 16. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>hMLH1</i> en células epiteliales gástricas primarias humanas infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504)..	62
Figura 17. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>CDH1</i> en células epiteliales gástricas primarias humanas infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).	63
Figura 18. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>CDKN2A</i> en células epiteliales gástricas primarias humanas infectados con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).	64
Figura 19. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>hMLH1</i> en células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504)..	65

Figura 20. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>CDH1</i> en células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504)..	66
Figura 21. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>CDKN2A</i> en células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).	67
Figura 22. Infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) humanas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) durante siete días.....	69
Figura 23. Determinación de viabilidad de <i>H. pylori</i> (ATCC 43504)	70
Figura 24. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>hMLH1</i> en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) durante siete días.....	71
Figura 25. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>CDH1</i> en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) durante siete días.....	72
Figura 26. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen <i>CDKN2A</i> en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504) durante siete días.....	73
Figura 27. Determinación del estado global de metilación en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con <i>H. pylori</i> (ATCC 43504).....	75

Lista de tablas

Tabla 1. Genes diferencialmente metilados en relación con la infección por <i>H. pylori</i>	25
Tabla 2. Alteraciones del estado de metilación de genes en modelos <i>in vitro</i> de infección por <i>H. pylori</i> en ausencia de la respuesta inmune	27
Tabla 3. Primers para PCR metilación específica	47
Tabla 4. Herramientas bioinformáticas empleadas para evaluar los primers.	59

Lista de anexos

Anexo A. Aval Comité de Ética CEINCI	93
Anexo B. Consentimiento Informado	95

Abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico

AE1/AE3: Coctel de citoqueratinas

AGS: Célula tumoral gástrica

BabA: Blood group antigen binding protein A

BCG823: Célula tumoral gástrica

°C: Grados centígrados

Cag PAI: Islas de patogenicidad cag

CagA: Gen A asociado a la citotoxina

CDH1: Gen E-cadherina

CDKN2A: Gen p16

CpG: Dinucleótidos Citosina-Guanina

CO₂: Dióxido de carbono

BHI: Caldo infusión cerebro corazón

DAB: Diaminobenzadina

DMEN HG: Medio de cultivo DMEM, alto en glucosa

DNMTs: Metiltransferasas

DNMT1: Metiltransferasa 1

DNMT2: Metiltransferasa 2

DNMT3A: Metiltransferasa 3A

DNMT3B: Metiltransferasa 3B

DNMT3L: Metiltransferasa 3L

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EMA: Antígeno epitelial de membrana

FBSi: Suero fetal bovino inactivado

GST: Genes supresores de tumor

GES-1: Células gástricas transformadas

HeLa: Célula tumoral de cérvix

hMLH1: Gen MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2

IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer

IFN- γ : Interferón gamma

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-4: Interleuquina 4

IL-6: Interleuquina 6

IL-8: Interleuquina 8

KATOIII: Célula tumoral gástrica

kb: Kilobase

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear

LIBB: Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y Biotecnológicas

LINE-1: Elementos nucleares dispersos largos

MALT: Linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa

mL: Mililitro

mg: Miligramo

mm: Milímetro

mM: Milimolar

MKN7: Célula tumoral gástrica

MKN28: Célula tumoral gástrica

MKN45: Célula tumoral gástrica

MKN74: Célula tumoral gástrica

MOI: Multiplicidad de Infección

mARN: ARN mensajero

nm: Nanómetros

NOS: Especies reactivas de nitrógeno.

pb: Pares de bases

PBS: Búfer fosfato salino

PCR-MSP: PCR metilación específica

PI: Yoduro de propidio

OMP: Proteínas de membrana externa

RAW264.7: Células macrófagos de ratón

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

rpm: Revoluciones por minuto.

SabA: Sialic acid binding protein A

SGC-7901: Célula tumoral gástrica

siARN: ARN interferente

TMK-1: Célula tumoral gástrica

TNF- α : Factor necrosis tumoral alfa

U/mL: Unidades por mililitro

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

ureA: Ureasa Alfa

VacA: Citotoxina vacuolizante

Resumen

Título: Determinación del estado de metilación de ADN en cultivos primarios de células epiteliales gástricas humanas sanas infectadas con *Helicobacter pylori* (ATCC 43504)*

Autor: Jorge Alexander Silva Sayago**

Palabras Clave: Epigenética, Metilación, *Helicobacter pylori*, cultivo gástrico primario

Descripción:

Helicobacter pylori es un patógeno clasificado como agente cancerígeno clase I por la agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer. La bacteria ocasiona metilación de ADN en múltiples genes supresores tumorales (GST) de células epiteliales gástricas. Esta metilación es inducida por dos mecanismos: un efecto directo mediado por componentes bacterianos y un efecto indirecto desencadenado por la respuesta inmune. No obstante, en la actualidad no hay consenso si los cambios epigenéticos son producto de la acción de un mecanismo en particular o la combinación de los mismos.

Cultivos primarios de células epiteliales gástricas del antro de un donante sano fueron infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) a una multiplicidad de infección de 100. La infección fue monitoreada durante 24, 48, 72 h y 7 días; garantizando la viabilidad, disponibilidad de nutrientes de las células y las bacterias. El estado de metilación de tres GST (*CDKN2A*, *CDH1* y *hMLH1*) ampliamente reportados en cáncer gástrico se evaluaron con PCR metilación específica y el estado de metilación global se determinó mediante un inmunoensayo (ELISA). Control se usaron células tumorales gástricas (AGS).

Los resultados obtenidos evidenciaron que la infección de células gástricas primarias y tumorales con *H. pylori* (ATCC 43504), en los tiempos de incubación evaluados de hasta siete días, no indujo cambios en el estado de metilación de los tres GST evaluados. No se observó diferencias en los porcentajes de metilación global de las células gástricas primarias y tumorales infectadas y sin infectar. Por tanto, los anteriores resultados sugieren que los cambios epigenéticos observados durante la infección de *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica podrían ser producto de la respuesta inmune y no del efecto directo de la bacteria sobre las células gástricas.

* Tesis de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Medicina. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de Tesis: Henry Bautista Amorcho Bact. MsC, PhD (c). Codirectora de tesis: Clara Inés Vargas, MD, MsC.

Abstract

Title: Determination of DNA methylation status in primary cultures of healthy human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori* (ATCC 43504)*

Autor: Jorge Alexander Silva Sayago**

Keywords: Epigenetics, Methylation, *Helicobacter pylori*, primary gastric culture

Description

Helicobacter pylori is a pathogen classified as a class I carcinogen by the International Agency for Research on Cancer. The bacterium causes DNA methylation in multiple tumor suppressor genes (TSG) of gastric epithelial cells. This methylation is induced by two mechanisms: a direct effect mediated by bacterial components and an indirect effect triggered by the immune response. However, currently there is no consensus about what is the cause of the epigenetic changes, a single mechanism or the combination of both.

Primary cultures of gastric epithelial cells from the antrum of a healthy donor were infected with *H. pylori* (ATCC 43504) at a multiplicity of infection of 100. The infection was monitored for 24, 48, 72 h and 7 days; granting the viability and nutrient availability of cells and bacteria. The methylation status of three TSG (*CDKN2A*, *CDH1* and *hMLH1*) widely reported in gastric cancer was assessed with PCR methylation-specific and global methylation status was determined by an immunoassay (ELISA). Gastric tumor cells (AGS) were used as control.

Results obtained showed that the infection of primary and tumor gastric cells with *H. pylori* (ATCC 43504), in the evaluated incubation times of up to seven days, did not induce changes in the methylation status of the three TSG evaluated. No differences were observed in the percentages of global methylation of infected and uninfected primary gastric and tumor cells. Therefore, the above results suggest that the epigenetic changes observed during *H. pylori* infection in gastric carcinogenesis could be product of the immune response and not of the direct effect of the bacteria on the gastric cells.

* Thesis Project

** Faculty of Health, School of Medicine, Master in Basic Biomedical Sciences. Thesis director: Henry Bautista Amorcho Bact. MsC, PhD (c). Thesis Co-directors: Clara Inés Vargas, MD, MsC.

Introducción

La carcinogénesis gástrica se desarrolla a través de una cascada de lesiones precancerosas en la mucosa normal, donde los fenómenos inflamatorios ocasionados por *H. pylori* conllevan a la acumulación de mutaciones y modificaciones epigenéticas que pueden conducir al desarrollo de cáncer gástrico (Correa & Piazzuelo, 2012).

Durante la progresión del cáncer gástrico, los procesos inflamatorios desencadenados en respuesta a la infección por *H. pylori* favorecen la acumulación de citoquinas proinflamatorias, especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS), las cuales inducen diferentes cambios epigenéticos (Nardone & Compare, 2008). Una de las principales modificaciones epigenéticas, es la metilación de la región promotora de genes supresores de tumor (GST) mediado por la acción de ADN metiltransferasas (DNMTs), que ocasiona una regulación negativa de la transcripción en múltiples genes en cáncer gástrico (Rodríguez & Esteller, 2011; Qu *et al*, 2013).

La metilación del ADN ocasionada por *H. pylori*, puede ser inducida por dos mecanismos: El primero sugiere el efecto directo de la bacteria mediado por componentes bacterianos, como DNMTs y sistemas de secreción tipo IV (Olofsson *et al*, 2010; Low *et al*, 2014). Mientras que el segundo mecanismo se caracteriza por el daño indirecto desencadenado por la respuesta inmune, donde la inflamación y la acumulación de ROS y NOS genera los cambios epigenéticos (Moss *et al*, 2005, Niwa *et al*, 2010). No obstante, en la actualidad no hay consenso si los cambios epigenéticos observados durante el proceso de carcinogénesis en la infección por *H. pylori* son producto de la acción de un mecanismo en particular o la combinación de los mismos (Chiba *et al*, 2008; Chiariotti *et al*, 2013; Sitaraman, 2014)

Numerosos estudios han evaluado la presencia de metilación del ADN en la mucosa gástrica en individuos infectados crónicamente con *H. pylori* y en modelos *in vitro* de infección que emplean células efectoras inmunitarias o mediadores pro-inflamatorios, observándose la hipermetilación de secuencias promotoras de diferentes GST como *CDKN2A*, *CDH1* y *hMLH1* (Chan *et al*, 2003; Wen *et al*, 2010; Huang *et al*, 2012).

En contraste, existen pocas evidencias en donde hayan evaluado el efecto directo de *H. pylori* en el silenciamiento de genes implicados en la carcinogénesis gástrica mediado por la metilación de ADN, empleando modelos *in vitro* de infección en ausencia de la respuesta inmune. Se describió la participación de *H. pylori* en la hipermetilación de GST y algunos genes reguladores transcripcionales pleiotrópicos y efectores (Bussière *et al*, 2010, Yan *et al*, 2011; Pero *et al*, 2011). Sin embargo, los anteriores estudios fueron realizados en líneas celulares g sticas humanas tumorales y transformadas, lo cual crea un sesgo de medición para evaluar la participación de *H. pylori* en la metilación de genes. Lo anterior, debido a las lesiones genéticas intr secas de estas líneas celulares y las limitantes para determinar en qué fase del proceso de carcinogénesis se produjeron las modificaciones epigenéticas (Chiariotti *et al*, 2013; Sitaraman, 2014).

Por consiguiente, el presente estudio determinó el efecto directo de la infección de cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) sobre el estado de metilación de ADN en tres GST ampliamente estudiados en cáncer gástrico (*CDKN2A*, *CDH1* y *hMLH1*) mediante el uso de cultivos primarios de células epiteliales g sticas sanas de humano y células g sticas tumorales humanas-AGS como control. El modelo propuesto representó una aproximación más acorde para evaluar los cambios epigenéticos tempranos presentes en la infección en ausencia del sistema inmune, lo cual podría ayudar a la compresión de la historia natural de

la enfermedad y permitir en un futuro el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basada en el campo de la epigenética del cáncer.

1. Estado del arte

1.1 Epidemiología del cáncer gástrico

Según la base de datos GLOBOCAN de la agencia internacional de investigación sobre cáncer en su último informe del año 2018, el cáncer gástrico es el quinto tipo de cáncer más frecuente en el mundo con 1,031,700 casos nuevos anuales y la tercera causa de muerte por cáncer para ambos sexos con 787,200 decesos, siendo el doble de frecuente en hombres que en mujeres. Se estima que cerca del 77% de los casos ocurre en países en vía de desarrollo, particularmente Asia Oriental, mientras que el porcentaje restante ocurre en países desarrollados (Bray *et al*, 2018).

En Colombia, según el instituto nacional de cancerología en su último informe del año 2015, el cáncer gástrico fue la primera causa de muerte para ambos sexos, representado el 14,1 % de defunciones entre todos los cánceres (45.078 muertes) (Ospina *et al*, 2015). De acuerdo con los datos de la cuenta de alto costo, organismo técnico no gubernamental del sistema general de seguridad social en salud de Colombia, para el año 2015 el cáncer gástrico afectó a 6.028 pacientes, de los cuales 1.562 fueron nuevos casos, lo que representó el 4.96% de todas las incidencias por cáncer en el país. Así mismo, el cáncer gástrico presentó una prevalencia de 12.5 por cada 100.000 habitantes y una incidencia de 3.2 por 100.000 habitantes (CAC, 2015).

Adicionalmente, en nuestro país el cáncer gástrico presenta una mayor prevalencia y mortalidad en relación con la altitud, evidenciado por una marcada presentación de casos en regiones de la cordillera de los Andes en comparación con las regiones costeras. El anterior fenómeno se atribuye a múltiples factores de tipo dietario, infeccioso, genético y medioambientales que varían entre las zonas geográficas de baja y alta altitud (Torres *et al*, 2013). Las estimaciones de incidencia de cáncer gástrico por grupos de edad muestran un

aumento exponencial en las tasas de esta enfermedad posterior a los 60 años y una menor supervivencia en pacientes mayores. Lo anterior, podría influenciar los patrones geográficos observados en la enfermedad debido a las diferencias en el envejecimiento poblacional (INS-ESE, 2017).

1.2 Epidemiología de la infección por *Helicobacter pylori*

H. pylori es uno de los patógenos cosmopolitas más comunes que infecta humanos. La prevalencia de la infección varía entre países, observándose mayormente la colonización en países en vía de desarrollo respecto a países desarrollados (Eusebi, *et al*, 2014). Estas diferencias se atribuyen principalmente a la adquisición de la bacteria en la infancia. Lo anterior se ilustra en datos epidemiológicos donde la infección en niños menores de 10 años residentes en países desarrollados es del 0 a 5%, en comparación con el 13 a 60% en niños en países en vía de desarrollo (Mitchell *et al*, 2001). Adicionalmente, la primo-infección en adultos, o la reinfección después de la erradicación exitosa es poco común, con una incidencia anual de 0,3-0,7% en países desarrollados y 6-14% en países en vía de desarrollo (Logan & Walker, 2001).

Un meta-análisis reciente sobre la prevalencia de infección por *H. pylori* en el mundo, evidenció que países de América Latina y el Caribe presentaron la mayor tasa de infección mundial (59.3%, IC: 52.9-65.6). Para Colombia, este estudio determinó una estimación agrupada de la prevalencia en un 83.1% (IC: 78.5-87.7) (Zamani *et al*, 2018).

En nuestro país, la infección por *H. pylori* y el desarrollo de cáncer gástrico varían de acuerdo con a la región geográfica. En general, las poblaciones que viven en las regiones montañosas presentan altas tasas de cáncer gástrico; en contraste, los habitantes de las costas atlántica y pacífica presentan tasas muy bajas (Bravo *et al*, 2003; Correa & Piazuelo, 2012).

Un estudio de casos y controles realizado en el departamento de Nariño entre 1968 y 1972, reportó la presencia de 150 casos de cáncer gástrico por 100,000 habitantes para sujetos nacidos en el municipio de Tuquerres ubicado a ≥ 2000 metros sobre el nivel del mar, en comparación con 6 casos por 100,000 habitantes para los sujetos nacidos en Tumaco ubicado entre 1000 y 2000 metros sobre el nivel del mar (Cuello *et al*, 1976). Un hallazgo similar se evidenció en un estudio llevado a cabo en 16 ciudades del país, donde se observó un mayor riesgo en el desarrollo de cáncer gástrico atribuido a la alta prevalencia de *H. pylori* en la región Andina, en comparación con la región Atlántica, principalmente en ciudades como Tunja (99,1%), Popayán (86,5%) y Manizales (85,5%) (Bravo *et al*, 2003).

Recientemente, Kodaman y colaboradores estudiaron la asociación entre las lesiones pre-neoplásicas gástricas y la variación genómica presente en muestras humanas y cepas de *H. pylori* provenientes de los municipios de Tumaco y Tuquerres en Nariño. Este estudio demostró que las cepas de *H. pylori* presentaban un origen africano que predominaba en la población costera de bajo riesgo (Tumaco) y un origen europeo en la población de montaña de alto riesgo (Tuquerres), con un predominio de ascendencia africana y amerindia en los habitantes de la región costera y montañosa, respectivamente. Asimismo, la interacción entre la ascendencia del huésped y las cepas de *H. pylori* explicaron la diferencia en la gravedad de las lesiones pre-neoplásicas gástricas observadas en las dos regiones en estudios anteriores de Cuello y colaboradores (Cuello *et al*, 1976). En particular, cepas de *H. pylori* con ascendencia africana fueron relativamente benignas en los humanos de ascendencia africana pero perjudiciales en individuos con ascendencia amerindia (Kodaman *et al*, 2014).

1.3 Metilación de genes efectores mediados por *Helicobacter pylori*

El control de la expresión génica a través de mecanismos epigenéticos, es vital para la modulación de la mayoría de las vías de señalización celular (Mikeska *et al*, 2014). Estudios recientes del análisis integrado de la metilación del ADN y las alteraciones genéticas en cáncer gástrico, demostraron que los genes involucrados en las vías relacionadas con el desarrollo de cáncer se encuentran frecuentemente afectados por alteraciones epigenéticas del ADN (metilación) en comparación con las alteraciones genéticas (mutaciones) (Kim *et al*, 2013; Yoda *et al*, 2015).

La metilación del ADN ocasionada por *H. pylori*, puede ser inducida principalmente por dos mecanismos, directo e indirecto: El mecanismo directo involucra la participación de componentes bacterianos, como DNMTs y sistema de secreción tipo IV (Olofsson *et al*, 2010; Low *et al*, 2014). En contraste, el mecanismo indirecto involucra la respuesta inmunitaria, mediado por la inflamación desencadenada por la producción constante de citoquinas y la acumulación de ROS y NOS que ocasionan cambios en el estado de metilación de múltiples genes (Moss *et al*, 2005, Niwa *et al*, 2010).

El mecanismo indirecto se encuentra ampliamente documentado en la literatura (Niwa *et al*, 2010; Cheng *et al*, 2013). Numerosos estudios llevados a cabo en biopsias de estómago de pacientes infectados con *H. pylori* han evidenciado la presencia de metilación en diversos genes efectores celulares que incluyen genes supresores de tumores, genes implicados en la reparación del ADN, genes relacionados con la regulación del ciclo celular, el crecimiento y diferenciación celular (ver tabla 1).

Tabla 1.Genes diferencialmente metilados en relación con la infección por *H. pylori*

Genes	Función Principal	Referencias
<i>APC</i>	Regulador adhesión celular	Vadlamudi <i>et al</i> , 2004
<i>CDH-1</i>	Adhesión celular dependiente de Calcio	Chan <i>et al</i> , 2006
<i>CDKN2A</i>	Inhibidor CDK	Maekita, <i>et al</i> , 2006
<i>p14 (ARF)</i>	Inhibidor MDM2	Maekita, <i>et al</i> , 2006
<i>HRASLS</i>	Supresor HRAS-like	Maekita, <i>et al</i> , 2006
<i>hMLH1</i>	Reparación de errores ADN	Perri <i>et al</i> , 2007
<i>COX2</i>	Mediador de inflamación	Perri <i>et al</i> , 2007
<i>MGMT</i>	Reparación ADN	Sepulveda <i>et al</i> , 2010
<i>TFF-2</i>	Modulación de la respuesta inflamatoria	Peterson <i>et al</i> , 2010
<i>RUNX3</i>	Supresor tumoral	Lu <i>et al</i> , 2012
<i>Vezatin</i>	Supresor tumoral	Miao <i>et al</i> , 2013
<i>FOXD3</i>	Supresor tumoral	Cheng <i>et al</i> , 2013
<i>Connexin 32</i>	Uniones intercelulares	Wang <i>et al</i> , 2014
<i>Connexin 43</i>	Uniones intercelulares	Wang <i>et al</i> , 2014

Los anteriores hallazgos fueron confirmados en modelos *in vitro* de infección con *H. pylori* que emplean células efectoras inmunitarias o mediadores pro-inflamatorios. Un estudio realizado en células de adenocarcinoma gástrico (MKN45), determinó que la metilación del gen supresor tumoral *RUNX3* fue inducido únicamente cuando estas células tumorales fueron co-cultivadas con macrófagos de ratón (RAW264.7) en presencia de *H. pylori*, observándose la producción de óxido nítrico en respuesta a la exposición (Katayama *et al*, 2009). Un fenómeno similar se observó para el gen *CDH1*, debido a que líneas tumorales gástricas (MKN7, MKN74 y

TMK-1) infectadas con *H. pylori*, presentaron hipermetilación de este gen mediado por la presencia de interleuquina 1 β (IL-1 β) y la producción de óxido nítrico (Huang *et al*, 2012).

Por otra parte, pocas investigaciones han evaluado el efecto directo de *H. pylori* sobre la metilación del ADN en células epiteliales gástricas en modelos *in vitro* de infección en ausencia de la respuesta inmune (ver tabla 2). Según Bussière y colaboradores, la infección de *H. pylori* sobre diferentes líneas tumorales gástricas (CRL-1739, MKN45 y KATOIII) ocasionó la hipermetilación del promotor de los reguladores transcripcionales pleiotrópicos *USF1* y *USF2*. Adicionalmente, se observó que el tratamiento de estas células con 5'-azacitidina, un inhibidor de la metilación, restauró la expresión de los genes en mención, aún en presencia de *H. pylori* (Bussière *et al*, 2010).

Del mismo modo, Yan y colaboradores evidenciaron la metilación del promotor del gen supresor tumoral oxidorreductasa (*WWOX*) en células tumorales gástricas (AGS y BCG823) infectadas con *H. pylori* (Yan *et al*, 2011). Así mismo, un estudio relacionado demostró la desregulación de la expresión del gen de la ciclooxigenasa 2 (*COX-2*) en la línea tumoral gástrica MKN28 infectada con *H. pylori* (Pero *et al*, 2011). Hallazgos similares se evidenciaron para el gen supresor tumoral O-6-methylguanine-ADN metiltransferasa (*MGMT*), donde la infección de *H. pylori* en la línea tumoral gástrica SGC-7901, ocasionó la hipermetilación del gen con la subsecuente represión de la expresión (Zhang *et al*, 2016).

A pesar que la mayor parte de las investigaciones sobre modelos *in vitro* de infección por *H. pylori* en ausencia de la respuesta inmune se han realizado sobre líneas tumorales gástricas, en la literatura existen pocos reportes del uso de líneas gástricas transformadas. Un estudio llevado a cabo por Miao y colaboradores, evidenció que la infección por *H. pylori* de la línea celular gástrica humana transformada con el virus del simio 40 (GES-1) se asoció con la metilación del

promotor del gen *VEZT*, con reducción en los niveles de mRNA. Así mismo, Xie y colaboradores, emplearon la línea celular transformada GES-1 y la línea tumoral gástrica SGC-7901 y determinaron que la infección de *H. pylori* desreguló la expresión del gen de la gastrina, disminuyendo los niveles de metilación del promotor (Xie *et al*, 2017).

Tabla 2.

Alteraciones del estado de metilación de genes en modelos *in vitro* de infección por *H. pylori* en ausencia de la respuesta inmune

Genes	Funciones Principales	Modificación Epigenética	Referencias
<i>USF1</i>	Factores de transcripción	Hipermetilación ADN	Bussière <i>et al</i> , 2010
<i>USF2</i>	que unen E-box	Hipermetilación ADN	
<i>WWOX</i>	Supresor tumoral	Hipermetilación ADN	Yan <i>et al</i> , 2011
<i>COX-2</i>	Mediador inflamación	Ciclos metilación/desmetilación ADN	Pero <i>et al</i> , 2011
<i>VEZT</i>	Supresor tumoral	Hipermetilación ADN	Miao <i>et al</i> , 2013
<i>MGMT</i>	Supresor tumoral	Hipermetilación ADN	Zhang <i>et al</i> , 2016
<i>Gastrina</i>	Efactor secreción gástrica	Hipometilación ADN	Xie <i>et al</i> , 2017

En Colombia pocas investigaciones han evaluado los fenómenos epigenéticos en la infección con *H. pylori*. En el departamento de Nariño, Schneider y colaboradores, determinaron en la mucosa gástrica niveles significativamente mayores de metilación del gen supresor tumoral- *RPRM* en sujetos que vivían en un área de alto riesgo de cáncer gástrico (Túquerres) respecto a una zona de bajo riesgo (Tumaco). Estas diferencias fueron atribuidas a los factores de virulencia que contenían las cepas de *H. pylori* presentes (Schneider *et al*, 2010).

En este contexto, es notable que *H. pylori* altera la expresión de múltiples genes incluyendo GST, a través del mecanismo epigenético de la metilación de promotores. No

obstante, aunque la evidencia disponible se ha logrado mediante el uso de líneas celulares gástricas humanas tumorales y transformadas, estas no son representativas de la fisiología celular normal y presentan un sesgo de medición que debe ser considerado a la hora de evaluar los fenómenos epigenéticos desencadenados por la bacteria, dado principalmente por las lesiones genéticas intrínsecas de estas líneas celulares y las limitantes para determinar en qué fase del proceso carcinogénico se produjeron las modificaciones epigenéticas (Chiariotti *et al*, 2013; Sitaraman, 2014).

2. Marco conceptual

2.1 Generalidades de *Helicobacter pylori*

H. pylori es una bacteria microaerófila, Gram negativa en forma de espiral que coloniza de manera persistente la mucosa gástrica humana. Desde 1994, la agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC) clasificó este patógeno como un agente cancerígeno de clase I (IARC, 1994). *H. pylori* se caracteriza por poseer un arsenal de factores de virulencia que afectan directamente a las células hospedera a través de moléculas de unión que facilitan el anclaje de la bacteria a su huésped y proteínas que alteran vías de señalización celular y contribuyen al inicio de la respuesta inflamatoria (Roesler *et al*, 2014).

Uno de los principales factores de virulencia es el gen A asociado a la citotoxina (CagA), el cual se encuentra localizado en algunas cepas en una región cromosómica de aproximadamente 40 kb conocido como islas de patogenicidad «cag» (cag PAI) e ingresa a la célula huésped mediante un sistema de secreción bacteriano tipo IV. La proteína CagA activa diferentes cascadas de señalización y provoca un desarrollo celular anormal, caracterizado por reordenamiento del citoesqueleto, aumento de proliferación, elongación y motilidad de las células epiteliales (Higashi *et al*, 2002). Además, cepas de *H. pylori* que contienen la región cag PAI están asociadas con inflamación gástrica severa, ulceración y mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Backert *et al*, 2008).

Otro factor de virulencia importante es la citotoxina vacuolizante (VacA), la cual se encuentra en todas las cepas y su expresión varía entre cepas. VacA presenta tres regiones denominadas *s*, *i*, y *m* que exhiben diferencias en la formación de vacuolas, lo que conlleva a la alteración de la integridad del epitelio gástrico, degradación de ligandos exógenos, cambios en la

permeabilidad de la membrana mitocondrial y estimulación de la autofagia (Willhite & Blanke, 2004). Diversos estudios han determinado que cepas que contienen formas alélicas VacA clasificados como *s1*, *i1* o *m1* se asocian con un mayor riesgo en el desarrollo de cáncer gástrico o lesiones pre-neoplásicas en comparación con cepas clasificadas como *s2*, *i2* o *m2* (Cover, 2016).

H. pylori contiene además un sistema de flagelos vitales para la movilidad y la colonización. Está demostrado en modelos murinos, que la movilidad mediada por flagelos es esencial para la colonización. La mutagénesis dirigida de los genes codificadores de flagelos elimina la capacidad de establecer la colonización exitosa en estómago de ratón (Kao *et al*; 2016). Así mismo, *H. pylori* presenta adhesinas que participan en numerosos procesos durante las fases iniciales y crónicas de la infección. Los factores adhesivos de *H. pylori* pertenecen a la familia de proteínas de membrana externa (OMP) que incluyen principalmente las adhesinas BabA (*blood group antigen binding protein A*) y SabA (*sialic acid binding protein A*), las cuales median la unión de la bacteria a las células epiteliales gástricas a través de mucinas y antígeno del grupo sanguíneo Lewis B. Varios estudios han informado que la infección con cepas de *H. pylori* que contienen genes *BabA* o *SabA* se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cambios pre-neoplásicos y cáncer gástrico (Ishijima *et al*, 2011).

2.2 Patologías asociadas a la infección por *Helicobacter. Pylori*

H. pylori está involucrada en diversos trastornos clínicos del tracto gastrointestinal superior, como gastritis crónica, enfermedad ulcerosa péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) y adenocarcinoma gástrico (Correa & Piazuelo, 2012). Además, en los últimos años la infección por *H. pylori* fue asociada con algunas enfermedades extra-digestivas, que

incluyen anemia por deficiencia de hierro, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedades hepatobiliares, entre otras (Roesler *et al*, 2014).

2.3 Mecanismo de infección por *Helicobacter pylori*

La infección de *H. pylori* posterior al ingreso al huésped, inicia con la supervivencia del ambiente ácido del estómago mediante la liberación de la enzima ureasa, la cual convierte la urea del huésped en amoníaco que reacciona con el ácido clorhídrico y establece un entorno de pH neutro alrededor de la bacteria. Posteriormente, *H. pylori* se traslada desde el lumen del estómago hacia la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico. El estómago humano posee tres regiones glandulares: fondo, corpus y antro, de las cuales *H. pylori* coloniza con éxito las dos últimas, con una preferencia de la región del antro por características propias del tejido como lo es, la incapacidad de producir ácido gástrico. Una vez *H. pylori* se localiza en la capa mucosa, ocurren interacciones específicas entre las adhesinas bacterianas (*BabA* y *SabA*) y los receptores de la célula huésped a través de mucinas y antígenos del grupo sanguíneo Lewis B, las cuales protegen a la bacteria del desplazamiento del estómago por fuerzas generadas por el vaciamiento gástrico. Finalmente, *H. pylori* libera varios factores de virulencia (*CagA* y *VacA*) que ocasionan daño al tejido del huésped y favorece el desarrollo de gastritis. En resumen, para la colonización exitosa de *H. pylori* a la mucosa gástrica se requieren cuatro pasos críticos: (1) supervivencia de la bacteria al ambiente ácido del estómago; (2) movimiento del lumen hacia la capa mucosa que recubre el epitelio gástrico; (3) unión a los receptores del huésped mediado por adhesinas; (4) daño tisular por la liberación de factores de virulencia (Figura 1) (Kao *et al*; 2016; Keilberg *et al*; 2016).

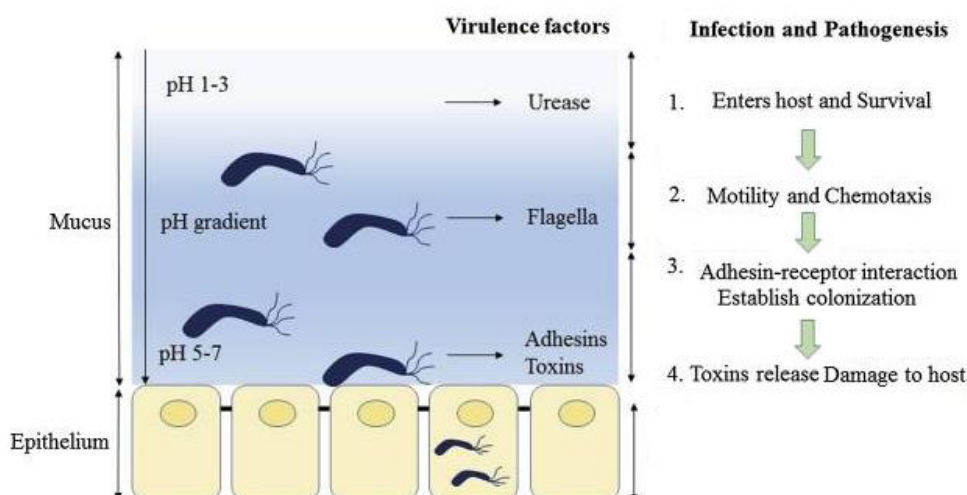


Figura 1. Diagrama esquemático de la infección por *H. pylori*. Tomado y modificado de Kao y colaboradores (Kao *et al*, 2016).

2.4 *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico

La carcinogénesis gástrica se desarrolla a través de una cascada de lesiones precancerosas en la mucosa normal, donde la gastritis crónica ocasionada principalmente por *H. pylori*, evoluciona hacia gastritis atrófica multifocal, metaplasia intestinal, displasia y adenocarcinoma invasivo (Correa & Piazuelo, 2012). Este microambiente inflamatorio local desencadenado en respuesta a la infección crónica por *H. pylori*, favorece la acumulación de citoquinas pro-inflamatorias, ROS y NOS, los cuales inducen la metilación de múltiples genes incluyendo GST, que contribuyen a la carcinogénesis gástrica (Valenzuela *et al*, 2015).

La patogénesis de *H. pylori* y la progresión del cáncer gástrico están mediados por una interacción compleja entre los factores de virulencia bacterianos, factores del huésped y factores ambientales (Chiba *et al*, 2012). En la literatura están descritos dos mecanismos para el desarrollo del cáncer gástrico mediado por la infección de *H. pylori*: la acción directa de la bacteria sobre las células epiteliales y el efecto indirecto mediado a través de procesos inflamatorios desencadenado por la presencia de la bacteria (Figura 2) (Santos & Ribeiro, 2015).

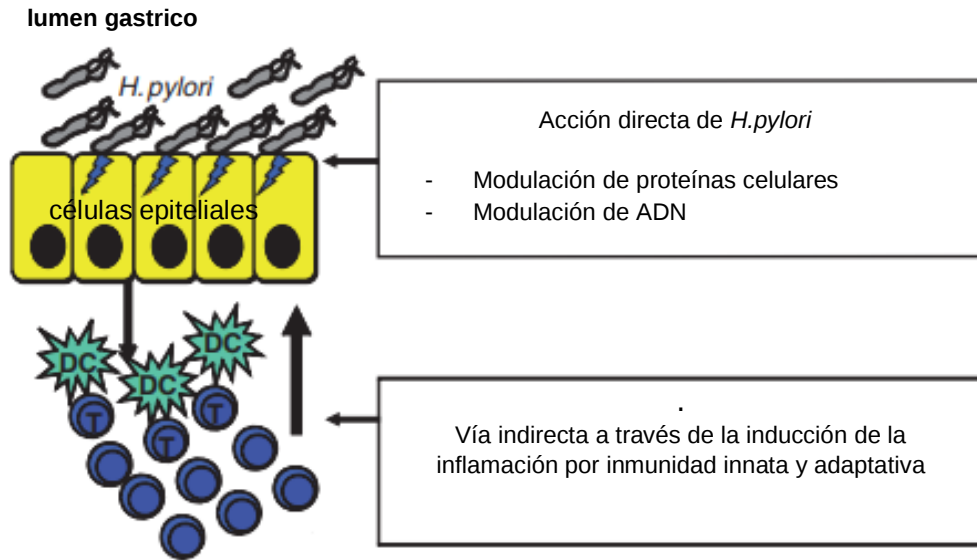


Figura 2. Mecanismo directo e indirecto de *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica. Tomado y modificado de Chiba y colaboradores (Chiba *et al*; 2008).

2.4.1 Efecto directo de *Helicobacter pylori* sobre células epiteliales gástricas:

Diversas investigaciones demostraron que *H. pylori* promueve la carcinogénesis gástrica actuando directamente sobre las células epiteliales gástricas (Figura 2). Modelos de infección *in vitro* con células epiteliales gástricas humanas evidenciaron que *H. pylori* a través del factor de virulencia CagA modula funciones celulares que incluyen el reordenamiento del citoesqueleto, aumento de proliferación, elongación y motilidad de las células epiteliales (Higashi *et al*, 2002). Así mismo, *H. pylori* induce apoptosis en las células infectadas a través de la proteína VacA, lo que ocasiona un aumento en la proliferación como respuesta del hospedero a la colonización, elevando el riesgo en la aparición de mutaciones somáticas debido a errores en la replicación y/o inadecuada capacidad de reparación del ADN en genes claves del ciclo celular relacionados con el desarrollo de cáncer gástrico (Israel & Peek, 2001, Cover, 2016). *H. pylori* aumenta la expresión de gen de la enzima citidina desaminasa (AID), la cual genera mutaciones por deaminación de bases nitrogenadas en las células de la mucosa gástrica, lo que conlleva a una alta frecuencia de mutación de genes vitales del ciclo celular. Se demostró que la mutación del gen *P53* inducida por *H. pylori in vitro* puede ser inhibida por el silenciamiento de la enzima AID utilizando ARN interferente (siARN) (Marusawa & Chiba, 2010).

2.4.2 Efectos indirectos de *Helicobacter pylori* a través de procesos

inflamatorios: La gastritis desencadenada por *H. pylori* es causada predominantemente por una respuesta inmunitaria adaptativa mediada por células T CD4⁺; estas células se clasifican como Th1 y Th2, de acuerdo a la secreción de sustancias como interferón gamma (IFN- γ) e interleuquina 4 (IL-4), respectivamente. Existen evidencias de que la mucosa gástrica infectada con *H. pylori* produce una gran cantidad de IFN- γ junto con una cantidad mínima de IL-4 en la estimulación antigénica. El fenómeno anterior, se demostró experimentalmente en ratones deficientes en IFN- γ , donde la progresión de la gastritis se vio afectada negativamente (Chiba *et al*; 2008). Además, durante la infección microbiana neutrófilos y macrófagos son reclutados en el sitio de la infección y activados para secretar mediadores pro-inflamatorios como interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Qadri *et al*, 2014). La IL1- β y TNF- α inducen la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), un regulador clave de la inflamación y otros procesos biológicos involucrados en la carcinogénesis (Chiba *et al*, 2012). Así mismo, durante la infección aumenta la producción de NOS y ROS, que ocasionan daños en el ADN debido a la formación de productos de lesión oxidativa de ADN como 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG), incrementando el riesgo de desarrollar mutaciones y modificaciones epigenéticas involucradas en la progresión del cáncer gástrico (Nardone & Compare, 2008).

2.5 Epigenética y fisiología de la metilación del ADN

La epigenética se define como el estudio de las modificaciones del ADN heredable durante la división celular, que no incluyen cambios en la secuencia del ADN, como la metilación ADN y la modificación de histonas (Jin & Robertson, 2011). La metilación del ADN ocurre mediante la

adición de un grupo metil sobre la quinta posición de la citosina en dinucleótidos citosina-guanina (CpG) (Feinberg, 2001). Las islas CpG son regiones genómicas ricas en dinucleótidos citosina y guanina, localizadas en regiones promotoras de aproximadamente la mitad de los genes y se encuentran generalmente libres de metilación, permitiendo la expresión génica (Baylin & Herman, 2000).

En condiciones fisiológicas normales, la metilación del ADN se produce en las citosinas en cualquier región del genoma; más del 98% de la metilación del ADN se produce en células somáticas y es utilizada para el silenciamiento de genes en los procesos biológicos que incluyen, la impronta del genoma, silenciamiento de retrotransposones, inactivación del cromosoma X y expresión de genes específicos de tejidos (Bird, 2002; Matsusaka *et al*, 2014).

El proceso de metilación de citosina en las islas CpG es llevado a cabo por la familia de ADN metiltransferasas (DNMTs), las cuales comprenden un conjunto conservado de enzimas modificadoras de ADN que tienen un papel central en la regulación epigenética. El genoma humano codifica cinco DNMTs: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B y DNMT3L, de las cuales DNMT2 y DNMT3L no poseen actividad catalítica (Jin & Robertson, 2011). En mamíferos, DNMT1 está involucrada en el mantenimiento de la metilación de las cadenas de ADN recién sintetizadas y se localiza en los focos de replicación durante la fase S del ciclo celular (Li, 2002). Por otra parte, DNMT3A y DNMT3B, en contraste con DNMT1, presentan preferencia por los dinucleótidos CpG no metilados y están involucradas en la metilación *de novo* durante el desarrollo (Sanchez *et al*, 2015).

En términos generales, el aumento de la metilación en islas CpG de regiones promotoras de un gen conduce a la disminución de la expresión génica (Singal *et al*, 2002). Dos mecanismos están propuestos para explicar la represión transcripcional mediada por la metilación del

promotor de un gen. El primero sugiere la interferencia directa mediada por determinados factores de transcripción que no pueden unirse a elementos de reconocimiento en sus promotores metilados. Mientras que el segundo mecanismo, involucra la participación de una familia de proteínas que contienen un dominio de unión a ADN metilado (MBD) que ocasiona la represión génica (Qu *et al*, 2013).

2.6 Metilación del ADN en cáncer

La alteración de la metilación del ADN en cáncer ocurre por dos mecanismos: hipometilación global del genoma e hipermetilación regional de promotores en islas CpG (Matsusaka *et al*, 2014). El primero de ellos se define como una disminución en el contenido de 5-metilcitosina en todo el genoma (Dunn, 2003). Un ejemplo de este mecanismo, se observa en la hipometilación de los elementos nucleares dispersos largos (LINE-1), el cual está asociada con bajos índices de supervivencia en cáncer gástrico (Shigaki *et al*, 2013). En el segundo mecanismo, la hipermetilación regional de promotores en islas CpG conduce al silenciamiento transcripcional inadecuado y es considerado como uno de los principales mecanismos para la inactivación de GST. La metilación de promotores en GST esta descrita en varios cánceres, en los que se incluyen los genes: *RB* en retinoblastoma esporádico (Ohtani *et al*, 1993), *CDH1* en carcinoma hepatocelular (Yoshiura *et al*, 1995) y en cáncer gástrico *hMLH1* (Perri *et al*, 2007); *CDH1* (Chan *et al*, 2006); *CDKN2A* (Maekita, *et al*, 2006).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar el estado de metilación de los genes supresores tumorales *hMLH1*, *CDH1* y *CDKN2A*, en cultivos primarios de células epiteliales gástricas humanas sanas infectadas con *Helicobacter pylori* (ATCC 43504).

4. Materiales y métodos

4.1 Tipo de estudio

La siguiente investigación empleó el modelo de estudio analítico experimental. A continuación, se ilustra el diseño experimental usado en esta investigación (Figura 3).

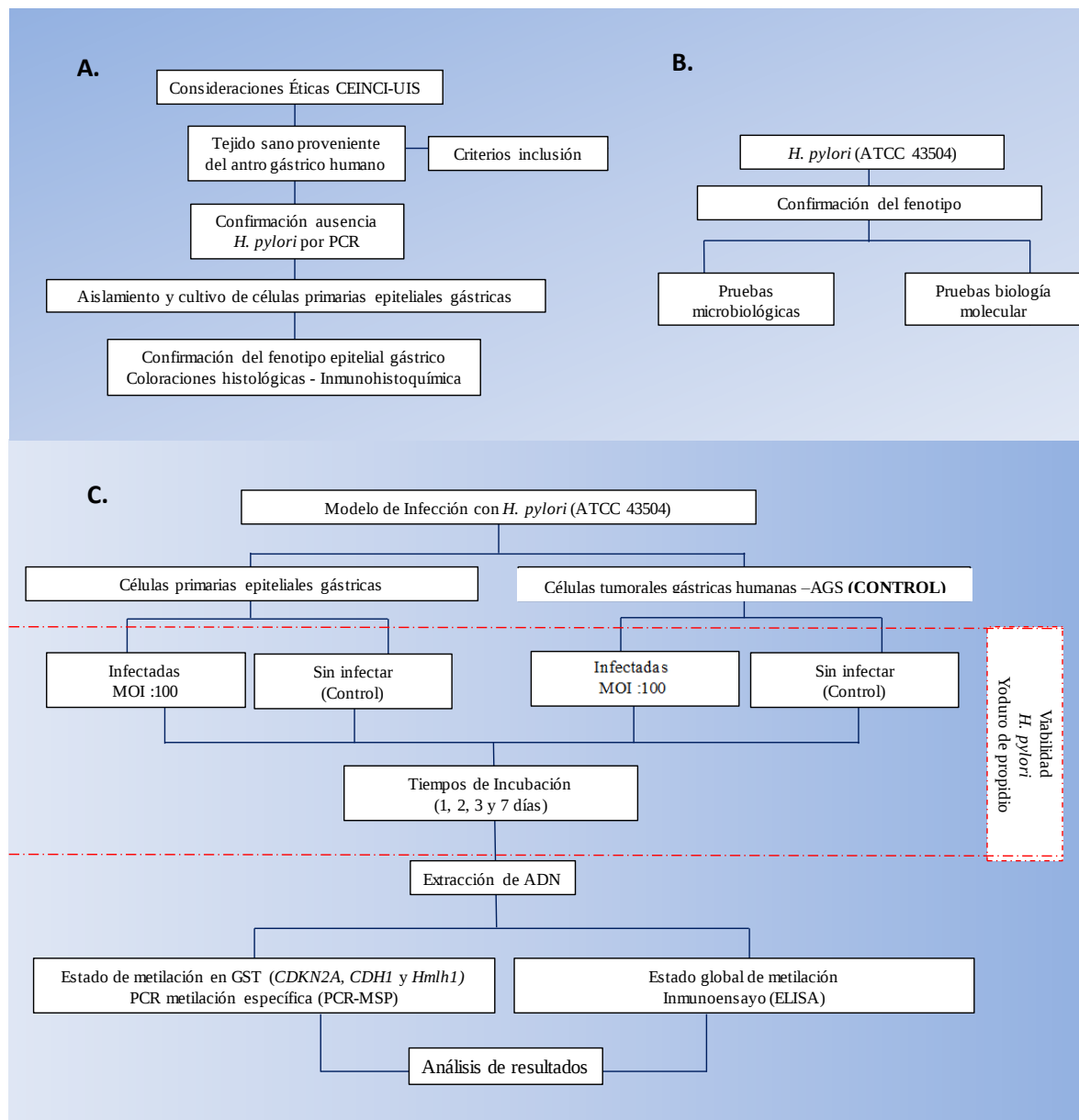


Figura 3. Algoritmo diseño experimental. A. Obtención, aislamiento y cultivo de células epiteliales gástricas a partir de mucosa del antro gástrico humano; B. Confirmación del fenotipo de *H. pylori* (ATCC 43504); C. Modelo de infección de células gástricas primarias y tumorales con *H. pylori* (ATCC 43504). MOI: Multiplicidad de Infección; PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa, CEINCI-UIS: Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander.

4.2 Consideraciones Éticas

Todos los procedimientos realizados en este estudio se ajustaron a los lineamientos de la séptima revisión de la declaración de Helsinki del año 2013 sobre experimentación en seres humanos. Según la resolución de Colombia Número 8430 de 1993, se consideró este estudio experimental de bajo riesgo debido a que la biopsia se recolectó directamente de la endoscopia de los pacientes que consultaron por sospecha de enfermedad gastroduodenal. El consentimiento informado por escrito se obtuvo de todos los participantes incluidos en el estudio. Con el fin de proteger la identidad de los pacientes, las muestras fueron marcadas con un código único de identificación y ningún dato que pueda identificar el paciente fue registrado en la base de datos del proyecto de acuerdo a la ley 1581 de 2012 sobre la protección de datos personales. Esta investigación fue aprobada por el Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS).

4.3 Obtención tejido gástrico

Se recolectaron biopsias provenientes de cinco pacientes que acudieron al consultorio privado de gastroenterología del Doctor Jaime Gómez Correa ubicado en el centro médico de Bucaramanga entre octubre y diciembre del 2018. Las muestras fueron seleccionadas a partir de los siguientes criterios de inclusión: ausencia de procesos pre-neoplásicos (gastritis superficial, pérdida de glándulas, metaplasia intestinal y displasia) y neoplásicos gástricos (adenocarcinoma gástrico según escala de Borrmann) determinado mediante criterios clínicos y no ingestión de antibióticos o inhibidores de la bomba de protones durante quince días previos a la endoscopia. El consentimiento informado aprobado por el CEINCI-UIS, fue administrado a los pacientes incluidos en el estudio previo a la recolección de las biopsias (anexo 1). Los tejidos fueron colectados del antro gástrico por un cirujano endoscopista mediante una exploración

convencional. Las biopsias fueron transferidas a tubos de centrifuga estériles de 15 mL que contenían medio Williams suplementado con 5 mg/L anfotericina B, 2 % de penicilina-estreptomicina y 10 µg/mL de gentamicina. Las muestras se transportaron en una cava de icopor a 4°C en un tiempo inferior a 12 horas y fueron procesadas en el Laboratorio de Investigaciones Biomédicas y Biotecnológicas (LIBB) de la Universidad de Santander- UDES.

4.3.1 Confirmación de la ausencia de la infección por *Helicobacter pylori* en biopsias de antro gástrico humano: El aislamiento y purificación del ADN de las biopsias gástricas se realizó empleando un sistema comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, ROCHE) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La presencia de *H. pylori* en las biopsias gástricas se determinó mediante una PCR convencional para la detección del gen de la ureasa alfa (*ureA*) según un protocolo descrito anteriormente (Ramis *et al*, 2002). Se emplearon cebadores UREA Forward (5'-GCCAATGGTAAATTAGTT-3') y UREA Reverse (5'-CTCCTTAATTGTTTTTAC- 3 '), los cuales amplifican un fragmento de 394 pb de dicho gen. Para los ensayos de PCR se empleó el kit OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biotechnology), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se realizó un corrido electroforético en geles de agarosa al 1,5 % de los productos de PCR y fueron visualizados empleando el colorante fluorescente SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific) y el fotodocumentador MiniBis (DNR Bio Imaging Systems). Se utilizó como control positivo ADN de la cepa *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) y como control negativo ADN de la cepa *Escherichia coli* (ATCC 25922).

4.3.2 Aislamiento y cultivo de células epiteliales gástricas a partir de mucosa del antro gástrico humano: Se empleó el procedimiento descrito por Leite & Figueiredo con varias modificaciones (Leite & Figueiredo, 2002). Brevemente, el tejido gástrico tomado de la endoscopia fue lavado tres veces con solución de Hanks estéril suplementada con 5 mg/L anfotericina B y 2% de penicilina-estreptomicina en cajas de petri estériles. Este se maceró mecánicamente en trozos 1 mm³ de tamaño con la ayuda de pinzas y tijeras quirúrgicas en una cabina de flujo laminar tipo A2. Posteriormente, el tejido fue colocado en un frasco de 100 mL con solución de disociación celular que contenía 200 U/mL de collagenasa, 1,2 U/mL de dispasa, 0,01 mg/mL de inhibidor de tripsina de soja, 1,25 mg/mL de albumina (BSA) y 0,1 mM Dithiothreitol (DTT) disueltos en solución de Hanks con calcio y magnesio (volumen final 50 mL). El tejido fue incubado a 37°C en agitación constante con la ayuda de un magneto estéril durante 2 horas para favorecer la disociación enzimática de las células gástricas. Se recolectaron dos fracciones en intervalos de una hora y en cada una se retiró un volumen aproximado de 25 mL. Este último se filtró tres veces con la ayuda de una capa de gasa estéril. La muestra filtrada fue centrifugada a 800 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se examinó en cámara de recuento para la detección de la viabilidad celular mediante el colorante de exclusión azul de tripán utilizando un Microscopio Nikon Eclipse E200. Finalmente, el sedimento celular de cada fracción fue re-suspendido en medio Williams suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado (FBSi), 1% L-glutamina, 25 mM Buffer HEPES, anfotericina B 2,5 mg/L, 1% de penicilina-estreptomicina, 10 µg/mL de gentamicina, 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 4 µg/mL de insulina. La suspensión celular fue sembrada en una placa de 6 pozos con colágeno tipo I y mantenida en condiciones estándar de cultivo a 37°C bajo una atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas, para permitir la adherencia de las células. Cada dos días se realizaron cambios de medio de cultivo y observación de las células utilizando un

microscopio invertido EVOS FL (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, al sexto día el medio de cultivo se redujo a la mitad de la concentración inicial de los mitógenos EGF e insulina. Los ensayos anteriores se hicieron por triplicado.

4.3.3 Confirmación del fenotipo de células epiteliales gástricas humana: Se determinó inicialmente mediante el empleo de tinciones histológicas como la coloración de hematoxilina-eosina y Schiff para la observación de la morfología de célula epitelial y presencia de mucinas neutras, respectivamente. Adicionalmente, se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para la detección del antígeno epitelial de membrana (EMA) y el coctel de citoqueratinas (AE1/AE3). Brevemente, células epiteliales gástricas humanas fueron crecidas durante 24 horas en láminas de vidrio tratadas con colágeno y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Cada lámina se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche con el respectivo anticuerpo monoclonal: AE1/AE3 (MS-348-P, Thermo Scientific) y EMA (MA5-13156, Invitrogen) diluido 1:200. Posteriormente, se agregó el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (31430, Invitrogen) a una dilución de 1:500. El ensayo fue revelado mediante diaminobenzadina (DAB) (D-5673, Sigma). Se empleó como control positivo, la línea celular HeLa (ATCC CCL-2) y como control negativo células mononucleares extraídas de sangre periférica humana. Las muestras fueron analizadas para determinar la positividad de los marcadores en las células epiteliales gástricas respecto a los controles empleando el objetivo de 20X. Se calculó el porcentaje de células positivas a la tinción para cada antígeno contando un total de 100 células. Los anteriores ensayos se hicieron por triplicado.

4.4 Obtención, mantenimiento y confirmación del fenotipo de *Helicobacter pylori* (ATCC 43504).

La cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) fue gentilmente donada por el Grupo Bacterias & Cáncer (categoría B, COL0070457) de la Universidad de Antioquia. La cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) es ampliamente estudiada y posee los factores de virulencia *CagA*⁺ y *VacAs1m1*, los cuales están asociadas con inflamación gástrica severa, ulceración y mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Garcia *et al*, 2006). La bacteria fue mantenida en condiciones microaeróbicas en placas de Agar Brucella de BBL (Becton Dickinson) con suplemento de Dent (oxoid), isovitalex (oxoid) y 7 % sangre de caballo. La identificación del fenotipo bacteriano fue confirmado mediante pruebas microbiológicas clásicas como la tinción de Gram, prueba de catalasa y la prueba de ureasa rápida y pruebas complementarias de biología molecular para la detección del gen de la ureasa alfa según un protocolo descrito anteriormente (Ramis *et al*, 2002).

Adicionalmente, anterior al ensayo de infección, la bacteria fue cultivada en caldo infusión cerebro corazón (BHI) con FBSi al 10% en agitación constante (200 rpm) durante 48 horas a 37°C y en una atmosfera de 10% de CO₂. Posteriormente, la suspensión bacteriana fue colectada y re-suspendida en Buffer fosfato salino pH: 7,2 (PBS). La cuantificación de la población celular se hizo mediante espectrofotometría empleando el lector de placas iMark (Bio Rad) a una longitud de onda de 600 nm. Se utilizó como medida de referencia los hallazgos obtenidos por Kranzer y colaboradores donde, 1,0 densidad óptica determinada a 600 nm equivale a 2.28×10^8 *H. pylori*/mL (Kranzer *et al*, 2005).

4.5 Modelo de Infección de células epiteliales gástricas primarias humanas con *Helicobacter pylori* (ATCC 43504)

Se emplearon células epiteliales gástricas primarias humanas aisladas de antro de donantes sanos y células tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) como control del modelo, con el fin de ser infectadas siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Yo *et al*, 2006). Brevemente, células primarias fueron crecidas en placas de 12 pozos tratadas con colágeno durante 24 horas a una densidad de 1×10^5 células/mL en medio Williams suplementado con mitógenos y sin antimicrobianos. Células tumorales fueron crecidas en placas de 12 pozos durante 24 horas a una densidad de 1×10^5 células/mL empleando medio de cultivo DMEM alto en glucosa suplementado con 10% de FBSi, 1%, L-glutamina y sin antimicrobianos. Anterior a los ensayos de infección, *H. pylori* (ATCC 43504) fue adaptada a los medios de cultivo Williams y DMEM, observándose la conservación de la viabilidad. Se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) bacteria: célula de 100 para células primarias y tumorales. Una vez establecida la monocapa con una confluencia mayor o igual al 80% en los dos tipos de células, se agregó la suspensión de *H. pylori* (ATCC 43504) disuelta en PBS y se mantuvo a 37°C en atmósfera de CO₂ al 10% durante 24, 48, 72 horas y 7 días. Para el último tiempo de incubación, al tercer día se retiró la totalidad del medio y se agregó el respectivo medio de cultivo suplementado sin antimicrobianos, de igual forma para garantizar la infección se adicionó el inóculo de bacteria fresco a un MOI de 100. Se empleó como control interno del ensayo células primarias y tumorales sin infectar en cada tiempo de incubación. Finalmente, posterior a cada incubación, se retiró el sobrenadante para evaluar la viabilidad de la bacteria y las células primarias y tumorales fueron recuperadas mediante el uso de un raspador celular, para la extracción inmediata del ADN empleando un sistema comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, ROCHE) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los anteriores ensayos se hicieron por triplicado.

4.5.1 Determinación viabilidad de *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) en el modelo de Infección: Se utilizó el colorante fluorescente yoduro de propidio (PI) siguiendo un protocolo descrito anteriormente (Johnson & Criss, 2013). PI es impermeable a membranas celulares intactas e ingresa únicamente a células no viables, a través de las membranas no integras, las cuales se observan en el microscopio de fluorescencia de color rojo (Exmax: 493 nm Emmax: 632 nm). La viabilidad de las bacterias se determinó durante cada tiempo de cosecha (24, 48 y 72 horas y 7 días) a través de la recolección del sobrenadante con el fin de garantizar el efecto directo de la bacteria sobre las células. Se utilizó como control positivo bacterias tratadas con isopropanol al 70%, el cual afecta la integridad de la membrana bacteriana. Los ensayos anteriores se hicieron por triplicado.

4.5.2 Extracción de ADN: El ADN de células gástricas primarias y tumorales infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) y sin infectar fue extraído y purificado empleando un sistema comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, ROCHE). Brevemente, las células fueron lisadas empleando un buffer que contiene proteinasa K, para ser cargado en una columna de afinidad que une selectivamente al ADN y permite la eliminación de contaminantes e inhibidores mediante una serie de lavados sucesivos. El ADN finalmente fue eludido en Buffer Tris-EDTA y almacenado a -80 °C hasta su procesamiento.

4.5.3 Determinación del estado de metilación de ADN en células epiteliales gástricas primarias y tumorales infectados con *Helicobacter pylori* (ATCC 43504): Se seleccionaron los GST: *hMLH1*, *CDH1* y *CDKN2A*, los cuales están descritos ampliamente en cáncer gástrico y son inactivados con mayor frecuencia mediante la metilación del promotor (Ushijima & Sasako, 2006). La metilación de los GST se determinó mediante el tratamiento del ADN previamente extraído con bisulfito de sodio, empleando el Kit de conversión EZ DNA Methylation-Direct (Zymo Research) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La PCR metilación específica (MSP-PCR), se realizó en el ADN de células gástricas primarias y tumorales sin infectar e infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504), posterior a la conversión con bisulfito de sodio, usando pares de primers previamente descritos por Yu y colaboradores (ver tabla 3) y condiciones de PCR validadas y optimizadas en la literatura que se alinean selectivamente al ADN metilado y sin metilar (Yu *et al*, 2002). Los primers fueron analizados y validados mediante el uso de herramientas bioinformáticas empleando los softwares online BiSearch (<http://bisearch.enzim.hu/>) y UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>).

Tabla 3.

Primers para PCR metilación específica

Nombre Gen	GeneBank No.	Sense 5'-3'	Antisense 5'-3'	Tamaño (pb)
<i>hMLH1</i> (M)	AB017806	ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC	CCTCATCGTAACTACCCGCG	115
<i>hMLH1</i> (U)		TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT	ACCACCTCATCATAACTACCCACA	124
<i>CDH1</i> (M)	L34545	GTGGGCGGGTCGTTAGTTTC	CTCACAATACTTTACAATTCCGACG	172
<i>CDH1</i> (U)		GGTGGGTGGGTGTTAGTTTGT	AACTCACAATCTTTACAATTCCAAC	172
<i>CDKN2A</i> (M)	NM_000077	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	ACCCCGAACCGCGACCGTAA	150
<i>CDKN2A</i> (U)		TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	CAACCCCAAACCACAACCATAA	151

M: Primers diseñados para detectar metilación; U: Primers diseñados para detectar no metilación

La amplificación se llevó a cabo empleando el kit OneTaq Hot Start Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biotechnology), siguiendo las recomendaciones del fabricante en un termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems). Se utilizó como control positivo de metilación el ADN humano metilado universal (Catalogo: D5011 Zymo Research) y como control negativo de metilación polimorfonucleares extraídos de sangre periférica (PMN). Se empleó como control de metilación adicional la línea celular Hela (ATCC CCL-2), la cual presenta metilación del gen *CDH1* (Yamada *et al* 2009).

Finalmente, se realizó un corrido electroforético en geles de agarosa al 2% de los productos de PCR-MSP y fueron visualizados empleando el colorante fluorescente SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific) empleando el fotodocumentador MiniBis (DNR Bio Imaging Systems). El estado de metilación de los GST se definió como presencia o ausencia del amplificado en un corrido electroforético posterior a PCR-MSP. La aparición de un producto de PCR visible en la reacción que emplea primers diseñados para detectar metilación, indica la presencia del gen metilado. En contraste, la aparición de un producto de PCR en la reacción que utiliza primers diseñados para detectar no metilación indica la presencia del gen no metilado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada gen evaluado.

4.5.4 Determinación del estado global de metilación en células epiteliales gástricas primarias y tumorales infectadas con *Helicobacter pylori* (ATCC 43504): Se realizó empleando el Kit 5-mC DNA ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante (D5325, Zymo Research). Brevemente, 100 ng de ADN genómico previamente extraído fue desnaturalizado a 98°C durante 5 minutos y añadidos a la placa de reacción, para ser incubados con el anticuerpo monoclonal primario anti-5-metilcitosina y el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rabano picante (PHR) durante una hora a 37°C y revelados con el sustrato ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)). Los productos cromogenicos fueron determinados usando el lector de placas iMark (Bio Rad) empleando una longitud de onda de 515 nm. El porcentaje de metilación global de las muestras se cuantifico empleando una regresión logarítmica derivada de la curva estándar generada con la mezcla de los controles de ADN metilado (control positivo) y ADN sin metilar (control negativo) incluidos en el kit.

4.6 Análisis de resultados

Células gástricas primarias y tumorales humanas fueron infectados con la cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) a un MOI de 100 y distintos periodos de incubación para evaluar el estado de metilación de GST. Se determinó el estado de metilación de los GST definido como presencia o ausencia del amplificado en un corrido electroforético posterior a la PCR-MSP. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada gen evaluado. Los datos obtenidos mediante ELISA, fueron descritos utilizando medidas de tendencia central y dispersión como promedio y desviación estándar, respectivamente. Para la comparación entre los grupos de estudio se empleó la prueba de *t de student*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas asociadas a un valor de $p < 0,05$. Se utilizó el Software estadístico R versión 3.3.3.

5. Resultados

5.1 Obtención tejido gástrico

De los cinco tejidos gástricos obtenidos tres no cumplieron los criterios de inclusión, debido a que presentaron gastritis superficial, por lo cual no fueron seleccionados para este estudio. Los dos tejidos restantes se utilizaron para confirmar la ausencia de *H. pylori* y el aislamiento de células epiteliales gástricas.

5.1.1 Confirmación de ausencia de *Helicobacter pylori* en las biopsias gástricas: Las dos biopsias gástricas evaluadas en este estudio, no presentaron la amplificación del gen *ureA*, lo cual fue indicativo de la ausencia de infección por *H. pylori* en estos tejidos (Figura 4). El control positivo utilizando el ADN extraído de la cepa *H. pylori* (ATCC 43504) permitió la amplificación del fragmento esperado de 394 pb aproximadamente.

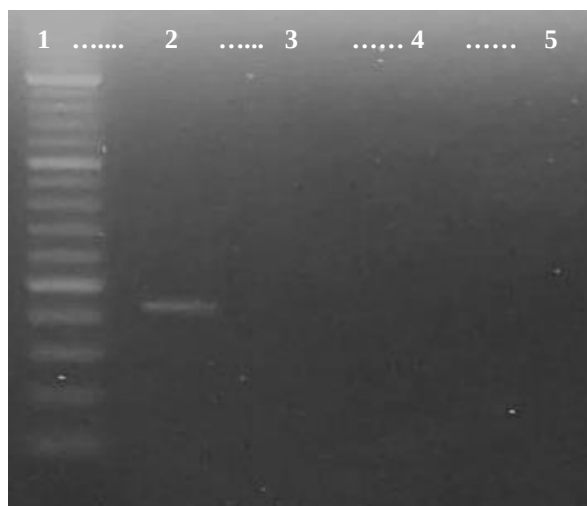


Figura 4. Confirmación de ausencia de *H. pylori* en las biopsias gástricas. **Carril 1:** O'RangeRuler 100pb; **Carril 2:** *H. pylori* (ATCC 43504), **Carril 3:** Muestra Paciente 1; **Carril 4:** Muestra Paciente 2, **Carril 5:** vacío.

5.1.2 Aislamiento y cultivo de células epiteliales gástricas humanas: Las modificaciones al protocolo descrito por Leite & Figueiredo que permitieron el exitoso aislamiento y proliferación de las células primarias gástricas incluyeron: la eliminación del *mucus* natural del tejido a través del uso de capas de gasas estériles, un aumento en la concentración del mitógeno EGF a 10 ng/mL y la inclusión de un agente de amortiguación adicional al medio de cultivo como lo fue el Buffer HEPES ((Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinaetanosulfónico) a una concentración de 25 mM.

El protocolo de aislamiento de células primarias gástricas se realizó en las dos biopsias libres de infección por *H. pylori* anteriormente evaluadas. El protocolo utilizado permitió el aislamiento de células con porcentajes de viabilidad superiores al 97 % durante las dos horas de la cosecha. Para los dos tejidos, se observó el primer día del aislamiento diferentes poblaciones celulares en la placa de cultivo que incluyeron células epiteliales gástricas, hematológicas e inmunológicas (Figura 5).

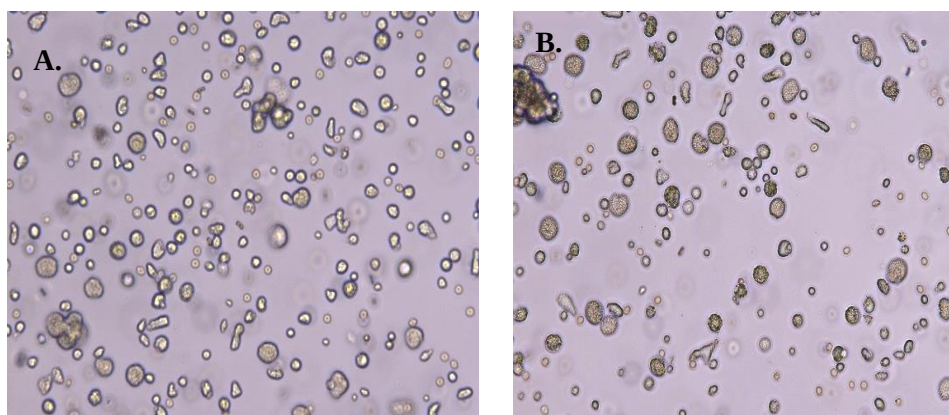


Figura 5. Cultivo primario de células epiteliales gástricas humanas primer día del aislamiento. A: biopsia gástrica 1 y B: biopsia gástrica 2. Obsérvese las diferentes poblaciones de celulares que incluyen células epiteliales gástricas, hematológicas e inmunológicas. Magnificación 10 X

Posterior a tres días de incubación, las células epiteliales gástricas provenientes de la biopsia gástrica del donante 1 presentaron un 20% de confluencia, evidenciado como pequeños cúmulos de células con forma cilíndrica y núcleo prominente, características propias de un fenotipo epitelial gástrico. De igual forma, para este tiempo de incubación, la mayoría de células no adherentes como células hematológicas e inmunitarias fueron eliminadas, debido al recambio de medio (Figura 6). La biopsia gástrica del donante 2, no presentó cúmulos de células adherentes posterior a tres días de incubación (Datos no mostrados).

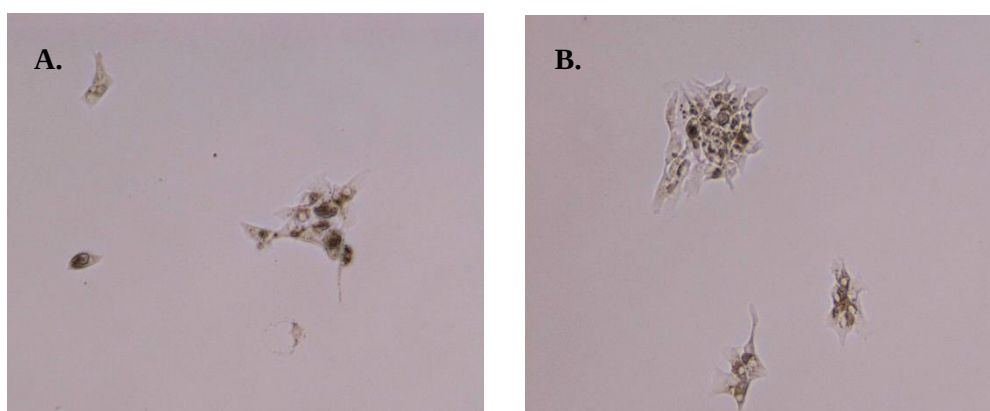


Figura 6. Cultivo primario de células epiteliales gástricas humanas tercer día del aislamiento. A y B: Células epiteliales gástricas humanas. Obsérvese la ausencia de moco y contaminación. Magnificación 10 X

Asimismo, la biopsia gástrica del donante 1 presentó un 100% de confluencia posterior a doce días de incubación, evidenciado por la formación de monocapa. Para este tiempo de incubación, se observó de una manera más clara la morfología epitelial de las células primarias, que incluyó células planas con forma cilíndrica y núcleo prominente (Figura 7). La biopsia gástrica del donante 2 no presentó células adherentes proliferantes transcurrido doce días de incubación, por lo cual este aislamiento no fue exitoso (Datos no mostrados). Finalmente, las células primarias aisladas del donante 1 presentaron un tiempo de supervivencia de hasta un mes y medio en condiciones estándar de cultivo.

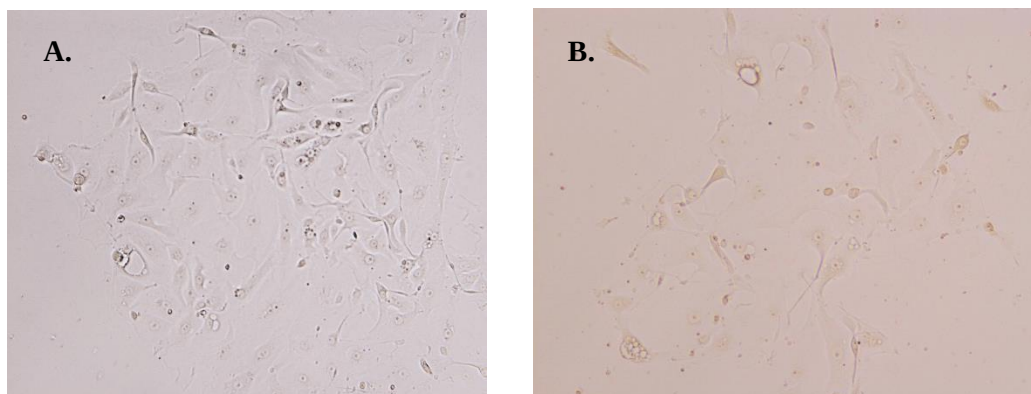


Figura 7. Cultivo primario de células epiteliales gástricas humanas veinteavo día del aislamiento. A y B: Células epiteliales gástricas humanas. Obsérvese la formación de monocapa, la ausencia de moco y contaminación. Magnificación 10 X

5.1.3 Confirmación del fenotipo de células epiteliales gástricas humanas:

Las células epiteliales gástricas humanas aisladas de la biopsia del donante 1 fueron utilizadas para determinar el fenotipo epitelial y gástrico. Las células teñidas mediante la coloración de hematoxilina-eosina, presentaron una morfología epitelial observada como células planas con forma cilíndrica y núcleo prominente. Además, la coloración de Schiff evidenció la presencia de mucinas neutras en todas las células epiteliales, observadas como zonas citoplasmáticas rojizas características de estas células gástricas secretoras de *mucus*. Por otra parte, la técnica de inmunohistoquímica, permitió la detección en un 80% de positividad para el marcador EMA, el cual está presente en la mayoría de células epiteliales y un 40% de positividad para el marcador AE1/AE3, el cual detecta la mayoría de las citoqueratinas humanas y es indicativo de origen epitelial celular (Figura 8).

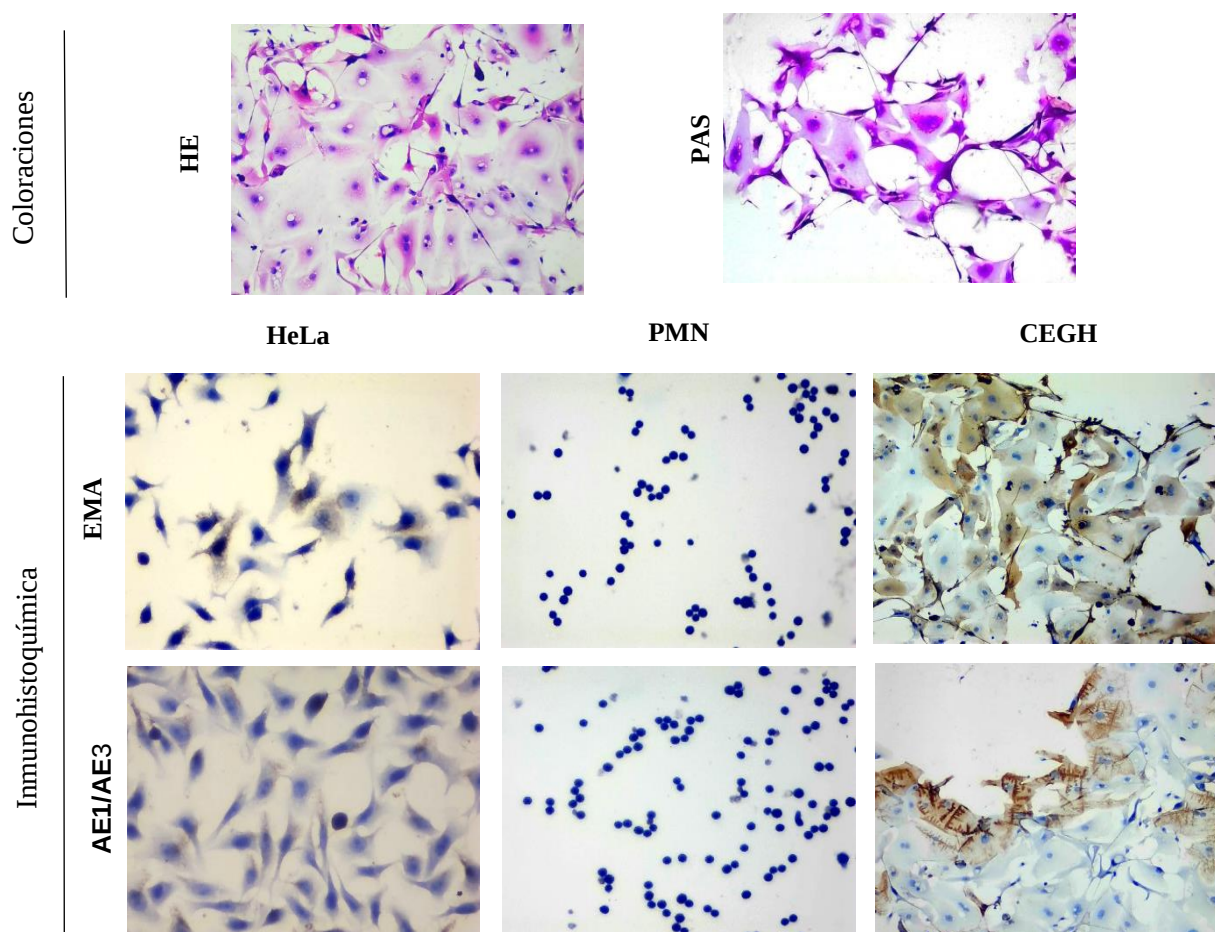


Figura 8. Confirmación del fenotipo de células epiteliales gástricas humanas mediante HE:Coloración hematoxilina-eosina, PAS: Coloración de Schiff, EMA: Inmunohistoquímica antígeno epitelial de membrana, AE1/AE3: Inmunohistoquímica Cóctel de citoqueratinas. HeLa: Línea celular epitelial derivada de cáncer de cuello uterino humano (control positivo), PMN: mononucleares extraídas de sangre periférica humana (control negativo) y CEGH: células epiteliales gástricas humanas. Magnificación 20 X

5.2 Confirmación del fenotipo de *Helicobacter pylori* (ATCC 43504)

La cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) fue crecida en agar Brucella con suplemento de Dent, isovitalex y 7 % sangre de caballo a una temperatura de 37°C y una atmosfera de 10% de CO₂; posterior a tres días de incubación, se observó el crecimiento en agar de colonias con características morfológicas de típicas de *H. pylori* que incluyeron, colonias pequeñas de 2 mm de diámetro con forma circular y convexa; estas colonias fueron examinadas microscópicamente

posterior a la tinción de Gram, observándose bacilos Gram negativos delgados con forma alargada compatibles con la morfología esperada para esta bacteria. Las pruebas bioquímicas complementarias como el test de catalasa y la prueba de ureasa rapida, confirmaron el fenotipo de esta bacteria debido a la positividad en estas determinaciones (Figura 9).

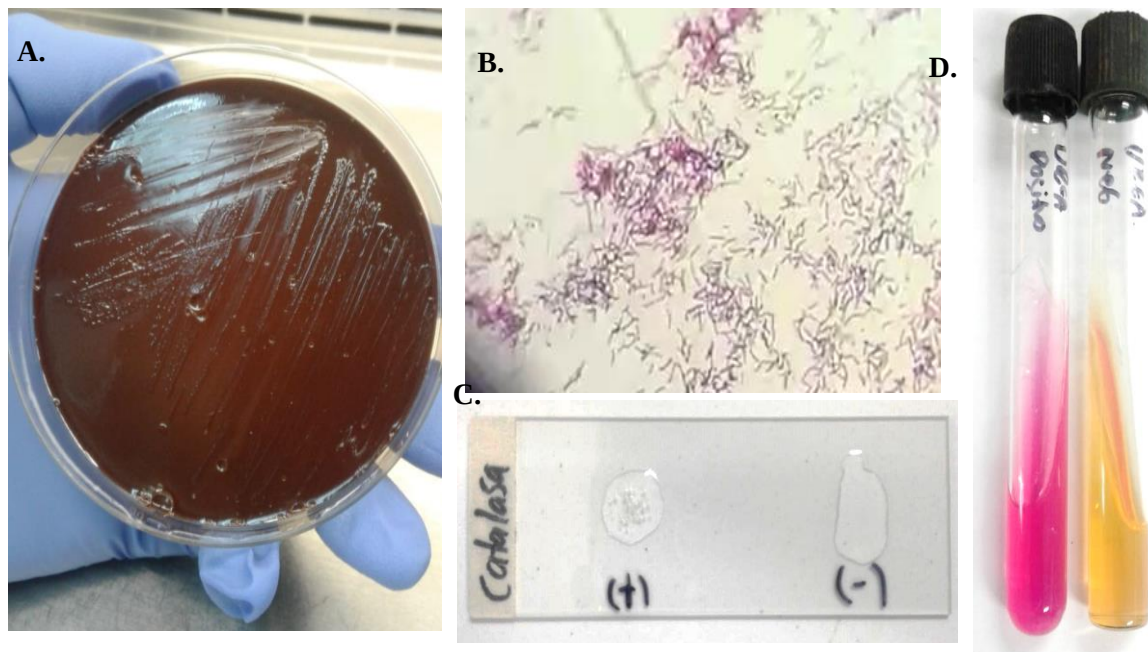


Figura 9. Pruebas confirmatorias para la identificación de *H. pylori* (ATCC 43504). A) Crecimiento en agar Brucella suplementado (Dent, isovitalex y 7 % sangre de caballo), B) Tinción de Gram, C) test de catalasa y D) Prueba de ureasa rapida.

Los hallazgos anteriores fueron confirmados mediante la detección del gen de la Ureasa Alfa, donde se amplificó de un fragmento de 394 pb para *H. pylori* (ATCC 43504). Además, la cepa control de *E. coli* (ATCC 25922), no evidencio amplificación del gen de interés (Figura 10).

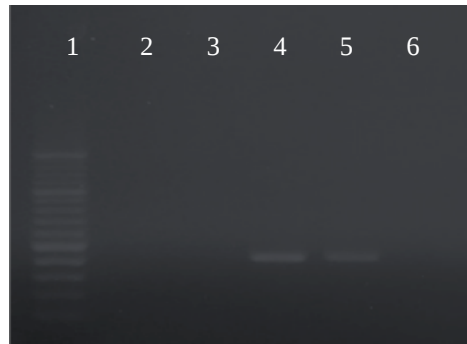


Figura 10. Detección del gen de la Ureasa Alfa en *H. pylori* (ATCC 43504). **Carril 1:** O'RangeRuler 100pb; **Carril 2:** vacío; **Carril 3:** *E. coli* (ATCC 25922), **Carril 4 y 5:** *H. pylori* (ATCC 43504), **Carril 6:** vacío.

5.3 Determinación viabilidad de *Helicobacter pylori* (ATCC 43504)

La cepa de *H. pylori* (ATCC 43504) mantenida en cultivo presentó una viabilidad del 100%, evidenciado como la ausencia de fluorescencia. El control positivo del ensayo empleando bacterias tratadas con isopropanol al 70% presentó una fuerte fluorescencia roja desencadenada por la pérdida de viabilidad de las bacterias tratadas (Figura 11).

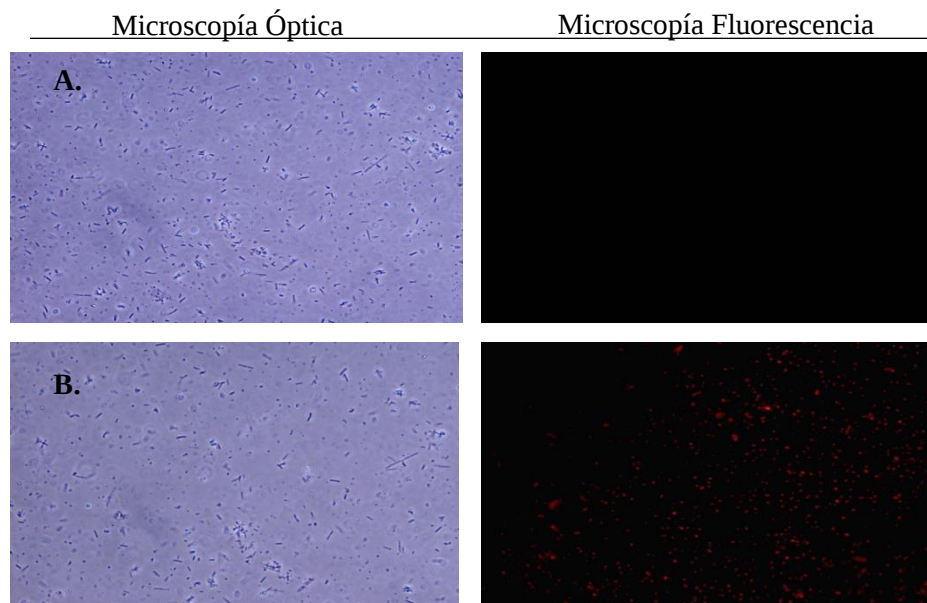


Figura 11. Determinación de la viabilidad de *H. pylori* (ATCC 43504): A). Bacterias en cultivo sin tratar B). Bacterias en cultivo tratadas con isopropanol al 70% (Control Positivo). Magnificación 20X

5.4 Modelo de infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales humanas con *Helicobacter pylori* (ATCC 43504)

En cada tiempo de incubación, se observó el fuerte tropismo que tiene *H. pylori* sobre las células gástricas primarias y tumorales, evidenciado por la adhesión y recubrimiento de la superficie de las células gástricas (Figura 12).

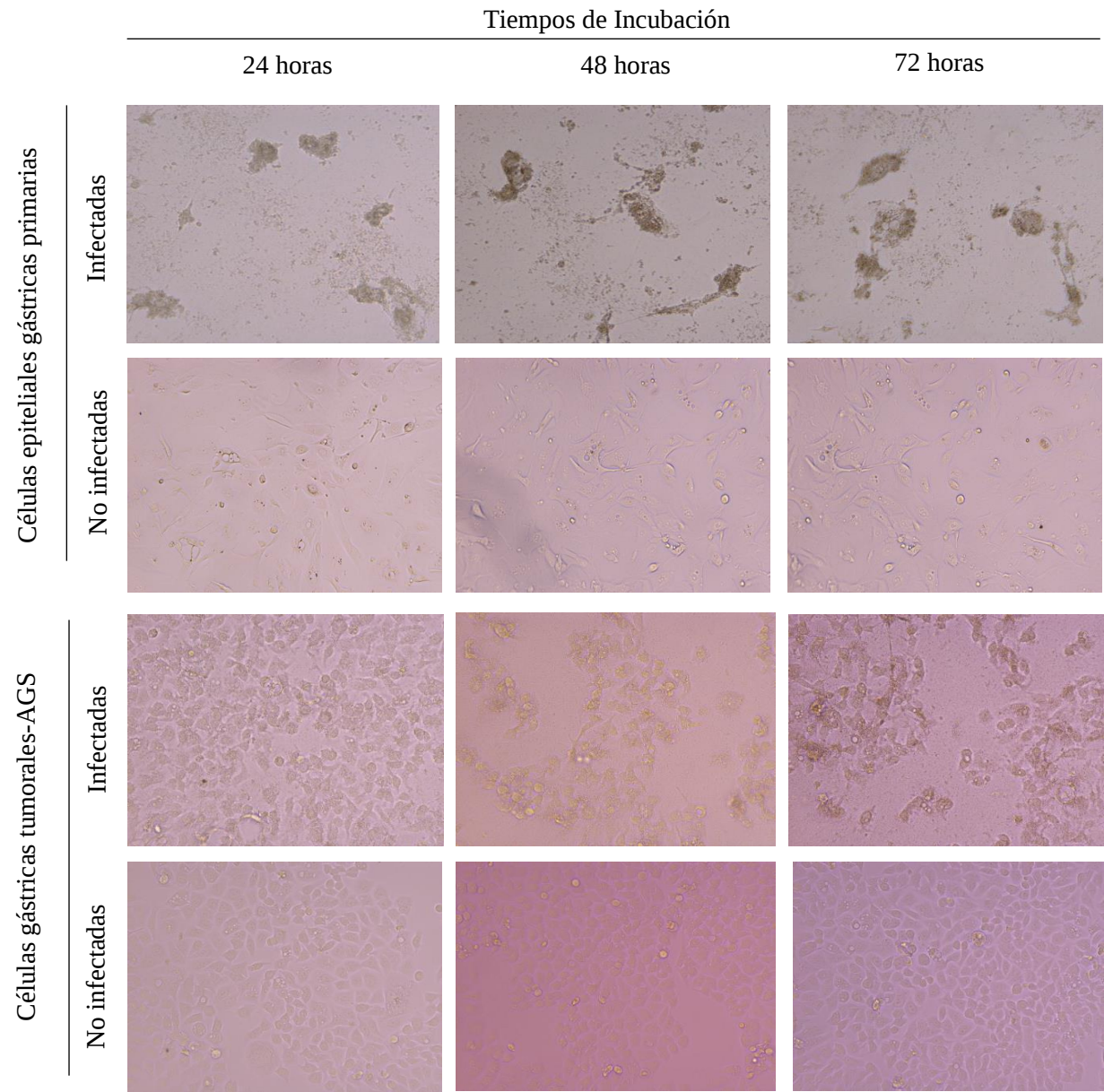


Figura 12. Infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales humanas con *H. pylori* (ATCC 43504). Obsérvese la fuerte adhesión y recubrimiento de la bacteria sobre las células gástricas. Magnificación 20 X

5.4.1 Viabilidad de *Helicobacter pylori* (ATCC 43504) en el modelo de infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales humanas: Se observó para todos los tiempos de incubación evaluados que la viabilidad de la bacteria se conservó, lo cual garantizó el contacto estrecho entre las bacterias y células (Figura 13). Así mismo, durante el transcurso del ensayo, las células primarias y tumorales infectadas se mantuvieron adheridas, lo cual facilitó la extracción del ADN.

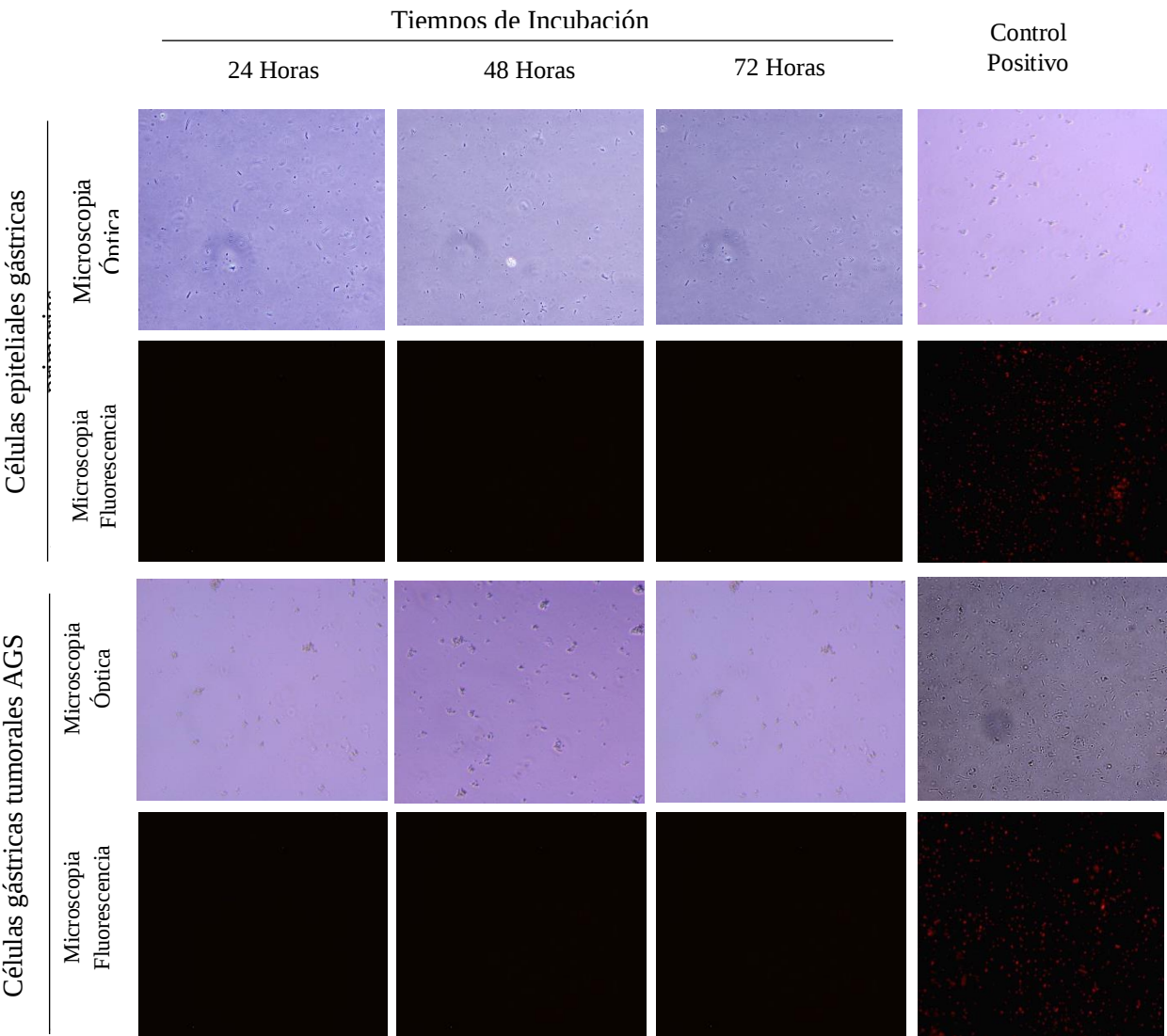


Figura 13. Determinación de viabilidad de *H. pylori* (ATCC 43504) durante la infección de células primarias y tumorales gástricas humanas. Obsérvese la ausencia de fluorescencia en los diferentes tiempos indicativo de viabilidad. Magnificación 20X.

5.4.2 Determinación del estado de metilación de ADN en células epiteliales gástricas primarias infectados con *H. pylori* (ATCC 43504): En este estudio se evaluó el estado de metilación de tres GST: *hMLH1*, *CDH1* y *CDKN2A*, los cuales están descritos ampliamente en cáncer gástrico (Ushijima & Sasako, 2004). El estado de metilación de los GST se determinó mediante el tratamiento del ADN con bisulfito de sodio seguido de una PCR-MSP y la visualización de los productos mediante un corrido electroforético.

Los primers reportados en la literatura fueron analizados mediante herramientas bioinformáticas empleando los softwares online *BiSearch* y *UCSC Genome Browser*. El software *BiSearch* se usó para la validación de primers y la realización de una PCR *in silico*. Los primers evaluados evidenciaron excelentes características en su diseño, debido a que presentaron uniones menores a 3000 y productos de PCR específicos en una sola cadena de ADN. Así mismo, el software *UCSC Genome Browser* permitió evidenciar que los primers flanqueaban los promotores de cada gen y permitían la amplificación de varios dinucleótidos CpG contenidos en las islas CpG (ver tabla 4).

Tabla 4.

Herramientas bioinformáticas empleadas para evaluar los primers.

Gen	BiSearch				UCSC Genome Browser		
	Cadena sentido		Cadena Antisentido		Promotor	Localización Isla CpG	N° CpG
	Uniones	Producto PCR	Uniones	Producto PCR			
<i>hMLH1</i> (M)	15	SI	15	NO	SI	SI	19
<i>hMLH1</i> (U)	2423	SI	2490	NO			
<i>CDH1</i> (M)	16	SI	19	NO	SI	SI	10
<i>CDH1</i> (U)	790	SI	797	NO			
<i>CDKN2A</i> (M)	3	SI	3	NO	SI	SI	18
<i>CDKN2A</i> (U)	167	SI	167	NO			

M: Primers diseñados para detectar metilación; U: Primers diseñados para detectar no metilación

Posteriormente, se realizó una validación de metilación empleando el control positivo suministrado por el fabricante (Catalogo: D5011 Zymo Research), el cual es un ADN humano metilado enzimáticamente por M.SssI metiltransferasa 1 en todas la posiciones de citosina que comprenden dinucleótidos CpG. Los primers diseñados para detectar metilación de los GST: *hMLH1*, *CDKN2A* y *CDH1*, presentaron el amplicón esperado de 115, 150 y 172 pb, respectivamente. Los primers utilizados para detectar no metilación no presentaron amplificación. Así mismo, los primers comerciales incluidos en el kit para la detección de la metilación del gen *hMLH1* presentaron la amplificación esperada de un fragmento de 182 pb. Por lo anterior, los primers empleados en este estudio fueron específicos para detectar la metilación en los promotores de los GST (Figura 14).

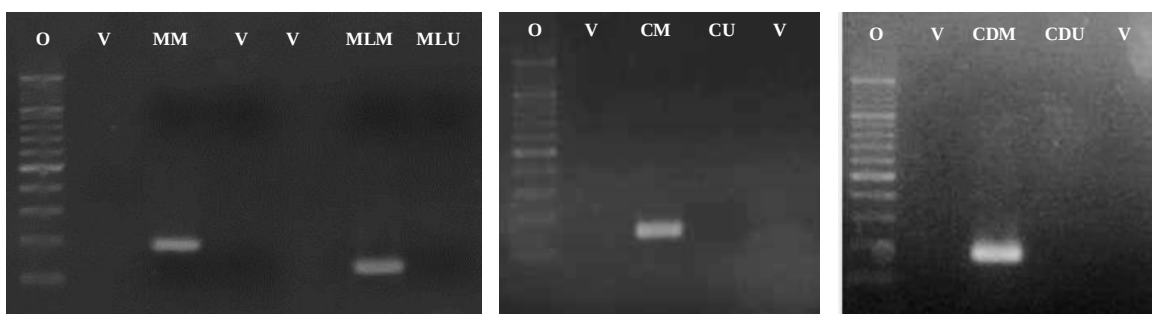


Figura 14. Validación primers empleando el control positivo de metilación (ADN humano metilado). **O:** O'RangeRuler 100pb **MM:** Primers *hMLH1* Comerciales Zymo Research; **MLM:** Primers *hMLH1* metilado; **MLU:** Primers *hMLH1* No metilado; **CM:** Primers *CDKN2A* metilado; **CU:** Primers *CDKN2A* No metilado; **CDM:** Primers *CDH1* metilado; **CDU:** Primers *CDH1* No metilado y **V:** Carril vacío.

Adicionalmente, se realizó una validación de no metilación utilizando PMN. Los primers diseñados para detectar no metilación de los GST: *hMLH1*, *CDKN2A* y *CDH1*, presentaron el amplicón esperado de 124, 151 y 172 pb, respectivamente. Los primers utilizados para detectar no metilación no presentaron amplificación. Por lo anterior, los primers empleados en este

estudio fueron específicos para detectar un estado de no metilación en los promotores de los GST (Figura 15).

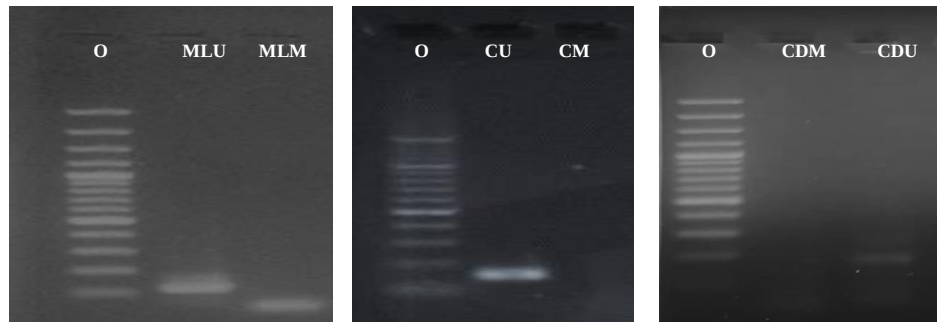


Figura 15. Validación primers empleando polimorfonucleares de sangre periferica. **O:** O'RangeRuler 100pb **MLM:** Primers *hMLH1* metilado; **MLU:** Primers *hMLH1* No metilado; **CM:** Primers *CDKN2A* metilado; **CU:** Primers *CDKN2A* No metilado; **CDM:** Primers *CDH1* metilado; **CDU:** Primers *CDH1* No metilado y **V:** Carril vacío.

Respecto al estado de metilación de ADN en células epiteliales gástricas primarias infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), se observó que el gen *hMLH1* no presentó metilación en los tiempos de incubación evaluados a las 24, 48 y 72 horas, evidenciado por la amplificación de un fragmento de 124 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar no metilación y la no amplificación de un producto cuando se usaron los primers diseñados para detectar metilación. Adicionalmente, el control de no metilación utilizando PMN presentó la amplificación esperada (Figura 16).

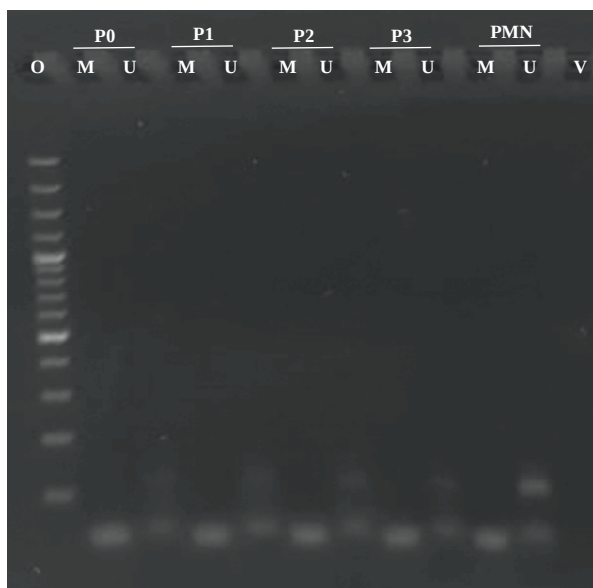


Figura 16. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *hMLH1* en células epiteliales gástricas primarias humanas infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504). La aparición de un producto de PCR visible en el carril **U** indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril **M** indica la presencia del gen metilado. **O:** O'RangeRuler 100pb; **P0:** Gastrocitos primarios control no infectado; **P1:** Infección gastrocitos primarios 24 horas; **P2:** Infección gastrocitos primarios 48 horas; **P3:** Infección gastrocitos primarios 72 horas; **PMN:** Polimorfonucleares de sangre periférica; **V:** Carril vacío.

El gen *CDH1* presentó un fenómeno similar a lo evidenciado anteriormente, debido a que las células epiteliales gástricas primarias infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron metilación en este gen para los tiempos de incubación evaluados a las 24, 48 y 72 horas, evidenciado por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 172 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar no metilación y la no amplificación de un producto cuando se emplearon primers diseñados para detectar metilación. Adicionalmente, la línea celular HeLa y los PMN evidenciaron la amplificación esperada (Figura 17).

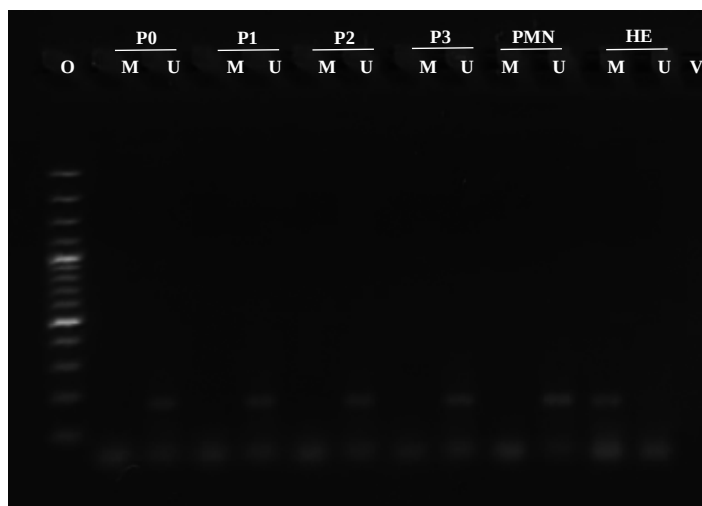


Figura 17. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *CDH1* en células epiteliales gástricas primarias humanas infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504). La aparición de un producto de PCR visible en el carril U indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril M indica la presencia del gen metilado. **O:** O'RangeRuler 100pb; **P0:** Gastrocitos primarios controles no infectados; **P1:** Infección gastrocitos primarios 24 horas; **P2:** Infección gastrocitos primarios 48 horas; **P3:** Infección gastrocitos primarios 72 horas; **PMN:** Polimorfonucleares de sangre periférica; **HE:** Células Hela; **V:** Carril vacío.

Finalmente, las células epiteliales gástricas primarias infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), presentaron hemimetilación en el gen *CDKN2A* para todos los tiempos de incubación evaluados, a las 24, 48 y 72 horas, evidenciado por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 150 pb y 151 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar metilación y no metilación respectivamente. Cabe destacar que este fenómeno de hemimetilación observado no se puede atribuir a un efecto directo de la bacteria, debido a que las células primarias control presentan este estado de metilación basal. Adicionalmente, el control el control de no metilación de PMN presentó la amplificación esperada (Figura 18).

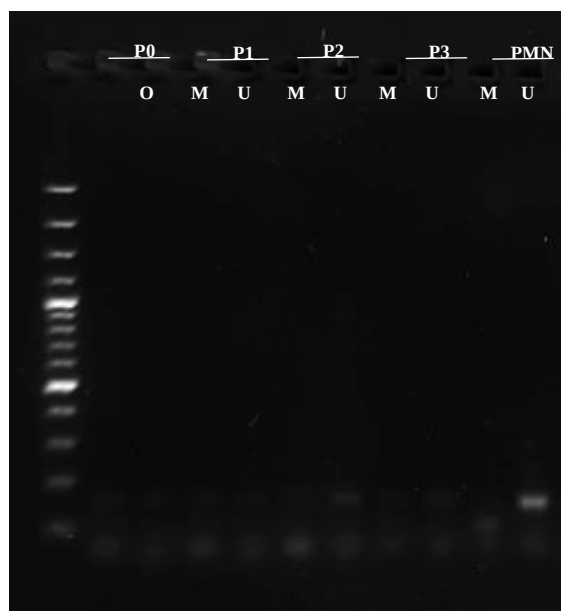


Figura 18. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *CDKN2A* en células epiteliales gástricas primarias humanas infectados con *H. pylori* (ATCC 43504). La aparición de un producto de PCR visible en el carril **U** indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril **M** indica la presencia del gen metilado. **O**: O'RangeRuler 100pb; **P0**: Gastrocitos primarios controles no infectados; **P1**: Infección gastrocitos primarios 24 horas; **P2**: Infección gastrocitos primarios 48 horas; **P3**: Infección gastrocitos primarios 72 horas; **PMN**: Polimorfonucleares de sangre periférica.

Por otra parte, el estado de metilación de los tres GST: *hMLH1*, *CDH1* y *CDKN2A* fueron evaluados en la línea tumoral gástrica AGS como control, debido a que estos genes no han sido descritos en modelos *in vitro* de infección con *H. pylori* sobre esta línea tumoral (tabla 2). Inicialmente, se observó que las células tumorales gástricas AGS infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron metilación en el gen *hMLH1* para los tiempos de incubación a las 24, 48 y 72 horas evidenciado por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 124 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar no metilación y la no amplificación de un producto cuando se emplearon primers diseñados para detectar metilación. Adicionalmente, el control el control de no metilación de PMN presentó la amplificación esperada (Figura 19).

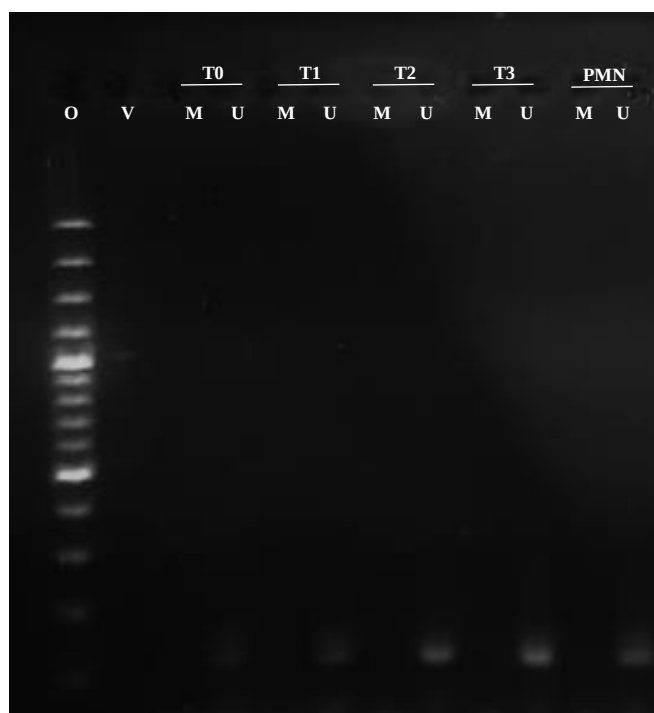


Figura 19. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *hMLH1* en células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504). La aparición de un producto de PCR visible en el carril U indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril M indica la presencia del gen metilado. **O:** O'RangeRuler 100pb; **T0:** AGS control no infectados; **T1:** Infección AGS 24 horas; **T2:** Infección AGS 48 horas; **T3:** Infección AGS 72 horas; **PMN:** Polimorfonucleares de sangre periférica; **V:** Carril vacío.

El gen *CDH1* presentó un fenómeno similar a lo evidenciado anteriormente, debido a que las células tumorales gástricas AGS (infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron metilación en este gen para los tiempos de incubación a las 24, 48 y 72 horas evaluados evidenciado, por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 172 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar no metilación y la no amplificación de un producto cuando se emplearon primers diseñados para detectar metilación. Adicionalmente, la línea celular Hela y PMN presentó la amplificación esperada (Figura 20).

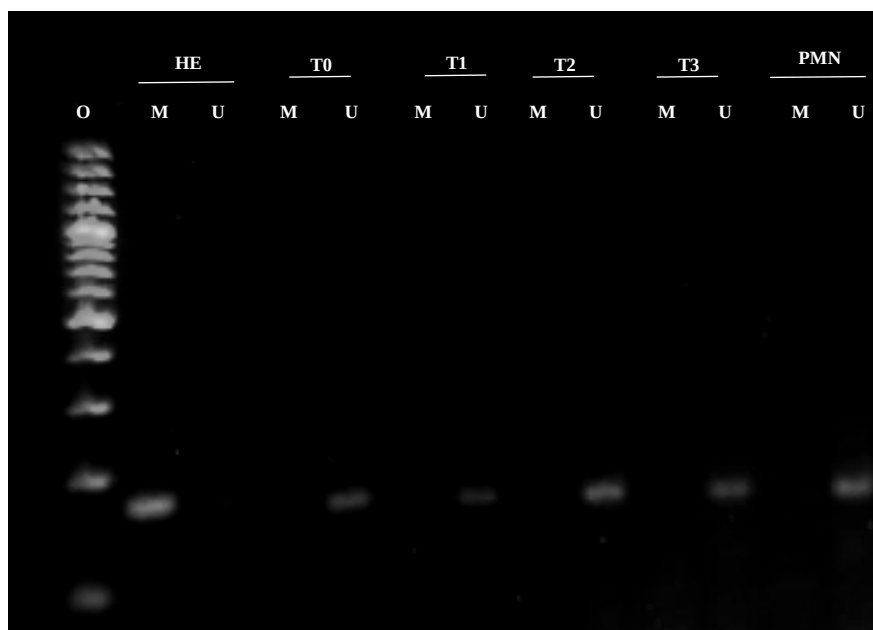


Figura 20. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *CDH1* en células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504). La aparición de un producto de PCR visible en el carril U indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril M indica la presencia del gen metilado O: O'RangeRuler 100pb; T0: AGS control no infectados; T1: Infección AGS 24 horas; T2: Infección AGS 48 horas; T3: Infección AGS 72 horas; HE: Células Hela; PMN: Polimorfonucleares de sangre periférica.

Finalmente, se observó que las células tumorales gástricas AGS infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), presentaron hemimetilación en el gen *CDKN2A* para los tiempos de incubación a las 24, 48 y 72 horas, evidenciado por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 150 pb y 151 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar metilación y no metilación respectivamente. Cabe destacar que al igual que en las células gástricas primarias este fenómeno de hemimetilación observado no se puede atribuir a un efecto de la bacteria, debido a que las células tumorales control presentan este estado de metilación basal. (Figura 21).

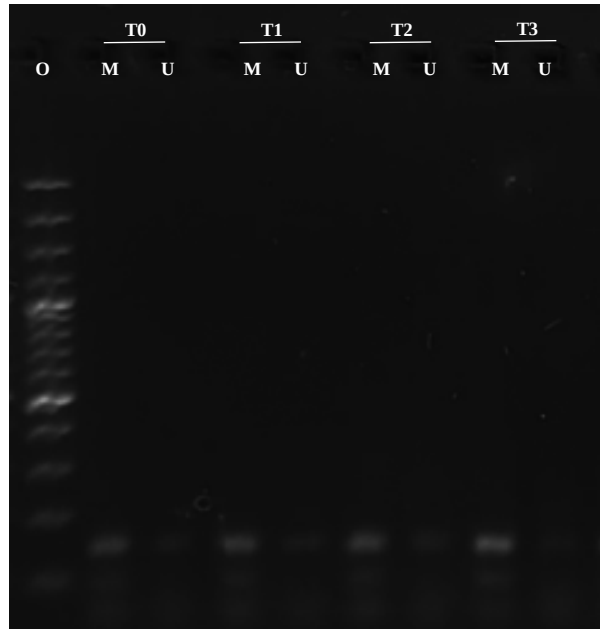


Figura 21. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *CDKN2A* en células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504). La aparición de un producto de PCR visible en el carril U indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril M indica la presencia del gen metilado; **O:** O'RangeRuler 100pb; **T0:** AGS control no infectados; **T1:** Infección AGS 24 horas; **T2:** Infección AGS 48 horas; **T3:** Infección AGS 72 horas.

5.4.3 Confirmación del estado de metilación de ADN en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectados con *H. pylori* (ATCC 43504): En la literatura los modelos *in vitro* de infección, usualmente emplean periodos de incubación de hasta 72 horas (Yo *et al*, 2006; Bussière *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2016). No obstante, debido a que en los tiempos de incubación evaluados no se observó la metilación de los GST en las células primarias y tumorales gástricas, se procedió a extender el tiempo hasta un máximo de siete días para cada célula. En esta aproximación, se garantizó las variables inherentes al ensayo, para ello, en el tercer día de incubación se retiró la totalidad del medio y se agregó medio de cultivo suplementado sin antimicrobianos e inóculo fresco de la bacteria a un MOI de 100 para garantizar el contacto estrecho entre células y bacterias. Posterior al séptimo día de incubación, las células primarias y tumorales gástricas aún se encontraban adheridas (Figura 22). Así mismo, posterior a su disociación mecánica las células primarias y tumorales presentaban porcentajes de viabilidad superiores al 80 % determinado mediante el colorante de exclusión azul de tripan (Datos no mostrados).

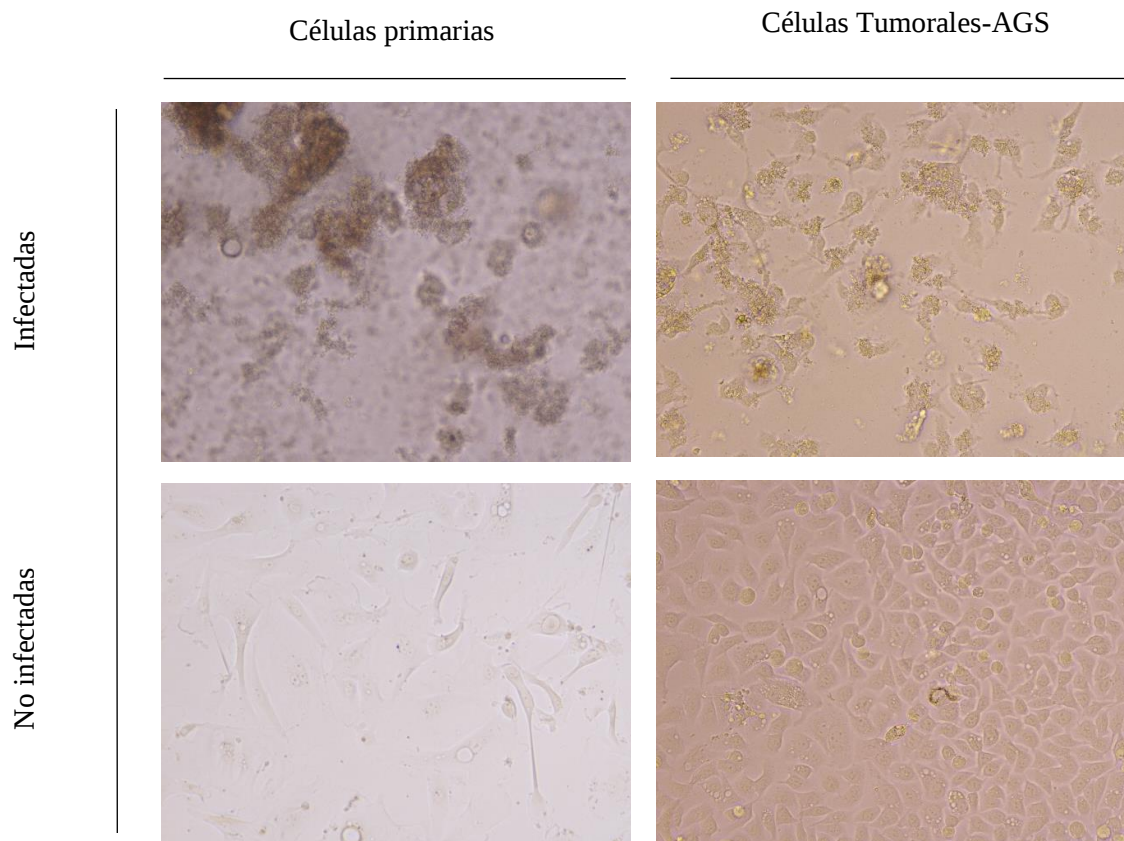


Figura 22. Infección de células epiteliales gástricas primarias y tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) humanas con *H. pylori* (ATCC 43504) durante siete días: Magnificación 20 X

Por otra parte, para este tiempo de incubación se observó que la viabilidad de *H. pylori* (ATCC 43504) determinada mediante IP se conservó, lo cual garantizó el contacto estrecho entre las bacterias y células (Figura 23).

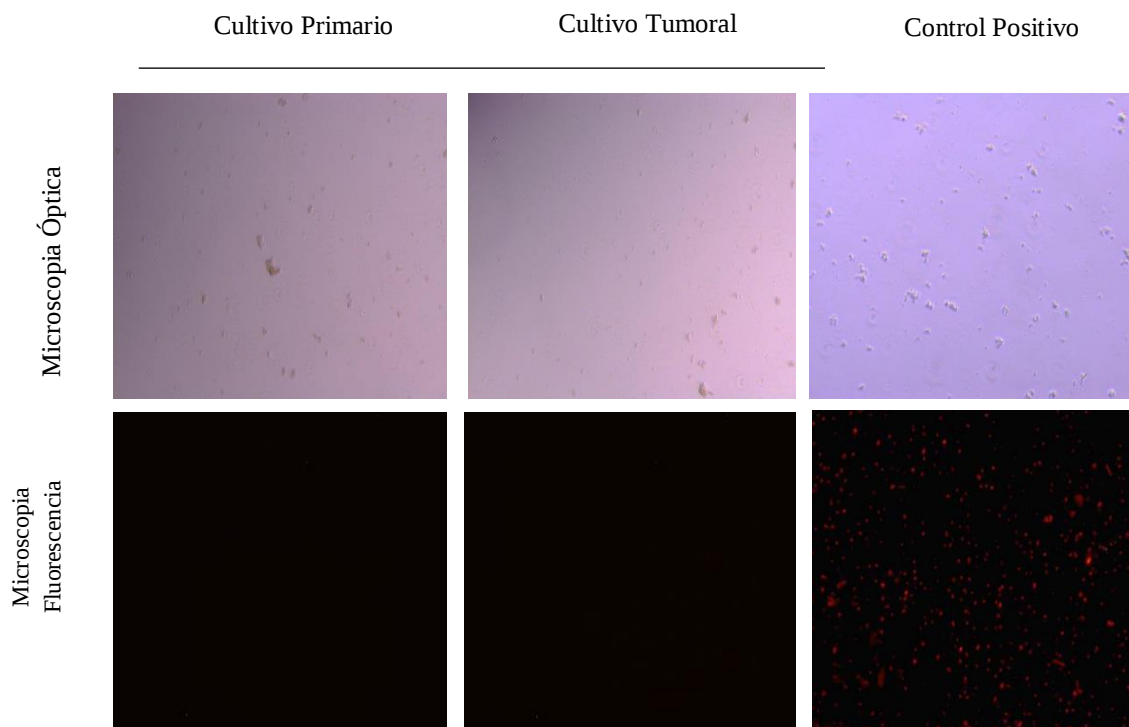


Figura 23. Determinación de viabilidad de *H. pylori* (ATCC 43504) durante la infección de células primarias y tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) durante siete días. Obsérvese la ausencia de fluorescencia en el periodo de incubación indicativo de viabilidad bacteriana. Magnificación 20X.

Al evaluar el estado de metilación de los GST, se observó que las células primarias y las células tumorales gástricas AGS infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron metilación en el gen *hMLH1* en el tiempo de incubación de siete días evidenciado por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 124 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar no metilación y la no amplificación de un producto cuando se emplearon primers diseñados para detectar metilación. Adicionalmente, el control de no metilación empleando PMN presentó la amplificación esperada (Figura 24).

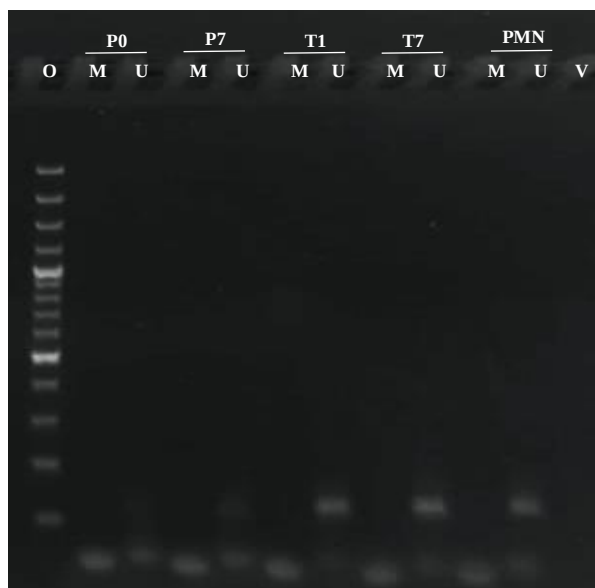


Figura 24. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *hMLH1* en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) durante siete días. La aparición de un producto de PCR visible en el carril **U** indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril **M** indica la presencia del gen metilado. **O**: O'RangeRuler 100pb; **P0**: Gastrocitos primarios controles no infectados; **P7**: Infección gastrocitos primarios 7 días; **T1**: AGS control no infectados; **T7**: Infección AGS 7 días; **PMN**: Polimorfonucleares de sangre periférica; **V**: Carril vacío.

El gen *CDH1* presentó un fenómeno similar a lo evidenciado anteriormente, debido a observó que las células primarias y las células tumorales gástricas AGS infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron metilación en este gen en el tiempo de incubación de siete días, evidenciado por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 172 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar no metilación y la no amplificación de un producto cuando se emplearon primers diseñados para detectar metilación. Adicionalmente, la línea celular Hela y PMN presentó la amplificación esperada (Figura 25).

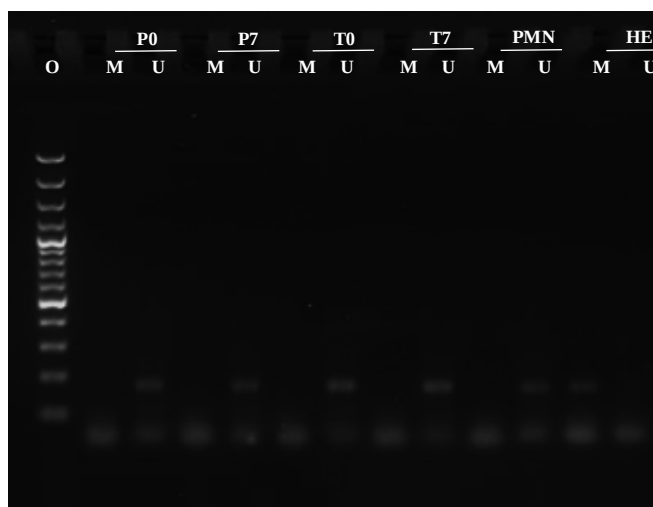


Figura 25. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *CDH1* en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) durante siete días. La aparición de un producto de PCR visible en el carril **U** indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril **M** indica la presencia del gen metilado **O**: O'RangeRuler 100pb; **P0**: Gastrocitos primarios control no infectados; **P7**: Infección gastrocitos primarios 7 días; **T0**: AGS control no infectados; **T7**: Infección AGS 7 días; **PMN**: Polimorfonucleares de sangre periférica; **HE**: Células Hela.

Finalmente, se observó que las células epiteliales primarias y las células tumorales gástricas AGS infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), presentaron hemimetilación en el gen *CDKN2A* para el tiempo de incubación de siete días, evidenciado por la amplificación de un fragmento de aproximadamente de 150 pb y 151 pb cuando se usaron los primers diseñados para detectar metilación y no metilación respectivamente. Al igual que en los periodos de incubación anteriores, este fenómeno de hemimetilación observado no se puede atribuir a un efecto de la bacteria, debido a que las células primarias y tumorales control presentan este estado de metilación basal (Figura 26).

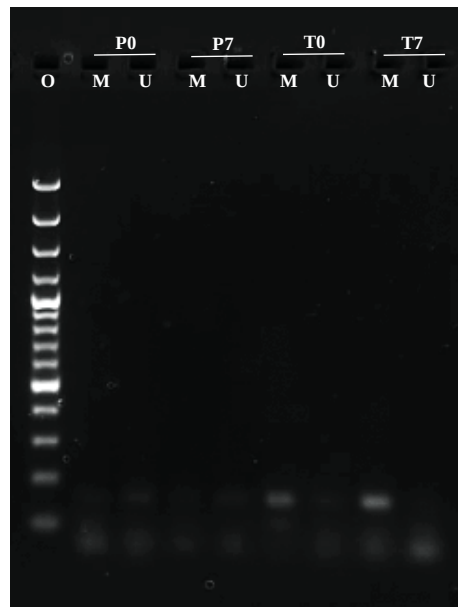


Figura 26. Análisis PCR-MSP de la región promotora del gen *CDKN2A* en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) durante siete días. La aparición de un producto de PCR visible en el carril **U** indica la presencia del gen no metilado; la aparición de un producto de PCR en el carril **M** indica la presencia del gen metilado. **P0**: Gastrocitos primarios controles no infectados; **P7**: Infección gastrocitos primarios 7 días; **T0**: AGS control no infectados; **T7**: Infección AGS 7 días.

5.4.4 Determinación del estado global de metilación en cultivo primarios y tumorales gástricos humanos : El estado de metilación global de las células gástricas primarias y tumorales sin infectar e infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) a un MOI 100, se realizó empleando el Kit 5-mC DNA ELISA de acuerdo con el protocolo del fabricante (Zymo Research). La curva estándar generada con los controles comerciales, presentó un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9826 a partir de la regresión logarítmica, lo cual permitió determinar el estado de metilación de las células primarias y tumorales (Figura 27 A). Los porcentajes de metilación determinados en las células primarias y tumorales fueron sometidos a la prueba de *Shapiro–Wilk*, evidenciando una distribución normal. Por tanto, para la comparación entre grupos se aplicó la prueba paramétrica de *t de student*. Los porcentajes de metilación global de las células primarias sin infectar e infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) en los distintos tiempos de incubación evaluados no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.630$). Así mismo, la línea tumoral AGS no presentó diferencias estadísticamente significativas en el estado global de metilación en células infectadas y no infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) en los distintos tiempos de incubación evaluados ($p = 0.610$) (Figura 27 B).

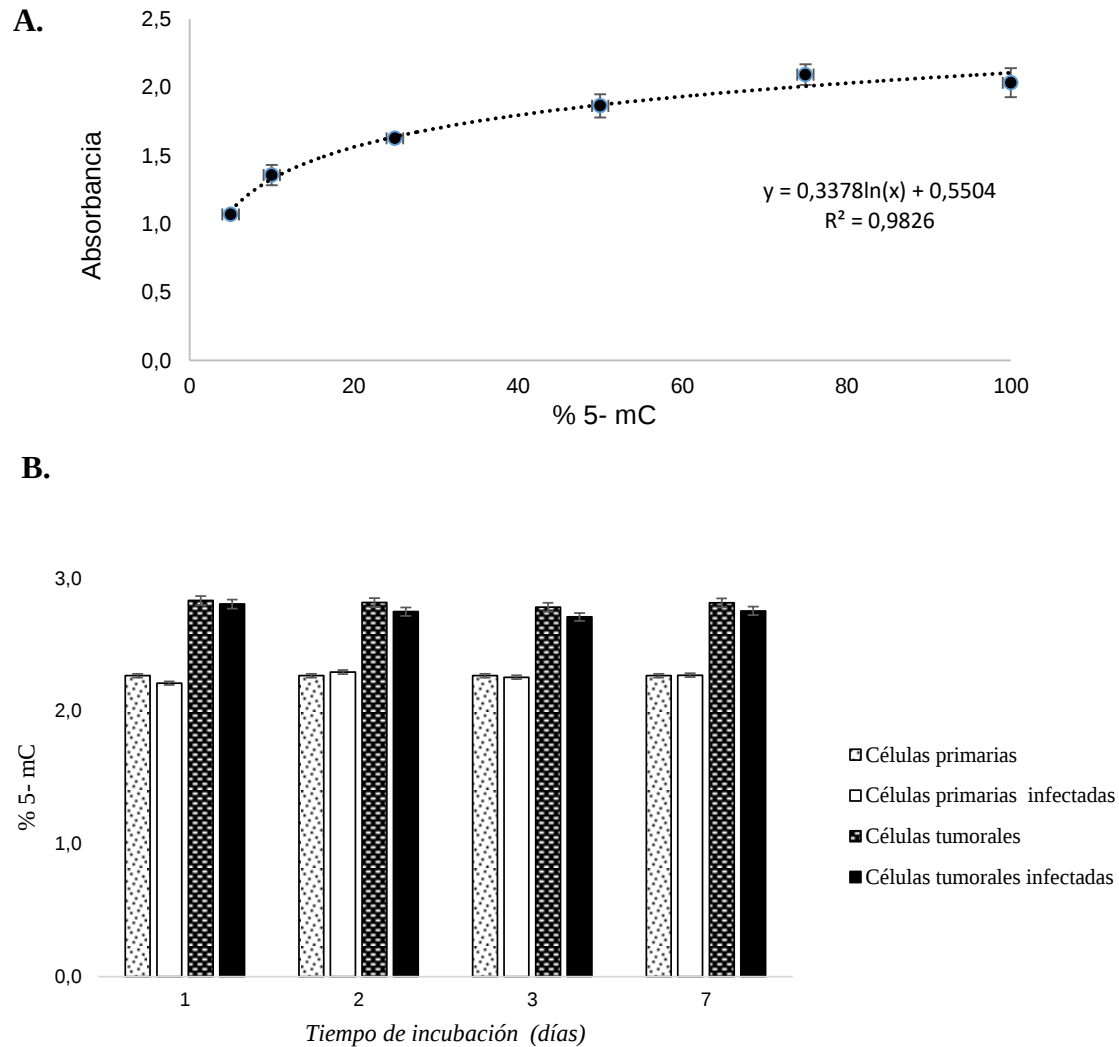


Figura 27. Determinación del estado global de metilación en células epiteliales gástricas primarias y células tumorales gástricas humanas AGS (ATCC CRL-1739) infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504). A. Curva estándar generada con los controles comerciales a partir de la regresión logarítmica; B. Porcentaje de metilación global de las células primarias y tumorales infectadas y no infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504).

6. Discusión

Las alteraciones epigenéticas inducidas por microorganismos patógenos se han convertido en un área de investigación activa en los últimos años, debido a que pueden ocasionar una hipermetilación de promotores de múltiples genes celulares clave, involucrados en la progresión del ciclo celular, senescencia e inmunidad, que favorece el desarrollo de diversas patologías, especialmente neoplasias (Minarovits, 2009; Chiariotti *et al*, 2013, Al, 2013).

Las bacterias son modelos muy útiles en los estudios de cambios epigenéticos generados en la infección de células eucariotas y proporcionan varios ejemplos pioneros en la reprogramación de genes del huésped inducido por la infección (Bhavsar *et al.*, 2007). *H. pylori*, patógeno clasificado como un agente cancerígeno de clase I por la IARC (IARC, 1994), es el factor de riesgo adquirido más importante para el desarrollo de cáncer gástrico en humanos (Chan *et al*, 2003). Diversos estudios han evidenciado que la infección por *H. pylori* induce la metilación de ADN en células epiteliales gástricas en múltiples GST como *CDKN2A*, *CDH1* y *hMLH1* lo cual contribuye al riesgo de desarrollar cáncer gástrico (Wen *et al*, 2010; Huang *et al*, 2012).

Esta investigación determinó el efecto directo de la infección de *H. pylori* (ATCC 43504) sobre el estado de metilación de tres GST: (*hMLH1*, *CDH1* y *CDKN2A*) mediante el uso de un nuevo modelo infección *in vitro* en ausencia de la respuesta inmune, que utiliza cultivos primarios de células epiteliales gástricas sanas y células gástricas tumorales-AGS como control. Los resultados obtenidos evidenciaron que la infección de células gástricas primarias y tumorales con *H. pylori* (ATCC 43504) empleando un MOI máximo de 100 y diferentes tiempos de incubación de hasta siete días no indujo cambios en el estado de metilación de promotores en los tres GST evaluados.

En cáncer gástrico, está ampliamente descrito que la infección de *H. pylori* induce tempranamente la metilación del promotor del GST *CDH1*, que codifica la glucoproteína transmembrana *E-cadherina*, la cual es esencial para la adhesión celular de células epiteliales y su regulación negativa favorece la metástasis (Tamura *et al*, 2000, Chan *et al*, 2003). En nuestro estudio, células epiteliales gástricas primarias y tumorales (AGS) infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron cambios en el estado de metilación del gen *CDH1*. Resultados similares se observaron en el estudio llevado a cabo por Huang y colaboradores, donde las líneas tumorales gástricas (MKN7, MKN74 y TMK-1) infectadas con *H. pylori* no presentaron hipermetilación de este gen. No obstante, cuando estas células fueron incubadas con mediadores pro inflamatorios como IL-1 β , se observó un aumento en la producción de óxido nítrico con la metilación de este gen, por lo cual esta modificación epigenética fue atribuido a la participación del sistema inmune (Huang *et al*, 2012).

Por otra parte, defectos en diversas moléculas que regulan el ciclo celular están descritos en la iniciación y progresión del cáncer gástrico. El inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina, también denominado p16^{Ink4a} es una proteína supresora de tumores involucrada en la detención del ciclo celular en la fase G y codificada en humanos por el gen *CDKN2A* (Ushijima *et al*, 2006). La región promotora del gen *CDKN2A* está hipérmetilada en 25-42% de los cánceres gástricos (Shim *et al*, 2000) y se demostró que los niveles de metilación del gen *CDKN2A* ocurre de forma temprana durante la carcinogénesis gástrica asociada a la infección con *H. pylori* (Maekita *et al*, 2006, Perri *et al*, 2007).

En nuestro estudio, las células epiteliales gástricas primarias y células tumorales (AGS) infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron cambios en el estado de metilación del gen *CDKN2A*. Los primers utilizados evidenciaron la hemimetilación basal de este gen en

células primarias y tumorales sin infectar, lo anterior plantea limitaciones metodológicas en el estudio, debido a que no se pudo evaluar el papel directo de *H. pylori* en la metilación de este gen. Los primers usados en este estudio fueron diseñados por Yu y colaboradores, los cuales observaron el fenómeno de hemimetilación para este gen, en un porcentaje muy bajo de muestras de hepatocarcinoma analizadas (Yu *et al*, 2002), por lo cual para futuros ensayos se deben evaluar nuevos primers que se alineen selectivamente a otra región del promotor y permitan discriminar entre las regiones de ADN metiladas y no metiladas, con el fin de superar estas limitaciones

Así mismo, la hemimetilación observada en línea tumoral AGS para el gen *CDKN2A*, evidencia los sesgos de medición que pueden presentar la evaluación de fenómenos epigenéticos sobre líneas tumorales, debido que las lesiones genéticas intrínsecas no permiten evaluar en qué fase del proceso de carcinogénesis se produjeron las modificaciones epigenéticas (Chiariotti *et al*, 2013; Sitaraman, 2014). Lo anterior, se refleja en el estudio llevado a cabo por Peterson y colaboradores, donde el GST Factor Trefoil 2 (*TFF2*) se encontraba metilado basalmente en las líneas tumorales gástricas AGS y MNK-28, lo cual no permitió evaluar el papel directo de *H. pylori* en la metilación de este gen (Peterson *et al*, 2010). Por consiguiente, el modelo de infección propuesto con células gástricas primarias es una herramienta experimental valiosa para la evaluación de los cambios epigenéticos tempranos presentes en ausencia del sistema inmune.

Por otra parte, estudios recientes han demostrado que el silenciamiento de ciertos genes de reparación del ADN está relacionado con la progresión de la carcinogénesis gástrica (Li *et al*, 2015). El gen *hMLH1* codifica una proteína perteneciente al sistema de reparación del ADN (*mismatch repair*- MMR,) y se encuentra frecuentemente hipermetilado en cáncer gástrico. La hipermetilación de este gen desregula los mecanismos de reparación del ADN y da como

resultado la aparición del fenotipo de inestabilidad de microsatélite (MSI) en el 31-67% de cáncer gástrico (Ottini *et al*, 2006). En nuestro estudio, las células epiteliales gástricas primarias y tumorales (AGS) infectados con *H. pylori* (ATCC 43504), no presentaron cambios en el estado de metilación del gen *hMLH1*. Los datos obtenidos para este gen, son difíciles de contrastar debido que en la literatura no existen reportes del estado de metilación para este gen en modelos *in vitro* de infección empleando células gástricas primarias y tumorales.

Por otra parte, debido a que en los tiempos de incubación evaluados inicialmente de máximo 72 horas y MOI de 100, no se evidenciaron cambios en el estado de metilación de los GST evaluados en las células gástricas primarias y tumorales, se procedió a extender el tiempo hasta un máximo de siete días para las dos líneas celulares, con el objetivo de validar los datos obtenidos anteriormente. En este ensayo, se garantizaron las variables cruciales como disponibilidad de nutrientes y viabilidad con el fin de asegurar el contacto estrecho entre células y bacterias. Al evaluar el estado de metilación de los tres GST en las células gástricas primarias y tumorales infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) con esta aproximación experimental, se observó la no inducción de cambios en el estado de metilación de estos genes. En la literatura los modelos *in vitro* de infección descritos, usualmente emplean periodos de incubación de hasta cuatro días y MOIs máximos de 100 (Huang *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2016). En este sentido, se descarta que la ausencia de metilación en los GST evidenciada en células gástricas primarias y tumorales sea debido a variables metodológicas de los procedimientos empleados.

Así mismo, con el fin de confirmar los datos obtenidos anteriormente se procedió a evaluar el estado de metilación global de las células gástricas primarias y tumorales sin infectar e infectadas con *H. pylori* (ATCC 43504) empleando un inmunoensayo ELISA (5-mC DNA ELISA, Zymo Research). En la actualidad, los kits de ELISA disponibles comercialmente para la

evaluación rápida del estado global de metilación del ADN pueden detectar niveles de metilación de ADN de hasta 0.5% (Kurdyukov & Bullock, 2016). En nuestro estudio, los datos obtenidos mediante el ELISA confirman los anteriores hallazgos de la ausencia de cambios en el estado de metilación de los GST por parte de *H. pylori* (ATCC 43504), no observándose diferencias en los porcentajes de metilación global de las células gástricas primarias y tumorales infectadas y sin infectar con *H. pylori* (ATCC 43504) en los distintos tiempos de incubación evaluados.

Por otra parte, un hallazgo interesante se evidenció en las células gástricas tumorales; se observaron porcentajes de metilación basales más altos en estas células en comparación con las células gástricas primarias sin infectar. Lo anterior, coloca en manifiesto las lesiones genéticas intrínsecas presentes en las células tumorales y soporta el uso de este modelo de infección propuesto que emplea células gástricas primarias, teniendo en cuenta la variabilidad que presentan las múltiples líneas celulares tumorales de acuerdo a la fase de la carcinogénesis presente, por ejemplo las líneas celulares ampliamente usadas MKN-28, AGS y MKN-1 son adenocarcinomas de tipo intestinal, mientras que las líneas celulares SGC-7901, SNU-5 y KATO III son adenocarcinomas de tipo difuso según la clasificación histológica de Lauren (Cong *et al*, 2016).

Finalmente, en este estudio el estado de metilación de los GST se detectó usando la metodología de PCR específica de metilación (PCR-MSP), la cual emplea dos conjuntos de primers diseñados para discriminar entre las regiones de ADN metiladas y no metiladas posterior al tratamiento con bisulfito de sodio. Esta aproximación experimental es empleada en diversos modelos de infección (Chan *et al*, 2006; Yan *et al*, 2011, Zhang *et al*, 2016) y presenta una sensibilidad del 0,1% para la detección de alelos metilados en un locus determinado (Ku *et al*, 2011). No obstante, aunque los resultados obtenidos en este estudio evidencian que *H. pylori*

(ATCC 43504), no indujo cambios en el estado de metilación de los tres GST evaluados, la confirmación definitiva de estos datos requiere el uso de tecnologías más robustas y sensibles que permitan evaluar múltiples genes vitales de las células.

En la actualidad, la aproximación experimental más completa y de mayor rendimiento para el rastreo de cambios globales inducidos en el genoma comprende la tecnología de la compañía Illumina, la cual mediante el chip *Infinium HumanMethylation450* permite evaluar el estado de metilación de 485,000 CpG individuales en el 99% de los genes conocidos, incluidos los promotores de micro-ARN (miARN) (Sandoval *et al*, 2011). El uso de esta tecnología empleando el modelo de infección propuesto con células gástricas primarias, podría generar una visión completa de los cambios epigenéticos generados por la infección de *H. pylori* y permitiría concluir de forma definitiva si los cambios epigenéticos observados durante la carcinogénesis gástrica son producto del efecto directo de *H. pylori* o de la respuesta inmune.

7. Conclusiones

El protocolo de cultivo de células primarias gástricas estandarizado en el presente trabajo permitió el exitoso asilamiento y proliferación de células con un fenotipo epitelial gástrico. Este protocolo posee una alta reproducibilidad y podría ser usado en futuras investigaciones para la evaluación de múltiples genes relacionados con cambios epigenéticos, generados durante la infección de *H. pylori* en ausencia del sistema inmune.

El modelo de infección *in vitro* propuesto, representó una valiosa herramienta experimental para la evaluación de los cambios epigenéticos tempranos presentes en la infección de *H. pylori* en ausencia del sistema inmune, superando las limitaciones propias del uso de las células tumorales como lo son las lesiones genéticas intrínsecas y variabilidad de acuerdo a la fase de la carcinogénesis.

Los resultados obtenidos en esta investigación sugieren que la infección de células gástricas primarias y tumorales con *H. pylori*, no inducen cambios en el estado de metilación de promotores en los GST *hMLH1*, *CDH1* y *CDKN2A* en ausencia de la respuesta inmune. Por tanto, los cambios epigenéticos observados durante la infección de *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica podrían ser producto de la respuesta inmune y no del efecto directo de la bacteria sobre las células gástricas.

8. Recomendaciones

Para futuras investigaciones se sugiere validar los hallazgos encontrados en el modelo de infección propuesto, mediante la inclusión de un número mayor de muestras.

Por otra parte, se sugiere hacer la evaluación del modelo de infección realizando estrategias para simular el sistema inmune *in vitro*, mediante el uso de mediadores pro-inflamatorios y co-cultivos con células inmunitarias como macrófagos en cultivos primarios de células gástricas.

Finalmente, se sugiere emplear el modelo de infección utilizando una tecnología más robusta como el chip *Infinium HumanMethylation4* para detectar los cambios epigenéticos en múltiples genes implicados en la infección de *H. pylori*.

Referencias bibliográficas

- Al Akeel R. (2013). Role of epigenetic reprogramming of host genes in bacterial pathogenesis. *Saudi journal of biological sciences*, 20(4), 305-9. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.05.003
- Alvarez MC, Santos JC, Maniezzo N, Ladeira MS, da Silva AL, Scaletsky IC, Pedrazzoli J Jr, Ribeiro ML. (2013). MGMT and MLH1 methylation in *Helicobacter pylori*-infected children and adults. *World J Gastroenterol*. 28;19(20):3043-51. doi: 10.3748/wjg.v19.i20.3043
- Alves MK, Ferrasi AC, Lima VP, Ferreira MV, de Moura Campos Pardini MI, Rabenhorst SH. (2011) Inactivation of COX-2, HMLH1 and CDKN2A gene by promoter methylation in gastric cancer: relationship with histological subtype, tumor location and *Helicobacter pylori* genotype. *Pathobiology*.;78(5):266-76. doi: 10.1159/000329475
- Backert, S. & Selbach, M. (2008). Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol*, 10(8), 1573-1581. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01156.x
- Bhavsar, A., Guttman, J., Finlay, B., (2007). Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature* 449, 827–861. doi.org/10.1038/nature06247
- Baylin, S. & Herman, J. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, 16(4), 168–174. doi: 10.1016/S0168-9525(99)01971-X
- Bray, F. , Ferlay, J. , Soerjomataram, I. , Siegel, R. L., Torre, L. A. and Jemal, A. (2018), Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68: 394-424. doi:10.3322/caac.21492
- Berger, S.L., Kouzarides, T., Shiekhata, R., Shilatifard, A., (2009). An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 23, 781–783. doi: :10.1101/gad.1787609
- Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16(1), 6-21. doi: 10.1101/gad.947102
- Bravo, L., Cortes, A., Carrascal, E., Jaramillo, R., Garcia, L., Bravo, P. et al. (2003). *Helicobacter pylori*: patología y prevalencia en biopsias gástricas en Colombia. *Colomb Med*, (34), 124-134. Recuperado de: <<http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/view/263>>. Date accessed: 20 Jan. 2019.
- Bussière, FI., Michel, V., Mémet, S., Avé, P., Vivas, JR., Huerre, M. & Touati, E. (2010). *H. pylori*-induced promoter hypermethylation downregulates USF1 and USF2 transcription factor gene expression. *Cell Microbiol*, (8), 1124-1133. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01457.x

- Chan, A., Lam, S., Wong, B., Wong, W., Yuen M., Yeung, Y., *et al.* (2003). Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut*, 52(4), 502–506. doi: dx.doi.org/10.1136/gut.52.4.502
- Chan, A., Peng, J., Lam S., Lai K., Yuen M., Cheung H., *et al.* (2006). Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation. *Gut*, 55(4), 463–468. doi: 10.1136/gut.2005.077776
- Cheng, A., Li, M., Kang, W., Cheng, V., Chou, J., Lau, S., *et al.* (2013). *Helicobacter pylori* causes epigenetic dysregulation of FOXD3 to promote gastric carcinogenesis. *Gastroenterology*. 144(1), 122-133.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.002
- Chiariotti, L., Angrisano, T., Keller, S., Florio, E., Affinito, O., Pallante, P., *et al* (2013). Epigenetic modifications induced by *Helicobacter pylori* infection through a direct microbe-gastric epithelial cells cross-talk. *Med Microbiol Immunol*, 202(5), 327-337. doi: 10.1007/s00430-013-0301-6
- Chiba, T., Marusawa, H., Seno, H. & Watanabe, N. (2008). Mechanism for gastric cancer development by *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol*. (8 Pt 1), 1175-1181. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05472.x
- Chiba, T., Marusawa, H. & Ushijima, T. (2012). Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterology*, 143(3), 550–563. doi: 10.1053/j.gastro.2012.07.009
- Cong H, Yao RY, Sun ZQ, Qiu WS, Yao YS, Feng TT, Xin C, Liang J, Yue LU. (2016). DNA hypermethylation of the vimentin gene inversely correlates with vimentin expression in intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Oncol Lett*. 11(1):842-848. doi: 10.3892/ol.2015.3937
- Constancia, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C., Reik, W.: (2002). Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* 417, 945–948 doi: 10.1038/nature00819
- Correa, P. & Piazuelo, MB. (2012). The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases*. 13(1), 2-9. Doi: 10.1111/j.1751-2980.2011.00550.x
- Cover, T. (2016). *Helicobacter pylori* Diversity and Gastric Cancer Risk. *MBio*, 7(1), e01869-15. doi: 10.1128/mBio.01869-15.
- Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F., Hutcheon, D., Kafonek, D., Brandenburg, S, *et al.* (2003). Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science*, 299(5613), 1753-1755. doi: 10.1126/science.1080902
- Cuello, C., Correa, P., Haenszel, W. *et al.* (1976). Gastric cancer in Colombia. III. Cancer risk and suspect environmental agents. *J Natl Cancer Inst*, 57(5), 1015–1035. PubMed PMID: 1003537.

- Cuenta de alto costo [CAC]. (2015).. Cáncer gástrico. Fondo Colombiano de Enfermedades de Alto Costo, Situación del cáncer en Colombia 2015, (pp.227-240) Bogota , Colombia:
- Dong CX, Deng DJ, Pan KF, Zhang L, Zhang Y, Zhou J, You WC. (2009). Promoter methylation of p16 associated with *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions: a population-based study. *Int J Cancer*. 15;124(2):434-9. doi: 10.1002/ijc.23891
- Dunn, B. (2003). Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci*, (983), 28–42. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb05960.x
- Eusebi, L., Zagari, R. & Bazzoli, F. (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, (19 Suppl 1), 1-5. SSN 1523-5378 doi: 10.1111/hel.12165
- Feinberg, A. (2001). Cancer epigenetics takes center stage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(2), 392–394. doi: 10.1073/pnas.98.2.392
- García C, Apolinaria, Barra T, Ricardo, Delgado Sch, Carolina, Kawaguchi P, Fernando, Trabal F, Natalia, Montenegro H, Sonia, & González C, Carlos. (2006). Genotipificación de aislados clínicos de *Helicobacter pylori* en base a genes asociados a virulencia *cagA*, *vacA* y *babA2*: Primer aislamiento de una cepa *babA2* positiva en pacientes chilenos. *Revista médica de Chile*, 134(8), 981-988. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872006000800006>
- Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M., *et al.* (2002). SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science*, 295(5555), 683-686. doi: 10.1126/science.1067147
- Huang, FY., Chan, AO., Rashid, A., Wong, DK., Cho, CH. & Yuen, MF. (2012). *Helicobacter pylori* induces promoter methylation of E-cadherin via interleukin-1b activation of nitric oxide production in gastric cancer cells. *Cancer*. 118(20), 4969-4980. doi: 10.1002/cncr.27519
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 1994. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 61.) Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK487782/>
- Instituto Nacional de Cancerología ESE. –(INS-ESE)(2017)Análisis de la Situación del Cáncer en Colombia 2015. Primera edición. Bogotá DC: Instituto Nacional de Cancerología ESE;
- Ishijima, N., Suzuki, M., Ashida, H., Ichikawa, Y., Kanegae, Y., Saito, T., *et al.* (2011). BabA-mediated adherence is a potentiator of the *helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 25256–25264. doi: 10.1074/jbc.M111.233601
- Israel, D. & Peek R. (2001). pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation. *Aliment Pharmacol Ther*, 15(9), 1271–1290. doi: 10.1046/j.1365-2036.2001.01052.x
- Jin, B., Li, Y. & Robertson, K. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. *Genes Cancer*, 2(6), 607-617. doi: 10.1177/1947601910393957

- Johnson, M. & Criss, A. (2013). Fluorescence Microscopy Methods for Determining the Viability of Bacteria in Association with Mammalian Cells. *J. Vis. Exp*, (79), e50729, doi: 10.3791/50729
- Kao, C., Sheu, B. & Wu, J. (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical journal*, 39(1), 14-23. doi: 10.1016/j.bj.2015.06.002
- Katayama, Y., Takahashi, M. & Kuwayama, H. (2009). *Helicobacter pylori* causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 388(3), 496–500. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.08.003
- Keilberg, D. & Ottemann, K. (2016). How *Helicobacter pylori* senses, targets and interacts with the gastric epithelium. *Environ Microbiol*, 18(3), 791-806. doi: 10.1111/1462-2920.13222
- Kim, J., Takeshima, H., Niwa, T., Rehnberg, E., Shigematsu, Y., Yoda, Y., *et al.* (2013). Comprehensive DNA methylation and extensive mutation analyses reveal an association between the CpG island methylator phenotype and oncogenic mutations in gastric cancers. *Cancer Lett*, (330)-1, 33–40. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.022
- Kodaman, N. Pazos, A. Schneider, B. Piazuelo, M. Mera, R. Sobota, R. Sicinski, L. Shaffer, C. Romero-Gallo, J. De Sablet, T. Harder, R. Bravo, L. Peek, J. Wilson, K., Cover, T. Williams, S. & Correa, P. (2014). Human and *Helicobacter pylori* coevolution shapes the risk of gastric disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(4), 1455–1460. doi: 10.1073/pnas.1318093111.
- Ku JL, Jeon YK, Park JG. (2011). Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol*.791:23-32. doi: 10.1007/978-1-61779-316-5_3.
- Kurdyukov, S., & Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology*, 5(1), 3. doi:10.3390/biology5010003
- Leite, M. & Figueiredo, C. (2012). A method for short-term culture of human gastric epithelial cells to study the effects of *Helicobacter pylori*. *Methods Mol Biol*, 921, 61-68. doi: 10.1007/978-1-62703-005-2_9
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 3(9), 662-673. doi: 10.1038/nrg887
- Li Y, Yang Y, Lu Y, Herman JG, Brock MV, Zhao P, Guo M. (2015). Predictive value of CHFR and MLH1 methylation in human gastric cancer. *Gastric Cancer*. 18(2):280-7. doi: 10.1007/s10120-014-0370-2
- Logan, R. P., & Walker, M. M. (2001). ABC of the upper gastrointestinal tract: Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *BMJ (Clinical research ed.)*, 323(7318), 920-2.

- Low, HH., Gubellini, F., Rivera, A., Calzada, A., Braun, N., Connery, S., Dujeancourt, A., *et al.* (2014). Structure of a type IV secretion system. *Nature*, 508(7497), 550-553. doi: 10.1038/nature13081.
- Maekita, T., Nakazawa, K., Mihara, M., Nakajima, T., Yanaoka, K., Iguchi, M., *et al.* (2006). High levels of aberrant DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clin Cancer Res*, 12(3 Pt 1), 989- 995. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2096
- Marusawa, H. & Chiba, T. (2010). *Helicobacter pylori*-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol*, 22(4); 442-447. doi: 10.1016/j.coi.2010.06.001
- Matsusaka, K., Funata, S., Fukayama, M. & Kaneda, A. (2014). DNA methylation in gastric cancer, related to *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *World Journal of Gastroenterology*, 20(14), 3916-3926. doi. 10.3748/wjg.v20.i14.3916
- Meissner, A., (2010). Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 1079–1088. doi.org/10.1038/nbt.1684
- Miao, R., Guo, X., Zhi, Q., Shi, Y., Li, L., Mao, X., *et al.* (2013). VEZT, a novel putative tumor suppressor, suppresses the growth and tumorigenicity of gastric cancer. *PLoS One*, 8(9)e74409. doi: 10.1371/journal.pone.0074409.
- Mikeska, T. & Craig, J. (2014). DNA methylation biomarkers: cancer and beyond. *Genes (Basel)*, 5 (3), 821-864. doi: 10.3390/genes5030821.
- Minárovits J. (2009). Microbe-induced epigenetic alterations in host cells: the coming era of patho-epigenetics of microbial infections. A review. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 56(1):1-19. doi: 10.1556/AMicr.56.2009.1.1.
- Mitchell, H., Epidemiology of Infection. In: Mobley HLT., Mendz, G. & Hazell. S. editors. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* (chapter 2). Washington (DC): ASM Press; 2001. Chapter 2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2421/>
- Moss, SF. & Blaser, MJ. (2005). Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2(2), 90-97. doi: 10.1038/ncponc0081
- Nardone, G. & Compare, D. (2008). Epigenetic alterations due to diet and *Helicobacter pylori* infection in gastric carcinogenesis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2(2), 243–248. doi: 10.1586/17474124.2.2.243.
- Niwa, T., Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mori, A., Tanaka, H., *et al.* (2010). Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res*, 70(4), 1430-1440. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2755

- Niller HH & Minarovits J. (2016). Patho-epigenetics of Infectious Diseases Caused by Intracellular Bacteria. *Adv Exp Med Biol.*; 879:107-130. doi: 10.1007/978-3-319-24738-0_6.
- Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Aoike, A., Osifchin, N., Robbins, P. & Sakai, T. (1993). CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene*, 8(4), 1063–1067. ISSN: 09509232 Recuperado de: <https://courses.washington.edu/gs466/readings/ohtanifujita.pdf>
- Olofsson, A., Vallström, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson S., *et al.* (2010). Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol. Microbiol.* 77(6), 1539-1555. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x.
- Ospina, M., Huertas, J., Montaña, J. & Rivillas, J. (2015). Observatorio Nacional de Cáncer Colombia. *Rev. Facultad Nacional de Salud Pública [S.I.]*, 33(2), 262-276 ISSN 2256-3334. Recuperado de: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/fnsp/article/view/19044/20779854>
- Ottini L, Falchetti M, Lupi R *et al.* (2006). Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Ann Oncol*;17 7:97-102. doi: 10.1093/annonc/mdl960
- Pero, R., Peluso, S., Angrisano, T., Tuccillo, C., Sacchetti, S., Keller, S., *et al.* (2011). Chromatin and DNA methylation dynamics of *Helicobacter pylori*-induced COX-2 activation. *Int J Med Microbiol*, 301(2), 140–149. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.06.009
- Perri, F., Cotugno, R., Piepoli, A., Merla, A., Quitadamo, M., Gentile, A., *et al.* (2007). Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of *H. Pylori* infected patients and effect of eradication. *Am J Gastroenterol*, 102(7), 1361-1371. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01284.x
- Peterson AJ, Menheniott TR, O'Connor L, Walduck AK, Fox JG, Kawakami K, Minamoto T, Ong EK, Wang TC, Judd LM, Giraud AS. (2010). *Helicobacter pylori* infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans. *Gastroenterology*. 139(6):2005-17. doi : 10.1053/j.gastro.2010.08.043
- Qadri, Q., Rasool, R., Gulzar, G., Naqash, S. & Shah, Z. (2014). *H. pylori* infection, inflammation and gastric cancer. *J Gastrointest Cancer*, 45(2), 126–132. doi: 10.1007/s12029-014-9583-1
- Qu, Y., Dang, S. & Hou, P. (2013). Gene methylation in gastric cancer. *Clin Chim Acta*, (424), 53–65. doi: 10.1016/j.cca.2013.05.002
- Ramis, I., de Moraes, E., Fernandes, M., Mendoza-Sassi, R., Rodrigues, O., Juliano, C., *et al.* (2012). Evaluation of diagnostic methods for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens of dyspeptic patients. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 903–908. doi: 10.1590/S1517-83822012000300008

- Roesler, B., Rabelo, E. & Zeitune, J. (2014). Virulence Factors of *Helicobacter pylori*: A Review. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, 7, 9–17. doi: [10.4137/CGast.S13760](https://doi.org/10.4137/CGast.S13760)
- Rodríguez, M., Paredes, M. & Esteller M. (2011). Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*, 17(3), 330–339. doi: [10.1038/nm.2305](https://doi.org/10.1038/nm.2305).
- Sánchez, M., Cota, I. & Casadesús, J. (2015). DNA methylation in bacteria: from the methyl group to the methylome. *Curr. Opin. Microbiol*, 25, 9–16. doi: [10.1016/j.mib.2015.03.004](https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.03.004)
- Sandoval J., Heyn H. A., Moran S., Serra-Musach J., Pujana M. A., Bibikova M., Esteller M. (2011). Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics* 6, 692–702. doi: [10.1016/j.epi.2010.10.011](https://doi.org/10.1016/j.epi.2010.10.011)
- Santos, J. & Ribeiro, M. (2015). Epigenetic regulation of DNA repair machinery in *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(30), 9021–9037. doi: [10.3748/wjg.v21.i30.9021](https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i30.9021)
- Schneider, B., Peng, D., Camargo, M., Piazzuelo, M., Sicinschi, L., Mera, R., *et al.* (2010). Promoter DNA hypermethylation in gastric biopsies from subjects at high and low risk for gastric cancer. *Int J Cancer*, 127(11), 2588–2597. doi: [10.1002/ijc.25274](https://doi.org/10.1002/ijc.25274)
- Shigaki, H., Baba, Y., Watanabe, M., Murata, A., Iwagami, S., Miyake, K. *et al.* (2013). LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastric Cancer*, 16(4), 480–487. doi: [10.1007/s10120-012-0209-7](https://doi.org/10.1007/s10120-012-0209-7)
- Shim YH, Kang GH, Ro JY. (2000) Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Laboratory Invest*; 80: 689–95.
- Singal, R., Wang, S., Sargent, T., Zhu, S. & Ginder, G. (2002). Methylation of promoter proximal-transcribed sequences of an embryonic globin gene inhibits transcription in primary erythroid cells and promotes formation of a cell type-specific methyl cytosine binding complex. *J Biol Chem*, 277(3), 1897–1905. doi: [10.1074/jbc.M105580200](https://doi.org/10.1074/jbc.M105580200)
- Sitaraman R. (2014). *Helicobacter pylori* DNA methyltransferases and the epigenetic field effect in cancerization. *Frontiers in Microbiology*, (5), 115. doi: [10.3389/fmicb.2014.00115](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00115)
- Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher AS, Zou T, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Wilson KT, James SP, Silverberg SG, Nishizuka S, Terashima M, Motoyama T, Meltzer SJ (2000) E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 92(7):569–573
- Torres J, Correa P, Ferreccio C, Hernandez-Suarez G, Herrero R, Cavazza-Porro M *et al.* (2013). Gastric cancer incidence and mortality is associated with altitude in the mountainous regions of Pacific Latin America. *Cancer Causes Control* 24: 249–256.
- Ushijima, T. & Sasako, M. (2004). Focus on gastric cancer. *Cancer Cell* (2), 121–125. Review. . doi: [10.1016/S1535-6108\(04\)00033-9](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00033-9)

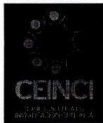
- Ushijima T, Nakajima T, Maekita T. (2006). DNA methylation as a marker for the past and future. *J Gastroenterol*; 41: 401-407 doi: 10.1007/s00535-006-1846-6
- Valenzuela, M., Canales, J., Corvalán, A. & Quest, A. (2015). Helicobacter pylori-induced inflammation and epigenetic changes during gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 21(45), 12742-12756. doi:10.3748/wjg.v21.i45.12742
- Wen, XZ., Akiyama, Y., Pan, KF., Liu, ZJ., Lu, ZM., Zhou, J., *et al.* (2010). Methylation of GATA-4 and GATA-5 and development of sporadic gastric carcinomas. *World J. Gastroenterol.* 16 (10), 1201–1208. doi: 10.3748/wjg.v16.i10.1201
- Willhite, D. & Blanke, S. (2004). Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. *Cell Microbiol*, 6(2), 143-154. doi: 10.1046/j.1462-5822.2003.00347.x
- Xie, Y., Zhou, J., Zhao, Y., Zhang, T. & Mei, L. (2017). H. pylori modifies methylation of global genomic DNA and the gastrin gene promoter in gastric mucosal cells and gastric cancer cells, *Microbial Pathogenesis*, 108, 129-136 doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.003
- Yamada, H., Shinmura, K., Goto, M., Iwaizumi, M., Konno, H., Kataoka, H., *et al.* (2009). Absence of germline mono-allelic promoter hypermethylation of the CDH1 gene in gastric cancer patients. *Mol Cancer*, (12), 8-63. doi: [10.1186/1476-4598-8-63](https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-63)
- Yan, J., Zhang, M., Zhang, J., Chen, X. & Zhang, X. (2011). Helicobacter pylori infection promotes methylation of WWOX gene in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 408(1), 99-102. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.127
- Yo-Ping, L., Jyh-Chin, Y., Tzu-Zung, L., Jaw-Town, L., & JandJin-Town, W. (2006). Helicobacter pylori Infection and CagA Protein Translocation in Human Primary Gastric Epithelial Cell Culture. *Helicobacter*, 11 (Issue 5), 451–459. doi: 10.1111/j.1523-5378.2006.00438.x
- Yoda, Y., Takeshima, H., Niwa, T., Kim, J., Ando, T., Kushima, R. *et al.* (2015). Integrated analysis of cancer-related pathways affected by genetic and epigenetic alterations in gastric cancer. *Gastric Cancer*, (18)-1, 65–76. doi: 10.1007/s10120-014-0348-0
- Yu, J., Ni, M., Xu, J., Zhang, H., Gao, B., Gu, J., *et al.* (2002). Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC Cancer*, 15, 2-29. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC139988/>
- Yoshiura, K., Kanai, Y., Ochiai, A., Shimoyama, Y., Sugimura, T. & Hirohashi, S. (1995). Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(16), 7416–7419. doi: 10.1073/pnas.92.16.7416
- Zamani, M. Ebrahimtabar, F. Zamani, V. Miller, W. Alizadeh-Navaei, R. Shokri-Shirvani, J. & Derakhshan, M. (2018). Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence

of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*, 47(7), 868-876. doi: 10.1111/apt.14561. Review.

Zhang, B., Hu, L., Zang, M., Wang, H., Zhao, W., Li, J. *et al.* (2016). *Helicobacter pylori* CagA induces tumor suppressor gene hypermethylation by upregulating DNMT1 via AKT-NFκB pathway in gastric cancer development. *Oncotarget*, 7(9), 9788-9800. doi: 10.18632/oncotarget.7125

Lista de anexos

Anexo A. Aval Comité de Ética CEINCI



4110

Bucaramanga,

Estudiante
JORGE ALEXANDER SILVA SAYAGO
Investigador principal

Doctor
HENRY BAUTISTA AMOROCHO
Director del trabajo de investigación
Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas
Departamento de Ciencias Básicas
Facultad de Salud
Universidad Industrial de Santander

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto, "Determinación del patrón de metilación de ADN en cultivos primarios de gastrocitos humanos sanos infectados con cepas colombianas de *Helicobacter pylori*".

Cordial Saludo. El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS) en reunión realizada el día 9 de febrero de 2018, según consta en el acta N° 01, evaluó los ajustes realizados al proyecto del asunto y al respecto conceptúa:

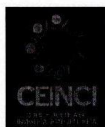
En consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos del CEINCI-UIS, el Comité acuerda por consenso, **APROBAR** el documento en digital y el consentimiento informado en su última versión.

Se recomienda emplear las estrategias que considere necesario, para verificar que el consentimiento informado ha sido comprendido por los participantes. De otra parte, adoptar los mecanismos necesarios para garantizar la confidencialidad de la información recabada. Todo ello amparado en lo reglamentado en la Ley Estatutaria 1581 de 2012 del Congreso de la República de Colombia, por la cual se dictan disposiciones para la protección de datos personales y en la Resolución de Rectoría 1227 del 22 de agosto de 2013, sobre el tratamiento de datos personales. Igualmente realizar los trámites necesarios en las instituciones para acceder a la información y a los participantes. Así mismo, socializar los resultados generados en este proyecto en las instancias correspondientes.

Se solicita que se remita al correo del Comité, información de las siguientes circunstancias, cuando lleguen a ocurrir:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo.
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.

Proyectó César Hastamorir, revisó Francisco Espinel y aprobó Laura Rodríguez.



4110

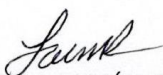


- Informe de avance sobre los aspectos éticos según guía e instructivo anexo. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación y al finalizar la misma según el cronograma establecido en el Formato FIN 65.
- El informe debe ser enviado al correo: ceinci.seguimientos@uis.edu.co

En el momento del seguimiento se verificará el cumplimiento de las consideraciones éticas.

En nombre del CEINCI-UIS le ofrecemos el apoyo que usted considere necesario, para la aplicación y salvaguarda de los asuntos éticos durante la investigación.

Atentamente,


LAURA A. RODRÍGUEZ VILLAMIZAR
Presidenta
CEINCI- UIS


FRANCISCO ESPINEL CORREAL
Secretario Técnico Científico
CEINCI- UIS

Copia: Profesora Clara Inés Vargas Castellanos (Departamento de Ciencias Básicas), co-directora trabajo de investigación.

Dr. Guillermo Gómez Moya, Coordinador Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas.

Archivo Comité de Ética en Investigación Científica

Proyectó César Hastamorir, revisó Francisco Espinel y aprobó Laura Rodríguez.

Anexo B. Consentimiento Informado

Versión 02



Grupo CLINIQUES

CONSENTIMIENTO
INFORMADO

Grupo GENEHUIS

Determinación del patrón de metilación de ADN en cultivos primarios de gastrocitos humanos sanos infectados con cepas colombianas de *Helicobacter pylori*

Instituciones responsables: Universidad de Santander – UDES **Institución financiadora:** Colciencias/UDES
Universidad Industrial de Santander – UIS

Investigadores responsables: Jorge Alexander Silva Sayago Grupo CliniQUES Facultad de Salud– UDES
Henry Bautista Amorochó Grupo CliniQUES Facultad de Salud– UDES
Clara Inés Vargas Castellanos Grupo GENEHUIS Facultad de Salud– UIS

Nombre del paciente: _____ **Fecha:** _____

Señor(a):

La presente investigación tiene como objetivo evaluar el patrón de metilación de ADN en gastrocitos humanos infectados con cepas de *Helicobacter pylori* aislados de pacientes con enfermedades gastroduodenales. Para este fin, se utilizará una porción del tejido de su **biopsia de estómago**, tomada como requisito para aclarar el diagnóstico de la enfermedad que usted padece y por la cual, está asistiendo hoy a consulta con el médico endoscopista. Esta investigación se considera de riesgo mínimo para usted, ya que el estudio se hará, sobre una porción muy pequeña del material que le fue extraído para ser estudiado por su médico personal, por tanto la investigación no impone ningún riesgo para usted y no se responsabiliza de los efectos que se deriven de la toma de la biopsia.

Del tejido de su biopsia se obtendrán células epiteliales gástricas, las cuales serán crecidas en el laboratorio por un periodo de hasta 4 semanas, posteriormente estas células serán infectadas con cepas de *Helicobacter pylori* aislados de pacientes con enfermedades gastroduodenales para evaluar el efecto temprano de la bacteria sobre los patrones de metilación de ADN. La metilación del ADN es un evento relacionado en cáncer gástrico, por el cual se realizan modificaciones en genes vitales para el mantenimiento del tejido que conlleva al desarrollo de cáncer.

Pocos estudios han evaluado el efecto directo de cepas de *H. pylori* circulantes de Colombia sobre la metilación de ADN en células epiteliales gástricas sanas. Por consiguiente, esta investigación aportará nuevo conocimiento para entender los efectos tempranos de bacterias circulantes sobre el epitelio gástrico, para lograr una mejor comprensión de la historia natural de la enfermedad que permita en un futuro el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Por lo anterior, usted autoriza mediante la firma de este consentimiento, el uso de sus células para investigación biomédica en el tema de cáncer.

Es importante aclarar que su aceptación en este estudio es voluntaria y que usted ha sido invitado a participar porque no presenta lesiones neoplásicas (malignas) o pre neoplásicas de cáncer gástrico. De hecho, uno de los criterios de selección de los participantes en este estudio es que el tejido de su biopsia gástrica obtenido por el médico endoscopista sea normal. El investigador principal y los coinvestigadores en el presente estudio garantizan que su nombre, apellidos y número de identificación serán mantenidos en total confidencialidad.

Yo, _____, mayor de edad (____ años), identificado(a) con c.c.# _____ de _____ y con domicilio en _____
Declaro:

Que el doctor: _____ con c.c.# _____
Me explicó que es conveniente proceder, en mi situación, realizar los estudios arriba mencionados en la **BIOPSIA** obtenida del estómago.

El doctor hizo aclaración en lo siguiente:

- Una parte de la biopsia del estómago extraída será sometida a estudios con el fin de evaluar el patrón de metilación de ADN en gastrocitos humanos infectados con cepas de *Helicobacter pylori* aislados de pacientes



09 FEB 2018

- con enfermedades gastroduodenales
- Este procedimiento no intervendrá con el pronóstico o el curso de su enfermedad y los resultados obtenidos en la investigación no le favorecerán de forma inmediata pero los resultados obtenidos servirán en un futuro para entender la historia natural de la enfermedad y buscar un tratamiento efectivo contra el cáncer gástrico.
 - Usted no tiene ninguna obligación con los investigadores, la participación es voluntaria y en cualquier momento y sin necesidad alguna de explicación, puede retirarse del estudio y revocar el consentimiento que ahora presta. Su retiro no será motivo para no obtener atención médica en el futuro si así lo requiere. De igual forma, los investigadores están obligados a guardar reserva con los resultados obtenidos.
 - La participación en esta investigación no incluye retribución económica, tampoco representa costos adicionales para usted y no presenta ningún riesgo que comprometa el estado de su salud actual.
 - La responsabilidad de la persona que desea participar en la investigación queda limitada a otorgar el consentimiento informado para el uso de la biopsia de estómago. El tiempo de su participación en la investigación comprende solo el de la toma de muestra y la firma de este consentimiento. Sin embargo, el uso de las muestras obtenidas de usted será hasta el momento en que decida cancelar el consentimiento informado.
 - Las muestras y los datos del paciente obtenidos en esta investigación se conservarán de forma privada en los archivos del grupo; si por algún motivo se presentará el caso en que se requieran utilizarlos en otros estudios, solo se podrá hacer con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Salud para la utilización de las muestras y de los datos previo análisis del estudio a realizar.
 - La información obtenida de este estudio en todo momento será confidencial, su nombre nunca aparecerá como tal y se le asignará un número el cual será su identificación en la investigación. Los resultados obtenidos sólo aparecerán en publicaciones científicas o sólo podrían ser divulgados a las autoridades de salud en los casos que la ley estipule para ello.

Nota: Para obtener este consentimiento informado previamente se le explico en un lenguaje claro y sencillo lo relacionado con la investigación, en forma personal y sin presión externa por medio de una entrevista persona a persona. Usted puede realizar todas las observaciones y se le aclararon todas las dudas que plantee, además usted recibió una copia de este consentimiento.

Manifiesto que estoy satisfecho(a) con la información recibida, que comprendo el alcance y los riesgos de la investigación y que no recibí ningún tipo de presión por parte del personal para participar en el estudio. Y en tales condiciones **CONSENSO** Que se utilice la **BIOPSIA** que se me realizó del estómago para realizar en ella los estudios pertinentes para este proyecto, además que recibo una copia de este consentimiento.

En Constancia firma: _____

Ciudad y Fecha _____ Cédula ciudadanía #: _____ Teléfono #: _____

TESTIGOS

Nombre Testigo 1: _____ Cédula ciudadanía # _____

Firma Testigo 1: _____ Teléfono #: _____

Nombre Testigo 2: _____ Cédula ciudadanía # _____

Firma Testigo 2: _____ Teléfono #: _____

En caso de tener alguna inquietud o pregunta con relación a la investigación contactar al Investigador principal Dr. Henry Bautista Amoroch, en el teléfono 7 6516500 extensión 1212 (horas de oficina) o en el celular 317 666 7786 (noche) o al correo electrónico henrybau33@gmail.com.

Adicionalmente, usted se puede comunicar al comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander, ubicado en la sede Bucarica UIS, carrera 19 N° 35 – 02, centro oficina 245, teléfono 6344000 Ext. 3808, Correo electrónico: comitedetica@uis.edu.co, en el horario de lunes a viernes de 7:00 am – 12:00 pm y de 2:00 pm a 5:00 pm, quien vigilara el cumplimiento de los principios éticos involucrados en esta investigación.