



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**Efecto de los ácidos grasos de cadena larga sobre la expresión transcripcional
de factores de virulencia de *Helicobacter pylori***

T E S I S:

Que para que obtener el grado de

Doctora en Biología Experimental

P R E S E N T A:

M en C. HILDA ALICIA VALDEZ SALAZAR

Comité de tutores

Codirector: Dr. Francisco José Fernández Perrino

Codirector: Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas

Asesor: Dr. José Antonio Ibarra García

12 de septiembre de 2022

Declaración de originalidad

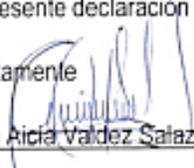
El (La) que suscribe Hilda Alicia Valdez Salazar, alumno (a) del posgrado Doctorado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: "Efecto de los ácidos grasos de cadena larga sobre la expresión transcripcional de factores de virulencia de *Helicobacter pylori*",

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante Miembros del jurado para lo obtención del grado de Doctora en Biología Experimental, es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 12 de septiembre del 2022.

Atentamente


Hilda Alicia Valdez Salazar

Nombre y firma del alumno.

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.

“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020”

El presente trabajo fue apoyado por el Fondo de Investigación en Salud (FIS)-IMSS, México: FIS/IMSS/PROT/G17/1678.

MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “**Efecto de los ácidos grasos de cadena larga sobre la expresión transcripcional de factores de virulencia de *Helicobacter pylori***”, que presentó:

M en C. Hilda Alicia Valdez Salazar

El día 12 de septiembre del 2022

Sinodales

Presidente: Dr. Octavio Loera Corral

Departamento de Biotecnología. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-I



Secretario: Dr. José Antonio Ibarra García

Laboratorio de Genética Microbiana. Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN.



Vocal 1: Dra. Margarita Camorlinga Ponce

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Pediatría, CMN SXXI, IMSS.



Vocal 2: Dr. Miguel Ángel Ares Jiménez

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Pediatría, CMN SXXI, IMSS.



COMITÉ TUTORIAL

Codirector

Dr. Francisco José Fernández Perrino

Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario. Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Codirector

Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas

Laboratorio de Bacteriología. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.

Asesor

Dr. José Antonio Ibarra García

Laboratorio de Genética Microbiana. Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

DEDICATORIAS

A mis hijos: Marcos Giovani y Montserrat:

Ustedes mis grandes motores, mi inspiración, mis ganas de realizar todo, mi analgésico para seguir adelante y no parar a pesar del cansancio. Son el motivo de mi vida, los amo con todo mi corazón y les dedico este logro y quiero decirles que todo lo que se propongan lo pueden hacer, solamente hay que ser constantes y disciplinados. Gracias por sus risas, sus abrazos, sus besos, por sus ocurrencias y por sus enseñanzas.

A mi esposo David De los Santos García:

Te dedico este logro, tan importante para mí, muchas gracias por tu amor, tu apoyo y comprensión durante todo este tiempo, te amo.

A mi mamá Dionicia Salazar Vázquez:

Por tu gran amor incondicional en todos los momentos de mi existir, por tu ejemplo de vida, siempre positiva, alegre, optimista y enseñarme a no rendirme, y a superar adversidades. Te agradezco enormemente tus pláticas, tu amistad, tu ayuda, tu confianza y tu apoyo. Gracias mamá este logro también te lo debo a ti, te quiero mucho.

A mi papá Pablo Valdez Martínez:

Por todo el amor que me brindaste, por enseñarme muchas cualidades únicas en ti, como el respeto, la puntualidad, y la calidad humana que solo tú sabías dar, te recuerdo con mucho amor y estas presente en cada logro y proyecto que realizo, gracias porque siempre estuviste presente.

A mis hermanos Pablo, Mónica, Cesar, Christian:

Hermanos los quiero mucho son definitivamente cuatro mundos únicos y me da gusto que estén muy contentos con su familia y les agradezco su apoyo, su compañía, los momentos juntos, pero sobre todo su comprensión siempre. Les dedico mi tesis y deseo que sigan también como hasta ahora.

A mis sobrinos Elizabeth, Dante, Laura, Pablo, Julio, Jacquelin y Axel:

Jóvenes, sobrinos, ahijados, cómplices y demás los quiero muchísimo y justo ahora que están estudiando y terminando sus carreras e incorporándose a la vida laboral, les quiero decir que me siento muy orgullosa de todos ustedes, de sus decisiones, de sus proyectos y de cómo van enfrentando la vida. Les dedico este logro y sepan que cualquier tiempo es bueno para seguir desarrollándose en cualquier ámbito y que no hay límites, tienen alas úsenlas y sean muy felices.

A mis amigos:

Dora luz, Noemi, Eva, Ana, chela, Lucy, Guadalupe, Sergio, Rafael, Santiago, Paty, Andy, Vero, Luis Miguel, Javier. Muchas gracias por formar parte de mi vida, les dedico este logro.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas:

Mi agradecimiento principal es para mí tutor, muchas gracias Miguel, sin tu apoyo no hubiera sido posible este logro, te agradezco la confianza desde el inicio, gracias por permitirme ser tu estudiante, fue un gran honor para mí. Agradezco, no solo el aspecto académico, sino también la calidad de persona que eres. Te deseo que sigas teniendo muchos éxitos, en tus nuevos proyectos.

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino:

Doctor mi más profundo agradecimiento por haber sido mi tutor, agradezco toda la ayuda, los comentarios finos y asertivos que lo caracterizan a usted, para la realización de este proyecto.

Al Dr. José Antonio Ibarra García:

Agradezco a mi asesor por su confianza y apoyo para enriquecer este proyecto con sus conocimientos, experiencias y observaciones, haciéndome ver esos pequeños grandes detalles para lograrla meta.

A mi distinguido comité tutorial:

Mi reconocimiento y agradecimiento al Dr. Octavio Loera, la Dra. Margarita Camorlinga y el Dr. Miguel Ángel Ares Jiménez, por su tiempo para enriquecer este trabajo con sus observaciones, sugerencias, conocimientos, la disposición, y el espacio para que este proyecto se pudiera llevar a cabo.

RESUMEN

La infección por *Helicobacter pylori* es uno de los factores de riesgo más importantes para desarrollar cáncer gástrico (CG). El sistema de secreción tipo IV (SST4) codificado en la isla de patogenicidad *cag* es el principal factor de virulencia de *H. pylori* asociado con CG. Además, se ha demostrado que otros factores de virulencia juegan un papel importante en la virulencia de *H. pylori*, como la citotoxina vacuolizante VacA, la ureasa, los flagelos (2-6 y las adhesinas. Los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) son moléculas señalizadoras que afectan a la transcripción de genes de virulencia en varias bacterias patógenas como *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, el efecto de los AGCL sobre la transcripción de genes de virulencia de *H. pylori* sigue siendo aún desconocido. En el presente trabajo, se analizó si la transcripción de los genes que codifican para el SST4 y componentes de la envoltura celular, flagelinas, adhesinas, toxinas, ureasa, así como la transcripción de diferentes genes regulatorios de la cepa 26695 de *H. pylori*, se alteraban por la presencia de cinco diferentes AGCL: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. Nuestros resultados mostraron que los ácidos palmítico y oleico regulan positivamente tanto a la mayoría de los genes de virulencia probados, incluyendo *cagL*, *cagM*, *flaB*, *sabA*, *mraY* y *vacA*, así como a los genes que codifican los reguladores transcripcionales NikR, Fur, CheY, ArsR, FlgR, HspR, HsrA, Hup y CrdR. Por el contrario, los otros AGCL (esteárico, linoleico, linolénico) afectaron diferencialmente la transcripción de los genes reguladores y de virulencia evaluados. Nuestros datos muestran que los AGCL pueden actuar como moléculas señalizadoras que controlan la transcripción del viruloma de *H. pylori*.

ABSTRACT

Infection with *Helicobacter pylori* is one of the most important risk factors for developing gastric cancer (GC). The type IV secretion system (T4SS) encoded in the *cag* pathogenicity island is the main virulence factor of *H. pylori* associated with GC. Additionally, other virulence factors have been shown to play an important role in the *H. pylori* virulence, such as vacuolizing cytotoxin (VacA), urease, flagella, and adhesins. Long-chain fatty acids (LCFAs) are signaling molecules that affect the transcription of virulence genes in several pathogenic bacteria such as *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium tuberculosis*. However, the effect of LCFAs on the transcription of *H. pylori* virulence and regulatory genes remains unknown. Here we analyzed whether the transcription of virulence genes that encode T4SS, cellular envelope components, flagellins, adhesins, toxins, urease, as well as the transcription of different regulatory genes in the *H. pylori* strain 26695, are altered by the presence of five distinct long-chain fatty acids (LCFAs): palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids. Palmitic and oleic acids up-regulated the transcription of most of the virulence genes tested, including *cagL*, *cagM*, *flaB*, *sabA*, *mraY* and *vacA*, as well as that of the genes encoding the transcriptional regulators NikR, Fur, CheY, ArsR, FlgR, HspR, HsrA, Hup, and CrdR. In contrast, the other LCFAs (stearic, linoleic, linolenic) differentially affected the transcription of the virulence and regulatory genes assessed. Our data show that LCFAs can act as signaling molecules that control the transcription of the *H. pylori* virulome.

ÍNDICE GENERAL

1.INTRODUCCIÓN	1
1.1. Factores de virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	2
1.1.1. Flagelos	2
1.1.2. Ureasa	3
1.1.3. Sistema de secreción tipo 4 (SST4)	3
1.1.4. Adhesinas	4
1.1.5. Citotoxina vacuolizante VacA	6
1.1.6. Envoltura celular	7
1.2. Reguladores transcripcionales de <i>Helicobacter pylori</i>	11
1.3. Ácidos grasos de cadena larga (AGCL)	15
1.3.1. Ácido palmítico	17
1.3.2. Ácido esteárico	18
1.3.3. Ácido oleico	18
1.3.4. Ácido linoleico	18
1.3.5. Ácido linolénico	19
2.ANTECEDENTES	20
2.1. Efecto de los AGCL sobre la expresión transcripcional de los factores de virulencia en bacterias patógenas	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos particulares	23
6.MATERIAL Y MÉTODOS	24
6.1. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento	24
6.2. Cinética de crecimiento <i>H. pylori</i> 26695	24
6.3. Diseño, síntesis y especificidad de los oligonucleótidos	24
6.3.1. Extracción de DNA de <i>H. pylori</i> 26695	27
6.3.2.PCR en punto final de los genes que codifican para factores de virulencia de <i>H. pylori</i> 26695	28
6.4. Curvas estándar del DNA de <i>H. pylori</i> 26695	29
6.5. Ensayos de <i>H. pylori</i> 26695 en presencia de los AGCL	31
6.6. Extracción de RNA de <i>H. pylori</i> 26695	32
6.7. Síntesis de cDNA	34
6.8. Amplificación de los genes mediante la PCR en tiempo real	35
6.8.1. Determinación de la expresión génica relativa	36
6.9. Cuantificación de la secreción de IL-8	36

6.10. Ensayos de motilidad en agar suave	37
6.11. Ensayos de adherencia celular	38
6.12. Formación de Biopelícula	39
6.13. Análisis estadístico	41
6.14. Mapas de calor de la expresión diferencial de los factores de virulencia y reguladores transcripcionales	41
7.RESULTADOS	42
7.1. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento de <i>H. pylori</i> 26695	42
7.2. Cinética de crecimiento de <i>H. pylori</i> 26695	43
7.3. Especificidad de los iniciadores	43
7.3.1. Extracción de DNA de <i>H. pylori</i> 26695	44
7.3.2. PCR en punto final de los principales genes que codifican para factores de virulencia de <i>H. pylori</i> 26695	45
7.4. Curvas estándar de los genes de virulencia de <i>H. pylori</i> 26695	46
7.5. Extracción de RNA de <i>H. pylori</i> 26695	50
7.6. Efecto de los AGCL sobre los componentes del SST4 de <i>H. pylori</i> 26695	51
7.7. Efecto de los AGCL sobre la expresión de los genes que codifican las flagelinas y adhesinas	53
7.8. Los ácidos palmítico y oleico estimulan la transcripción del gen <i>mraY</i> para la síntesis del peptidoglicano	53
7.9. El efecto de los AGCL en la transcripción de los genes <i>vacA</i> y genes <i>ureAB</i>	56
7.10. Los AGCL regulan diferencialmente la transcripción de los genes regulatorios de <i>H. pylori</i>	57
8.DISCUSIÓN	58
9.CONCLUSIONES	63
10. PERSPECTIVAS	63
11. BIBLIOGRAFÍA	64
12. Apéndice I. Figuras suplementarias	83
13. Apéndice II. Difusión de los resultados	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Reguladores transcripcionales de <i>Helicobacter pylori</i>	12
2	Genes que codifican para factores de virulencia y reguladores transcripcionales de <i>H. pylori</i> , empleados en este estudio	25
3	Oligonucleótidos para qRT-PCR empleados	30
4	Diseño de oligonucleótidos para la amplificación mediante qPCR de los genes que codifican para los factores de virulencia de <i>H. pylori</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cultivo de <i>H. pylori</i> 26695 en agar y caldo <i>Brucella</i> SFB al 10% a 37°C en una atmósfera de 10% CO ₂	41
2	Curva de Crecimiento de <i>H. pylori</i> en caldo <i>Brucella</i> SFB 10% a 37°C, 10% CO ₂	42
3	Gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE 1X, teñido con Gel Red del DNA genómico de <i>H. pylori</i> 26695.	43
4	Gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X, teñido con Gel Red, de los amplicones de los principales genes que codifican para factores de virulencia de <i>H. pylori</i> 26695, obtenidos por PCR en punto final.	44
5	Gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X, teñido con Gel Red. Amplicones de diez genes que codifican para reguladores transcripcionales de <i>H. pylori</i> 26695, obtenidos por PCR en punto final.	45
6	Gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X, teñido con Gel Red, de los amplicones de los principales genes que codifican para factores de virulencia de <i>H. pylori</i> 26695, obtenidos por PCR en punto final.	46
7	Curva de amplificación del fragmento de 163 pb gen <i>rrnA16S</i> de <i>H. pylori</i> .	46
8	Curva estándar de DNA del gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green.	47
9	Curva de disociación del DNA del fragmento de 172 pb gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> .	47
10	Curva de disociación del DNA del fragmento de 163pb gen <i>rrnA16S</i> de <i>H. pylori</i> .	48
11	RNA total obtenido a partir del crecimiento de <i>H. pylori</i> con AGCL.	49
12	Efecto del ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico sobre la expresión de <i>cagPAI</i> .	51
13	Efecto de los AGCL en la expresión de los genes flagelares y de adhesinas, así como en la motilidad y adherencia de <i>H. pylori</i> .	53
14	Efecto de los AGCL sobre la expresión de los genes de la envoltura celular.	54
15	Efecto de los AGCL en la expresión de los genes <i>vacA</i> y <i>ureAB</i> .	55
16	Efecto de AGCL en la expresión de diferentes genes reguladores.	56

17	Resumen de los efectos de diferentes AGCL sobre la expresión transcripcional de la virulencia de <i>H. pylori</i> y los reguladores transcripcionales.	57
-----------	--	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS COMPLEMENTARIAS

NÚMERO		PÁGINA
S1	Curva de amplificación del fragmento de 128 pb gen <i>cagL</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y usando el fluorocromo SYBR® Green.	83
S2	Curva estándar de DNA del gen <i>cagL</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green.	83
S3	Curva de disociación de DNA del fragmento de 128 pb gen <i>cagL</i> de <i>H. pylori</i>	83
S4	Curva de amplificación del fragmento de 182 pb gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> .	84
S5	Curva estándar de DNA del gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green.	84
S6	Curva de disociación de DNA del fragmento de 182 pb gen <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i>	85
S7	Curva de amplificación del fragmento de 102 pb gen <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i> .	85
S8	Curva estándar de DNA del gen <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green.	85
S9	Curva de disociación de DNA del fragmento de 102 pb gen <i>ureA</i> de <i>H. pylori</i> .	86
S10	Curva de amplificación del fragmento de 147 pb gen <i>ureB</i> de <i>H. pylori</i> .	86
S11	Curva estándar de DNA del gen <i>ureB</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green.	86
S12	Curva de disociación de DNA del fragmento de 147 pb gen <i>ureB</i> de <i>H. pylori</i>	87
S13	Curva de amplificación del fragmento de 135 pb gen <i>flaA</i> de <i>H. pylori</i>	87
S14	Curva estándar de DNA del gen <i>flaA</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green.	87
S15	Curva de disociación de DNA del fragmento de 135 pb gen <i>flaA</i> de <i>H. pylori</i>	88
S16	Curva de amplificación del fragmento de 128 pb gen <i>flaB</i> de <i>H. pylori</i>	88
S17	Curva estándar de DNA del gen <i>flaB</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green.	89

S18	Curva estándar de DNA del gen <i>flaB</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green	89
S19	Curva de amplificación del fragmento de 100 pb del gen <i>babA</i> de <i>H. pylori</i>	90
S20	Curva estándar de DNA del gen <i>babA</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green	90
S21	Curva de disociación de DNA del fragmento de 100 pb gen <i>babA</i> de <i>H. pylori</i>	91
S22	Curva de amplificación del fragmento de 105 pb gen <i>sabA</i> de <i>H. pylori</i>	91
S23	Curva estándar de DNA del gen <i>sabA</i> de <i>H. pylori</i> realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green	92
S24	Curva de disociación de DNA del fragmento de 105 pb gen <i>sabA</i> de <i>H. pylori</i>	92

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza la mucosa del estómago durante toda la vida del ser humano, teniendo éxito al vivir en un lugar hostil donde la mayoría de los microorganismos colonizan y en el que la competencia es limitada. *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa de forma espiral, de alrededor de 3 micrómetros de largo, con un diámetro aproximado de unos 0.5 micrómetros. *Helicobacter pylori* posee múltiples flagelos (2-6 flagelos) en uno de sus extremos, lo que la hace altamente móvil (Baj *et al.*, 2021; Cover *et al.*, 1991). *Helicobacter pylori* es una bacteria microaerófila, es decir, requiere oxígeno pero a más bajas concentraciones de las encontradas en la atmósfera y además es oxidasa y catalasa positiva. Es una bacteria generalmente no invasiva, ahora se sabe de su capacidad de penetración a las líneas celulares epiteliales en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Necchi *et al.*, 2007) que vive en el epitelio y en el moco que cubre la mucosa gástrica. Es un microorganismo de crecimiento lento, y se necesitan de 3 a 5 días para que se puedan apreciar las colonias en medios sólidos (Harris *et al.*, 1996). Su característica bioquímica más sobresaliente es la abundante producción de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea en amonio y dióxido de carbono; la producción de amonio es un mecanismo importante para la sobrevivencia de la bacteria en un ambiente con pH tan ácido debido al jugo gástrico (Dunn *et al.*, 1990).

1.1. Factores de virulencia de *H. pylori*

Varios factores de virulencia han sido descritos en *H. pylori* para la colonización gástrica y para el daño tisular. El sistema de secreción tipo 4 (SST4), los flagelos, la ureasa, la citotoxina vacuolizante VacA y las adhesinas son los factores de virulencia más importantes para la patogenicidad de *H. pylori* (Molnar *et al.*, 2010). A continuación, se describen los principales factores de virulencia que se emplearon en este estudio.

1.1.1. Flagelos

Los flagelos de *H. pylori* se han estudiado ampliamente, demostrándose el papel clave de éstos en la colonización de la mucosa gástrica humana. Experimentos con lechones gnotobióticos han establecido una correlación entre el estado de la motilidad de algunos aislados de *H. pylori* y su capacidad para colonizar el epitelio gástrico (Eaton *et al.*, 1989, 1992). La motilidad de *H. pylori* es importante para su patogenicidad, específicamente en el proceso de colonización del organismo huésped y en el establecimiento de una infección exitosa (Campbell *et al.*, 1998; Dorocicz *et al.*, 1993; Jiang *et al.*, 1996). La morfología curvada de *H. pylori* y la motilidad polar causada por flagelos unipolares produce movimientos parecidos a un tornillo permitiendo al organismo penetrar la capa de mucina y contrarrestando el peristaltismo gástrico, lo que permite la adhesión a la superficie epitelial. Los flagelos están compuestos por proteínas llamadas flagelinas, que tienen un peso molecular aproximado de 50 a 60 kDa y que están codificadas por los genes *flaA* y *flaB*, que son los elementos reguladores de la función de los flagelos (Baj *et al.*, 2021; Jenks *et al.*, 1997; Porwollik *et al.*, 1999).

1.1.2. Ureasa

La ureasa es la enzima más abundantemente expresada en *H. pylori* y es fundamental para el metabolismo y la virulencia de esta bacteria y es necesaria para la colonización de la mucosa gástrica (Baj *et al.*, 2021). Su peso molecular es de 550 kDa, y consta de tres subunidades de 26.5 kDa (UreA), 61 kDa (UreB) y 13 kDa (UreC). Esta enzima es necesaria para mantener un pH neutro en el microambiente bacteriano, para la supervivencia de *H. pylori* en la acidez del estómago (Hu *et al.*, 1992). Este mecanismo se logra debido a que la ureasa, cataliza la hidrólisis de la urea del jugo gástrico, formando bicarbonato y amonio. El bicarbonato aumenta el pH alrededor de la bacteria, protegiéndola del medio ácido. El amonio puede producir directamente daño celular, y también se ha reportado que aumenta la retrodifusión de los iones H⁺ e inactiva el complemento (Marshall, 1991).

1.1.3. Sistema de secreción tipo IV (SST4)

La isla de patogenicidad cag (cagPAI) es un largo segmento de DNA de alrededor de 40 kb, con 27 genes que codifican un SST4. Esta cagPAI es una determinante de virulencia que está presente en un 60-70%, de las cepas de *H. pylori* occidentales y virtualmente en el 100% de las cepas del este de Asia (Akopyants *et al.*, 2002; Alm *et al.*, 1999; Censini *et al.*, 1996; Covacci y Rappuoli, 1998; Tomb *et al.*, 1997). Aunque todas las cepas de *H. pylori* producen gastritis, las cepas que tienen la cagPAI (+) aumentan el riesgo de gastritis severa, atrofia, displasia y CG, en comparación con cepas que pierden la cagPAI (-). Las cepas de *H. pylori* cagPAI (-) son encontradas predominantemente en la capa de la mucosa gástrica mientras que las cepas cagPAI (+) son encontradas adyacentes o adheridas a células del epitelio gástrico, indicando

que el fenotipo *cag* influye en la topografía de la colonización dentro del estómago (Covacci y Rappuoli, 1998). El SST4 es un complejo de proteínas que se ensamblan formando una estructura parecida a una aguja que permite la secreción y translocación de moléculas efectoras como CagA dentro de las células del epitelio gástrico. Dentro de la célula epitelial, CagA induce fenotipos asociados con la transformación oncogénica, como la proliferación incrementada e invasión celular (Denic *et al.*, 2020). Ratones transgénicos que expresan la proteína CagA desarrollan hiperproliferación de células del epitelio gástrico y adenocarcinomas, tanto en el estómago como en el intestino (Ohnishi *et al.*, 2008), por lo que *cagA* es el primer oncogén bacteriano descrito.

1.1.4. Adhesinas

Las adhesina más estudiada y caracterizada en *H. pylori* es BabA (Blood group Antigen-Binding Adhesin), que pertenece a la familia de las proteínas de membrana externa S (HopS) (Baj *et al.*, 2021; Matsuo *et al.*, 2017; Ilver *et al.*, 1998), tiene características similares a las que se observan en los antígenos sanguíneos Lewis (Yamaoka, 2008). Las adhesinas bacterianas, al acoplarse a los receptores de las células del hospedero: antígenos del grupo sanguíneo H-tipo 1 y ABO/Lewis b (Le^b), inducen cambios inmediatos mediante señales de transducción, permitiendo la infiltración de células inflamatorias, pero también estableciendo mecanismos para evadir la respuesta inmune y establecer lo ya mencionado como una infección persistente (Baj *et al.*, 2021; Ansorg y Schmid, 1998).

Otra de las adhesinas principales que expresa *H. pylori*, es la adhesina SabA (Sialic acid-binding adhesin). Esta adhesina es una proteína de membrana externa P (HopP)

y al igual que otras adhesinas de *H. pylori* (BabA (HopS), HopQ, LabA, OipA (HopH) y AlpAB (HopC/B)), median una asociación fuerte de la bacteria con el epitelio y así facilitan la exposición de otros factores de virulencia, dando como resultado un incremento de la inflamación y daño a la mucosa gástrica (Matsuo *et al.*, 2017). La adhesina SabA reconoce glicosfingolípidos que tienen estructuras de ácido siálico (sialilado Lewis X / un glicosfingolípidos sLe^x y sLe^a (Baj *et al.*, 2021; Matsuo *et al.*, 2017). La proteína SabA se expresa cuando *H. pylori* predomina en el estómago inflamado crónicamente (Mahdavi *et al.*, 2002). La expresión de *sabA* funcional está sujeta a variación de fase debido a la presencia de repetidos de oligonucleótidos cercanos al inicio del gen. La colonización con cepas que expresan *sabA* está asociada con un riesgo incrementado de cáncer gástrico (Yamaoka *et al.*, 2006).

La proteína de membrana externa Q (HopQ), es un factor de virulencia importante en la supervivencia bacteriana en el microambiente ácido, así como en la adherencia a las células epiteliales gástricas, la colonización y progresión en dolor gastrointestinal. Hay dos tipos de HopQ el tipo 1 y el 2, el tipo1 está presente en la mayoría de las cepas *cagA*-positivas a y *vacA*-tipo s1, fenotipos con lo que se favorece el riesgo de úlcera péptica. El tipo 2 está más asociado con dispepsia no ulcerosa (NUD) y gastritis ligeramente severa, la presencia de los dos alelos tipo 1 y 2 facilita significativamente el riesgo de NUD (Matsuo *et al.*, 2017).

HopQ se une a moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM), principalmente CEACAM1, CEACAM3, CEACAM5 y CEACAM6 del huésped (Baj *et al.*, 2021; Denic *et al.*, 2020 Javaheri *et al.*, 2016; Königer *et al.*, 2016).

1.1.5. Citotoxina vacuolizante VacA

La citotoxina VacA de *H. pylori* es una proteína de aproximadamente 95 kDa, es uno de los factores de virulencia cruciales que permite la colonización bacteriana y la supervivencia en el epitelio gástrico, el gen *vacA* está presente en todas las cepas de *H. pylori*. VacA se une a los receptores parecidos a la proteína tirosina fosfatasa α y β (RPTP α y RPTP β) y forma poros en las membranas de las células epiteliales y permite la salida de aniones y urea deteriorando el tráfico endolisosomal del huésped, causando una acumulación de lisosomas y autofagosomas disfuncionales (Denic *et al.*, 2020, Baj *et al.*, 2021). También favorece la separación de las uniones epiteliales, lo que hace posible el paso de los nutrientes a través de la barrera mucosa en beneficio de la bacteria (Palframan *et al.*, 2012; Rassow y Meinecke, 2012). Las cepas de *H. pylori* con diferentes alelos de *vacA* exhiben una gran variedad de fenotipos, probablemente relacionados con diversas enfermedades gastroduodenales. Este gen tiene dos regiones diferenciadas, una de 0.5 kb que corresponde a la región de una secuencia señal, denominada *vacAs* y otra región de 0.73 kb que corresponde a la región media, conocida como *vacAm*. La región señal del gen *vacAs* codifica para un péptido señal y para el extremo amino de la toxina *vacA* procesada. Respecto de esta región se conocen dos tipos: el tipo *s1* es completamente activo, mientras que el tipo *s2* tiene un extremo amino corto que bloquea la formación de vacuolas y disminuye la formación de poros en las membranas eucariotas. Las cepas *vacAs2* son raramente aisladas de pacientes con úlceras pépticas o adenocarcinoma gástrico (Atherton *et al.*, 2001). La región *vacAm* codifica la parte del dominio de unión de la toxina a la célula. Basados en la secuencia de nucleótidos de esta región, las cepas se clasifican en dos

familias de alelos: el alelo tipo m1 para las cepas de *H. pylori* que tienen actividad citotóxica y el alelo m2 para las cepas que carecen de ésta. Hasta ahora se reconocen varios genotipos *vacA*: s1, s2, m1, m2, s1m1, s1m2, s2m2 y s2m1. El genotipo VacA s1 es uno de los más abundantes en pacientes infectados con *H. pylori*, este genotipo se asocia a ulcera péptica. El genotipo s1m1, se asocia con gastritis crónica, mientras que s1 y m1 son los genotipos más prevalentes en cáncer gástrico (Baj *et al.*, 2021; Atherton *et al.*, 2001).

1.1.6. Envoltura celular

La envoltura celular de *H. pylori* está compuesta por la membrana interna (fosfolípidos anclados por peptidoglicanos dentro de los que se incluyen la mureína y proteína de unión a penicilina: PBP; la pared celular y la membrana externa (adhesinas, lipopolisacáridos y porinas).

La membrana interna bacteriana está compuesta por una red estructurada de fosfolípidos anclados por peptidoglicanos, dentro de los que se encuentran la mureína y las proteínas de unión a penicilina (PBPs) (Barragan *et al.*, 2014; Doig *et al.*, 1999). Los componentes de la envoltura celular son los primeros puntos de contacto entre los patógenos bacterianos y el hospedero.

Otros componentes de la envoltura celular como el peptidoglicano, las PBPy el lipopolisacárido han sido relevantes en la fisiología y virulencia de *H. pylori* (Li *et al.*, 2017; Sycuro *et al.*, 2012).

El peptidoglicano de *H. pylori* difiere sustancialmente del de *E. coli* ya que contiene altas proporciones de muropéptidos, con una cadena de pentapéptidos que terminan en glicina y contienen ácido 1-6-anhidro-*N*-acetilmurámico. Esa estructura carece de lipoproteínas unidas a la mureína, muropéptidos triméricos y (1-D) muropéptidos entrecruzados. El genoma de *H. pylori* tiene homólogos para todas las enzimas necesarias para la síntesis citoplasmática de precursores requeridos para el ensamblaje del peptidoglicano. Con base en la homología de las secuencias aminoacídicas, el genoma de *H. pylori* codifica para todas las enzimas involucradas en la síntesis citoplásmica del disacárido-pentapéptido, comenzando con la síntesis de ácido UDP-*N*-acetilmurámico y terminando con el UDP-disacárido-pentapéptido unido a un transportador de lípido undecaprenilo. La síntesis de ácido UDP-*N*-acetilmurámico es la etapa crítica en este proceso. En este sentido, el gen *mraY* codifica para una proteína integral de membrana involucrada en la síntesis de la pared celular con actividad de fosfo-*N*-acetil-muramil-pentapéptido transferasa, la cual cataliza la primera reacción ligada a lípidos que ensamblan la capa del peptidoglicano a la pared celular bacteriana. La estructura del peptidoglicano de *H. pylori* tiene varias características únicas relacionadas con el grado de entrecruzamiento, el cual refleja el porcentaje del número total de residuos de ácido diaminopimélico que están unidos en los enlaces de los péptidos entrecruzados (Moblely, 1996). En *H. pylori*, este grado es de alrededor de 17%, el cual es uno de los grados más bajos de entrecruzamiento, comparándolo con *E. coli* (25-30%), *Neisseria* spp. (36-44%), *Vibrio* spp. (30%), *Proteus* spp. (33-37%), *Moraxella* spp. (25-45%) y *Pseudomonas* spp. (25-45%) (Moblely, 1996).

Después del transporte a través de la membrana citoplasmática, los precursores del peptidoglicano son incorporados en la capa de peptidoglicano por las PBPs. Estas son un grupo de proteínas que se caracterizan por su afinidad y unión con la penicilina, son acil-serina transferasas que participan en el ensamblaje, integridad y dinámica de la matriz de peptidoglicano (Sauvage *et al.*, 2008). Se han identificado ocho PBPs en *H. pylori* 26695, PBP1 fue la primera identificada y actualmente la más estudiada (Barragan *et al.*, 2014; Rimbara *et al.*, 2008; Paul *et al.*, 2001;). PBP1 posee un peso molecular de 66 kDa y tiene la característica de ser bifuncional con actividades de transglicosilasa y DD-transpeptidasa en un solo polipéptido. Su función consiste en el alargamiento de las hebras de peptidoglicano y la formación del entrecruzamiento entre los péptidos de peptidoglucano, por lo que su inhibición interfiere con la síntesis de peptidoglicano y crecimiento celular; también presenta una variedad en su secuencia de ADN (Krishnamurthy *et al.*, 2001; Matta *et al.*, 2022; Okamoto, 2002; Rimbara *et al.*, 2008).

El lipopolisacárido (LPS) es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram (-); es de gran relevancia debido a sus características de adherencia, endotóxicas e inflamatorias, Está formado por tres componentes principales: la región lipídica corresponde a un glicolípido llamado lípido A (endotoxina); la región glicosídica a un heteropolisacárido llamado núcleo o *core*, ambas regiones están unidas por un KDO (2-ceto-3-desoxioctanato) y éste a su vez va unido al antígeno O, la tercera región glicosídica. De las tres regiones, el lípido A es la fracción biológicamente activa, su estructura consta de un disacárido (glucosamina) unido a ácidos grasos (caproico, laúrico, mirístico, palmítico y esteárico). Finalmente, el LPS es uno de los factores de

virulencia más complejos en la patogénesis bacteriana, ya que funciona como endotoxina cuando las bacterias son fagocitadas por células fagocíticas. El antígeno O es la región más externa del LPS expresada en la superficie bacteriana, lo que le permite desencadenar no solo la respuesta inmune celular sino también la respuesta innata. Algunas mutaciones en el locus *rfb*, cuyos genes participan en la síntesis y ensamblaje de la cadena O producen cepas rugosas, a diferencia de las cepas silvestres o *wild-type*, las cuales crecen con un fenotipo liso. El gen *waaL* tiene un papel clave en la formación de un LPS completo que consiste en el OS (oligosacárido core) del núcleo del lípido A y el antígeno O. WaaL se caracteriza por presentar múltiples hélices transmembranales (TM) y un bucle periplásmico relativamente grande cerca del extremo C-terminal. Posiblemente, los aminoácidos expuestos a la cara periplásmica de la membrana son importantes para la actividad de WaaL, ya que podrían interactuar con las moléculas donantes yceptoras (Hug *et al.*, 2010; Ruan *et al.*, 2012). En términos del LPS, la enzima WaaL es una enzima con actividad de lípido A-núcleo-O-antígeno-ligasa, la cual participa en el último paso de biosíntesis de LPS, que consiste en la transferencia del polisacárido O desde el undecaprenil pirofosfato (Und-PP) al lípido A-core (Hug *et al.*, 2010). Se ha reportado que las mutaciones en el gen *waaL* impiden la unión de las moléculas del antígeno O al sistema operativo del núcleo A del lípido lo que da como resultado bacterias que producen LPS desprovisto de polisacárido del antígeno O (LPS "áspero") y también acumulan antígeno O unido a moléculas intracelulares de Und-PP intracelular. WaaL es considerado un excelente objetivo para desarrollar moléculas inhibitoras que podrían servir como nuevos factores antivirulencia (Ruan *et al.*, 2012).

1.2. Reguladores transcripcionales de *H. pylori*

Helicobacter pylori 26695 aislada de un paciente con gastritis en el Reino Unido fue la primera cepa secuenciada (Tomb *et al.*, 1997). El genoma tiene un tamaño de 1,667,867 pb (1.67 Mb) de longitud y un marco de lectura abierta para 1590 genes, de los cuales 899 son funcionales (Alm y Noonan, 2001). Dentro de estos últimos se incluyen los que codifican para los factores de virulencia, los cuales son fundamentales en la patogenicidad de esta bacteria.

A diferencia de otras enterobacterias, como *E. coli* que posee seis factores sigma, *H. pylori* posee solamente tres: RpoD, RpoN, y FliA. Además, la expresión de los factores de virulencia de *H. pylori* está controlada principalmente por 13 reguladores transcripcionales: HrcA, ArsR, Fur, FlgR, HspR, Hup, CrdR, NikR, HsrA, CheY, HP0222, HP0564 y HP1021 (Danielli *et al.*, 2010; De la Cruz *et al.*, 2017). Estos 13 reguladores transcripcionales (Tabla 1) controlan la expresión de genes implicados en la supervivencia, el metabolismo y la patogenicidad bacteriana (Danielli *et al.*, 2010; De la Cruz *et al.*, 2017). Este repertorio de reguladores transcripcionales tan reducido en *H. pylori* sugiere que los reguladores transcripcionales actúan a través de redes altamente interconectadas (Danielli *et al.*, 2010).

Tabla 1: Reguladores transcripcionales de *H. pylori*

Proteína	Gen	Secuencia referencia
Factores sigma		
RpoD (σ^{80})	<i>hp0088</i>	NP_206888.1
RpoN (σ^{54})	<i>hp0714</i>	NP_207508.1
FliA (σ^{28})	<i>hp1032</i>	NP_207822.1
Factores transcripcionales		
NikR	<i>hp1338</i>	NP_208130.1
Fur	<i>hp1027</i>	NP_207817.1
CheY	<i>hp1067</i>	NP_207858.1
HrcA	<i>hp0111</i>	NP_206911.1
ArsR	<i>hp0166</i>	NP_206965.1
FlgR	<i>hp0703</i>	NP_207497.1
HspR	<i>hp1025</i>	NP_207815.1
HsrA	<i>hp1043</i>	NP_207833.1
Hup	<i>hp0835</i>	NP_207628.1
CrdR	<i>hp1365</i>	NP_208157.1
HP1021	<i>hp1021</i>	NP_207811.1
HP0564	<i>hp0564</i>	NP_207359.2
HP0222	<i>hp0222</i>	NP_207020.1

Danielli *et al.*, 2010; De la Cruz *et al.*, 2017

Aunque existen muchos estudios de expresión por microarreglos en *H. pylori*, en los cuales diferentes señales ambientales como el pH ácido, hierro, así como también la fase de crecimiento o la adherencia a células epiteliales de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) afectan la expresión de los genes de virulencia (Ang *et al.*, 2001; Bury-Moné *et al.*, 2004; Merrell *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2003; Wen *et al.*, 2003), se sabe poco de la regulación de la expresión de los factores de virulencia de *H. pylori* (Szczepara *et al.*, 1999, Danielli *et al.*, 2010; De la Cruz *et al.*, 2017).

Nuestro grupo de trabajo ha reportado el efecto de algunas señales ambientales sobre la expresión de los reguladores transcripcionales en *H. pylori*, incluyendo genes

regulatorios involucrados en la formación de biopelícula a células epiteliales de AGS. La expresión de los reguladores transcripcionales *hrcA*, *hup* y *crdR* se incrementa con urea, níquel y hierro, también se observó una regulación positiva en la expresión de los reguladores *rpoD*, *flgR*, *hspR* y *cheY* en presencia de las células epiteliales de AGS (De la Cruz *et al.*, 2017).

Existen estudios recientes de algunos reguladores transcripcionales en los que se describe más a detalle su función y su posible mecanismo regulatorio. En el regulador transcripcional HsrA, el cual es esencial para la supervivencia de la bacteria, se encontraron 37 sitios de unión en el DNA cromosomal para este regulador, donde 33 de esos sitios se localizaron en regiones promotoras y se confirmó el motivo de unión de este regulador. Los genes identificados como regulados por HsrA están involucrados en procesos celulares como traducción, transcripción y metabolismo energético, sugiriendo que HsrA podría ser un interruptor regulatorio potencial en la modulación del metabolismo y el crecimiento (Pelliciani *et al.*, 2017). En el caso del regulador NikR, además de su función conocida en la homeostasis de metales, se encontró que regula los factores de virulencia, sistemas toxina-antitoxina y RNA no codificante en presencia de níquel (Vannini *et al.*, 2017). La homeostasis del níquel es de gran importancia para *H. pylori*, ya que incluye la regulación de los transportadores y las proteínas de unión a metales, pero también bucles de retroalimentación que regulan el propio NikR. En contraste con HsrA, este estudio también reveló una extensa unión intergénica por NikR. Sin embargo, esta unión no parece afectar claramente los niveles de transcripción, lo que sugiere otras funciones de NikR en la regulación. Otro regulador en escrutinio es CsrA, el cual se cree que tiene participación

en la regulación, al participar en la regulación de los genes flagelares a través del control del factor sigma alternativo RpoN. En otro estudio, se analizaron los perfiles de transcripción de la cepa *H. pylori* J99 y una mutante isogénica *csrA*, identificándose 53 genes expresados diferencialmente en dicha mutante, la mayoría con niveles disminuidos (Kao *et al.*, 2017). Entre estos, identificaron el gen *jhp0106* con función desconocida adyacente al gen flagelar *flaB*. Un análisis más detallado de *jhp0106* (*hp0114*) reveló que era una glicosiltransferasa putativa que participa en la glicosilación de flagelina y la formación de flagelos, expresada bajo el control del promotor *flaB* y la mutación de *jhp0106* condujo a la pérdida de motilidad (Kao *et al.*, 2017). La proteína Fur está ampliamente estudiada en *E. coli*, pero en *H. pylori* los mecanismos de regulación genética son en gran parte desconocidos. En *E. coli* se sabe que Fur es un represor transcripcional que regula positivamente los genes que codifican para los sistemas de absorción de hierro, siendo un sensor directo para la concentración interna de hierro. La represión de los sistemas de absorción de hierro también protege a las células de la sobrecarga de hierro, previniendo la formación de radicales tóxicos de oxígeno (los genes que codifican para la superóxido dismutasas, que también forman parte del regulón Fur). Fur impide la transcripción de los genes blanco al unirse a un motivo de DNA operador conservado en la llamada caja Fur, presente en las regiones promotoras de los genes blanco. Este motivo está conservado entre bacterias y se ha demostrado que Fur de *E. coli* interactúa con los sitios de operadores Fur presentes en los genes blanco de otras especies bacterianas. *H. pylori* ha desarrollado sistemas de alta afinidad para la absorción del hierro de la lactoferrina humana y de la hemina. Se han identificado los receptores

correspondientes y se ha demostrado que la expresión de estas proteínas está regulada por el hierro de manera similar a Fur. Junto con el descubrimiento de que varias proteínas se producen exclusivamente cuando *H. pylori* se somete a estrés por hierro, la caracterización de las proteínas de unión a hemina y lactoferrina dio los primeros indicios de que podría existir un sistema de regulación similar a Fur en *H. pylori* (Bereswill *et al.*, 1998).

1.3. Ácidos grasos de cadena larga (AGCL)

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos, que pertenecen al grupo de los lípidos y que forman parte de los fosfolípidos y glucolípidos, de la bicapa lipídica de todas las membranas celulares. Su estructura está compuesta por una serie repetida de grupos metilo (una cadena lineal hidrocarbonada de diferente longitud) y un grupo carboxilo en el extremo: $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$ (Nelson *et al.*, 2017). Dependiendo de la longitud de la cadena, pueden ser ácidos grasos de cadena corta (2 a 6 átomos de carbono), de cadena media (8 a 12 carbonos) y de cadena larga (14-22 carbonos), aunque no hay un consenso en cuanto al número exacto de carbonos y la designación del tipo de cadena (Kaur *et al.*, 2014). Los ácidos grasos pueden ser saturados, o sea que no tienen enlaces dobles en su estructura, e insaturados los cuales sí los presentan y son sólidos o líquidos a temperatura ambiente, respectivamente. Dentro de los ácidos grasos saturados (SFA's, por sus siglas en inglés) se encuentran el ácido palmítico (PA, por sus siglas en inglés) C16:0, y el ácido esteárico (SA, por sus siglas en inglés) C18:0. Dependiendo del número de enlaces dobles, pueden ser ácidos grasos monoinsaturados (MUFA's, por sus siglas en inglés) como lo es el ácido oleico (OA,

por sus siglas en inglés) C18:1, el cual presenta solo un enlace doble en su estructura; y ácidos grasos polinsaturados (PUFA's, por sus siglas en inglés), los cuales tienen más de un enlace doble. Los PUFA's se dividen en ácidos grasos esenciales (no pueden ser sintetizados en el cuerpo y deben ser proporcionados por los alimentos, ya que son necesarios para la salud): estos son los ácidos grasos omega 3 (n-3 ó ω -3) y los omega 6 (n-6 ó ω -6). Este nombre hace referencia a la posición del enlace doble, así los n-3 tienen su enlace doble en la posición 3 (tercera unión del grupo metilo final del ácido graso) mientras que en los ácidos grasos n-6 lo tienen en la posición 6 (Kaur *et al.*, 2014; Kenar *et al.*, 2017). Los ácidos grasos n-3 son el ácido linolénico (ALA, por sus siglas en inglés) C18:3n-3, estearidónico (SDA, por sus siglas en inglés) C18:4n-3, el ácido eicosapentaenoico (EPA, por sus siglas en inglés) C20:5n-3 y el ácido docosahexaenoico (DHA, por sus siglas en inglés) C22:6n-3. Los ácidos grasos n-6, son el ácido linoleico (LA) C18:2n-6 y el ácido araquidónico (AA) C20:4n-6. Este último está involucrado en inflamación, enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades relacionadas con la edad (Park *et al.*, 2015). Los ácidos grasos n-3 son beneficiosos en la salud, ya que tienen un efecto protector en contra de enfermedades cardiovasculares, artritis reumatoide, diabetes y cáncer; debido a sus características antioxidantes y antiinflamatorias (Park *et al.*, 2015). Correia y colaboradores (2012), mostraron que el DHA inhibe el crecimiento de *H. pylori in vitro* y la colonización de la mucosa gástrica en ratones, esto por disrupción de la membrana celular de esta bacteria conduciendo a la lisis bacteriana, por lo cual se le atribuye un efecto también antibiótico a este ácido graso (Thompson *et al.*, 1994). Otro efecto *in vitro* del DHA en la infección en *H. pylori*, es la disminución de la inflamación debido a

la disminución de IL-8, de las células epiteliales de AGS infectadas con *H. pylori* (Correia *et al.*, 2013).

Los ácidos grasos, en general, tienen múltiples funciones: energética, estructural y regulatoria. A nivel energético, los ácidos grasos son necesarios en los procesos celulares ya que, a través de estos, se toma energía necesaria cuando la concentración de insulina es baja o la glucosa es insuficiente en los procesos celulares, o cuando el organismo quema ácidos grasos y origina cuerpos cetónicos. La función estructural de los ácidos grasos se debe a que los ácidos grasos son componentes fundamentales de los fosfolípidos y esfingolípidos, moléculas que forman parte de la bicapa lipídica de las membranas de todas las células. En cuanto a la función reguladora, los ácidos grasos son precursores de las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, moléculas con una gran actividad biológica, que intervienen en la regulación y control de numerosos procesos vitales, como la respuesta inflamatoria, regulación de la temperatura corporal, procesos de coagulación sanguínea y contracción del músculo (Kenar *et al.*, 2017).

1.3.1. Ácido palmítico

El ácido palmítico, o también llamado ácido hexadecanoico, es el principal ácido graso saturado de cadena larga. La fórmula molecular del PA es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ o $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$ y la forma simplificada es C16:0. El ácido palmítico, es el más abundante en el aceite de palma (44%), seguido del ácido oleico (39.2%) y del ácido linoleico (10.1%) y también se produce de manera natural en animales, vegetales y en la leche materna. También es el principal ácido graso que se encuentra naturalmente en animales y

vegetales y en la grasa de la leche humana (Fattore y Fanelli, 2013; Mancini *et al.*, 2015).

1.3.2. Ácido esteárico

El ácido esteárico, o también llamado ácido octadecanoico, es un ácido graso saturado de cadena larga, cuya fórmula molecular es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ o $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ y la forma simplificada es C18:0. Este ácido graso está presente en varias grasas de animales y vegetales y es un componente importante de la manteca de cacao y la de karité («PubChem Compound Summary for CID 5281, Stearic Acid», 2022).

1.3.3. Ácido oleico

El ácido oleico, también llamado ácido *cis*-9-octadecenoico, es el representante principal de los ácidos grasos mono insaturados; es un ácido graso omega 9 (n-9), no esencial, cuya fórmula molecular es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ o $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ y la forma simplificada es C18:1; n-9. Este ácido graso es un producto que se encuentra en *Ventilago denticulata* e *Hypera meles*, una especie de planta y un gorgojo del trébol, respectivamente («PubChem Compound Summary for CID 445639, Oleic Acid.», 2022). El ácido oleico está presente en el aceite de oliva (55-80%) y en la semilla de uva (15-20%) y en menor proporción en los aceites de soja, palma y maíz (Choi *et al.*, 2010).

1.3.4. Ácido linoleico

Es un ácido graso polinsaturado esencial (n-6), también conocido como octadecadienoico; es el precursor del ácido araquidónico (AA) C20:4 n-6 (Park *et al.*, 2015). Su fórmula molecular es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ o $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ y la forma simplificada es C18:2 (9,12) («PubChem Compound Summary for

CID 5280450, Linoleic Acid», 2022). Este ácido graso es el PUFA más consumido en la dieta humana (88%), ya que está presente en el 70-85% de la carne (puerco, pollo y res); y en más del 80% en el huevo; en los aceites vegetales como el de soja o soya (70%); en las nueces y las semillas. Los alimentos manufacturados también contienen 45% de ácido linoleico (Whelan y Fritsche, 2013).

1.3.5. Ácido linolénico

Es un ácido graso polinsaturado esencial (n-3), también conocido como ácido cis-9,12,15-octadecatrienoico, es el precursor de los PUFA n-3 de cadena larga; su fórmula molecular es $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ o $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$ y la forma simplificada es C18:3 (9,12,15); n-3 («PubChem Compound Summary for CID 5280934, Linolenic Acid», 2022). Existen dos isómeros en la naturaleza, el alfa-linolénico (α ,) y gamma-linolénico (γ). La fuente más rica de ALA es el aceite de linaza (57% de los ácidos grasos totales), también es abundante en semillas de lino y en pequeñas cantidades (7-13%) en canola, cáñamo, soya, nueces. En general, se ha visto que los AGPI n-3 tienen un efecto protector en las enfermedades cardiovasculares (ECV), el mecanismo no es claro, pero se propone la capacidad que tienen los AGPI n-3 para promover la coagulación sanguínea y la trombosis, el perfil de los lípidos plasmáticos, la presión sanguínea, la arritmia y la inflamación. Los efectos ateroprotectores de AGPI n-3, provienen principalmente de su incorporación a los fosfolípidos de las membranas de las células (Carrero *et al.*, 2005).

2. ANTECEDENTES

Los lípidos son biomoléculas cruciales que poseen funciones estructurales y de fuentes de energía. Los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) son lípidos que, además de estas funciones, actúan como moléculas de señalización tanto en células eucariotas como procariontes. En este sentido, las bacterias patógenas han desarrollado mecanismos de transducción de señales capaces de detectar AGCL para controlar la expresión de sus genes de virulencia.

2.1. Efecto de los AGCL sobre la expresión transcripcional de los factores de virulencia en bacterias patógenas

En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, los ácidos oleico, mirístico y palmítico (a una concentración de 0.3 mM) reprimen la expresión de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) que codifica para el sistema de secreción tipo 3 (SST3) que es necesario para la invasión de células epiteliales intestinales (Golubeva *et al.*, 2016). Esta represión fue debida a la unión directa de los ácidos grasos al regulador transcripcional HilD, bloqueando su actividad de unión a DNA. Los ácidos araquidónico, oleico y linoleico (a una concentración de 0.3%) suprimieron la producción de la toxina del cólera de *Vibrio cholerae* (Chatterjee *et al.*, 2007). En contraste, el ácido linoleico (a una concentración de 0.03%) aumentó la motilidad de *V. cholerae* estimulando la transcripción del regulador transcripcional flagelar FlrA. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, la mutagénesis de dos acil-CoA sintetasas (FadD1 y FadD2) demostró que los AGCL son importantes fuentes nutritivas para la replicación bacteriana en un modelo murino de infección pulmonar (Kang *et al.*, 2010).

Para *M. tuberculosis*, tanto los AGCL como el colesterol afectaron la expresión de diversos genes que codifican para factores de virulencia de esta bacteria, ya que son parte estructural de las células del sistema inmune que forman el granuloma (Ehrt y Schnappinger, 2007; Mendum *et al.*, 2015). Con respecto a los lípidos, en *H. pylori* sólo existe un reporte del efecto del colesterol sobre esta bacteria, usando dicho compuesto como sustituto del suero fetal bovino en los medios condicionados para el crecimiento de *H. pylori* en caldo Brucella, donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ambos medios, sin embargo en los medios suplementados con colesterol, se obtuvo un mejor crecimiento bacteriano y una fase exponencial más prolongada (Jiménez-Soto *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay un estudio que evalué el efecto de los AGCL sobre la expresión génica de los factores de virulencia de *H. pylori*.

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori, una bacteria que infecta la mucosa gástrica y que participa en el desarrollo, del cáncer gástrico debido a la presencia de genes que codifican para factores de virulencia y obviamente, su expresión en el hospedero. A pesar de los exhaustivos estudios sobre la patogénesis de *H. pylori*, existen muy pocos reportes sobre cómo la bacteria regula transcripcionalmente sus factores de virulencia. En este sentido, los AGCL afectan tanto positiva como negativamente a la expresión de factores de virulencia en diversas bacterias patógenas. Actualmente no se cuenta con reportes que describan el efecto de los AGCL sobre la expresión de los factores de virulencia de *H. pylori*. Los AGCL forman parte tanto de la dieta como de las membranas de las células del epitelio gástrico, los datos generados sobre el efecto de estos lípidos en la expresión transcripcional de los factores de virulencia de *H. pylori* nos ayudarán a tener mayor información sobre la etiología del cáncer gástrico mediado por esta bacteria.

4. HIPÓTESIS

La transcripción de los genes que codifican los factores de virulencia de *H. pylori* será afectada por la presencia de los AGCL.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Determinar el efecto de los AGCL sobre la expresión transcripcional de factores de virulencia en *H. pylori*.

5.2.1 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de los AGCL en la expresión génica del SST4 codificado en la Isla de patogenicidad *cag*.
2. Cuantificar la transcripción de los flagelos y adhesinas en presencia de los AGCL.
3. Determinar la expresión de genes de envoltura celular bajo el efecto de los AGCL.
4. Analizar el efecto de los AGCL en la expresión génica de la citotoxina VacA y la ureasa.
5. Determinar la expresión de los 10 genes reguladores de *H. pylori* bajo el efecto de los AGCL.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento.

La cepa de referencia *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) se incubó en agar *Brucella* (BBL™ Ref. 211088) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco® Ref. 16000-044) al 10% y se incubó a 37°C en una atmósfera microaerofílica de 10% CO₂, de 2 a 3 días (Incubadora de CO₂ Thermo Scientific™ Mod. RCO3000T-5-ABC). Posteriormente, se realizó una suspensión bacteriana en 5 mL de caldo *Brucella* SFB 10%. El inóculo se ajustó a una densidad óptica (DO) de 0.1 a 600 nm (Espectrofotómetro UNICO® 1100 RS) en 15 mL de caldo *Brucella* SFB 10% y vancomicina (clorhidrato de vancomicina de *Streptomyces orientalis* Sigma-Aldrich® V2002) 10 µg/mL, en una botella de cultivo celular con tapa de ventilación (Falcon® 25 cm²) y se incubó a 37°C con 10% CO₂, durante 24 h, con agitación constante (Mezclador Vórtex VELP® Scientifica) empleando un agitador magnético.

6.2. Cinética de crecimiento de *H. pylori* 26695

La cinética de crecimiento se realizó midiendo la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) y realizando diluciones seriadas 1:10 del cultivo de *H. pylori* 26695 en caldo *Brucella* SFB 10% en intervalos de 12 h durante 5 días.

6.3. Diseño, síntesis y especificidad de los oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para la amplificación de los genes que codifican para factores de virulencia de *H. pylori* 26695, así como los genes reguladores transcripciones de *H. pylori* se muestran en la tabla 2, donde se señala el producto que codifican y la función de cada uno de ellos. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando el software “Primer3 plus”; considerando la T_m entre 57 y 59°C, así como un amplicón entre 100 y 172 pb.

Una vez diseñados, los oligonucleótidos se enviaron a sintetizar al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Tabla 2. Genes que codifican para factores de virulencia y reguladores transcripcionales de *H. pylori*¹, empleados en este estudio.

Gen	Producto	Función
<i>cagA</i>	Proteína efectora translocada por el SST4	Proteína oncogénica que produce proliferación celular del epitelio gástrico
<i>cagL</i>	Adhesina sobre la superficie del <i>pili</i>	Se une a la integrina $\beta 1$ de las células del epitelio gástrico
<i>cagM</i>	Proteína estructural localizada en el canal transmembranal	Componente estructural del SST4
<i>flaA</i>	Subunidad flagelar A	Componente estructural del flagelo
<i>flaB</i>	Subunidad flagelar B	Componente estructural del flagelo
<i>ureA</i>	Subunidad enzimática A de la ureasa	Componente estructural apoenzimático A
<i>ureB</i>	Subunidad enzimática B de la ureasa	Componente estructural apoenzimático B
<i>vacA</i>	Citotoxina vacuolizante	Produce vacuolización de células del epitelio gástrico
<i>babA</i>	Adhesina BabA	Estructura relacionada con la adhesión de <i>H. pylori</i> a los antígenos sanguíneos Lewis
<i>sabA</i>	Adhesina SabA	Estructura relacionada con la interacción de <i>H. pylori</i> a los antígenos de Lewis x sializados
<i>hopQ</i>	Adhesina HopQ	Ayuda al SST4 en la translocación de CagA, uniéndose a antígenos CAMPS
<i>mraY</i>	fosfo-N-acetil-muramil pentapéptido transferasa	Biosíntesis del peptidoglicano
<i>pbp1A</i>	Proteína de unión a penicilina 1A (PBP1A)	Transferasa involucrada en la biosíntesis del peptidoglicano
<i>waaL</i>	Ligasa de antígeno O	Síntesis del LPS, une el lípido A con el antígeno O

<i>nikR</i>	Regulador transcripcional NikR, (HP1338)	Regulador pleiotrópico de respuesta a níquel, homeostásis de metales (Cu, Fe, Ni), adaptación ácida, consumo/almacenamiento de hierro, motilidad, quimiotaxis, respuesta a estrés, colonización del ratón.
<i>fur</i>	Regulador transcripcional Fur, (HP1027)	Regulador pleiotrópico involucrado en adaptación ácida, homeostásis de metales y colonización de ratón/gerbo mongol
<i>cheY</i>	Regulador transcripcional CheY, (HP1067)	Quimiotaxis, motilidad, colonización de ratón/gerbo mongol
<i>hrcA</i>	Regulador transcripcional HrcA, (HP0111)	Involucrado en choque térmico, respuesta al estrés y motilidad
<i>arsR</i>	Regulador transcripcional ArsR, (HP0166)	Adaptación ácida, metabolismo de la acetona, respuesta a estrés oxidativo y formación de biofilm
<i>flgR</i>	Regulador transcripcional FlgR, (HP0703)	Regulador maestro dependiente de RpoN de los genes flagelares clase II
<i>hspR</i>	Regulador transcripcional HspR, (HP1025)	Choque térmico, respuesta a estrés ácido/osmótico y motilidad
<i>hsrA</i>	Regulador transcripcional HsrA, (HP1043)	Viabilidad celular, estrés oxidativo, virulencia, respuesta a metronidazol
<i>hup</i>	Regulador transcripcional HU, (HP0835)	Respuesta a estrés ácido, protección de DNA de estrés oxidativo, involucrado en colonización del ratón
<i>crdR</i>	Regulador transcripcional CrdR, (HP1365)	Resistencia a cobre, supervivencia bajo estrés nitrosativo y colonización del ratón
<i>rrnA16S</i>	rRNA16S	RNA ribosomal 16S

¹Se muestra el gen, el producto para el cual codifica y la función del mismo en *H. pylori*. De la Cruz *et al.*, 2017

6.3.1. Extracción de DNA de *H. pylori* 26695

La extracción del DNA genómico, se realizó de acuerdo a la metodología descrita previamente (Pitcher *et al.*, 1989). Para lo anterior, la cepa de referencia *H. pylori* 26695, se incubó en agar *Brucella* SFB al 10% a 37°C en una atmósfera de 10% CO₂, de 2 a 3 días. Se cosechó el cultivo bacteriano con un hisopo estéril y se resuspendió en 1 mL de PBS. Se obtuvo la pastilla bacteriana centrifugando a 13000 rpm durante 5 min y se adicionaron 500 µL de regulador de lisis: reactivo de GES (60 g tiocianato de guanidina, 20 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, 5 mL sarcosyl 10% y 100 mL agua destilada), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionaron 250 µL de acetato de amonio 7.5 M (previamente enfriado). Se incubó en hielo durante 5 min, luego se adicionaron 650 µL de cloroformo, se mezcló suavemente y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. La fase superior acuosa (la parte superior) se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le adicionó 0.54X volúmenes de isopropanol. Para obtener el DNA precipitado, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min. Finalmente se realizaron 2 lavados con 500 µL de etanol al 70%. Para eliminar el etanol remanente, los tubos con el DNA se dejaron abiertos aproximadamente 10 min. El DNA se resuspendió con 100 µL agua libre de DNasa.

El DNA se cuantificó por espectrofotometría utilizando un Nano Drop-1000 (ND-1000), se determinó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%; finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.3.2. PCR en punto final de los genes que codifican para factores de virulencia de *H. pylori* 26695.

Con el fin de confirmar que los iniciadores amplificaran específicamente el producto esperado, se realizó las PCR de punto final, las cuales se realizaron empleando el kit comercial Promega GoTaq Hot Start Polymerase™. Las reacciones se realizaron en un volumen de 15 µL que contenían: amortiguador de PCR 1X; dNTP's 0.2 mM; MgCl₂ 1.5 mM; Oligonucleótidos 0.4 µM; Taq polimerasa 0.025 U/µL y 325 ng de DNA de *H. pylori* 26695. Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador Mastercycler® de Eppendorf; las temperaturas de amplificación consistieron de un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C/5 min, posteriormente 35 ciclos con las siguientes condiciones: 94°C/30 seg, 58 o 59°C/30 seg, 72°C/50 seg y finalmente un ciclo de extensión de 72°C/5 min. Las temperaturas de alineamiento fueron: 58°C: *ureB, babA, cagA, cagM, sabA, flaB, cagL, hrcA, arsR, fur, flgR, hspR, hup, crdR, nikR, hsrA, cheY* y *rrnA16S*. 59°C: *ureA, flaA, vacA, hopQ, mraY, waaL* y *pbp1A*.

Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante un corrimiento electroforético a 80 V durante 4 horas en un gel de agarosa al 2.0% teñido con Gel Red (1X), colocando en cada pozo 5 µL de producto de PCR y usando como regulador TAE 1X.

6.4. Curvas estándar del DNA de *H. pylori* 26695

Las curvas estándar de DNA se realizaron amplificando los genes virulencia de *H. pylori* 26695: *cagA*, *cagL*, *cagM*, *sabA*, *babA*, *hopQ*, *ureA*, *ureB*, *vacA*, *flaA*, *flaB*, *waal*, *mraY*, *pbp1*, y el gen normalizador *rrnA16S* mediante PCR en tiempo real, usando el termociclador LightCycler® 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Las reacciones se llevaron a cabo en placas de 96 pozos Lightcycler®480. La mezcla de reacción para cada pozo consistió de: 1.5 µL de agua grado PCR, 1.0 µL de iniciadores 20 µM (Tabla 3), 5.0 µL de “LightCycler® 480 SYBR Green I Master” 10X y 2.5 µL de DNA de *H. pylori* (16.25, 3.25, 0.65 ng/µL). Cada reacción se realizó por cuatuplicado. Los ciclos de reacción en LightCycler® 480 (Roche) fueron 95°C durante 5 min, 30 ciclos: 95°C durante 10 s, temperaturas de alineamiento 58°C: *ureB* *cagA*, *babA*, *cagM*, *cagL*, *sabA*, *flaB* y *rrnA16S*; 59°C: *ureA*, *vacA* y *flaA* y durante 10 s y 72°C durante 10 s (en este punto se realizó la medición de la fluorescencia), 95°C durante 5 s a una velocidad de 4.4°C/s, 65°C durante 1 min a una velocidad de 2.2°C/s y 97°C durante 5 s (durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva de disociación), y un ciclo final de enfriamiento a 40°C durante 10 s. Las gráficas de las curvas estándar y de amplificación, así como las curvas de disociación, fueron obtenidas usando el software LightCycler® 480 (Roche) (Figuras suplementarias S1-S11).

Tabla 3: Oligonucleótidos para qRT-PCR

Gene	Sequence 5' 3'	Target gene	Tm (°C)
<i>cagA</i> ¹	AGC AAA AAG CGA CCT TGA AA AGC CAA TTG CTC CTT TGA GA	<i>hp0547</i>	58
<i>cagL</i>	AGA CCA ACC AAC AAG TGC TC ATC TCC TCT CAA AGC AAT GGC	<i>hp0539</i>	58
<i>cagM</i>	TAC CAA CAA GCC GCA TAC AA ACA AAA CTC CAA ACG CAA CC	<i>hp0537</i>	58
<i>flaA</i>	ACA AGT GGA TGG CGT GAA TG ACG CTC GCA TAG GCT TTA AC	<i>hp0601</i>	59
<i>flaB</i>	AAA CCA AAG CCG TTC AAG CC TTG GCC GTT AAA GCT TGT GG	<i>hp0115</i>	58
<i>urea</i>	AGC CTG GCG AAG AAA AAT CC TGC TTT CGT TGT CTG CTT GC	<i>hp0073</i>	59
<i>ureB</i>	ATC AAA GGC GGG TTC ATT GC AGC CGC TTG AGA CAC AAA AG	<i>hp0072</i>	58
<i>vacA</i> ¹	AAG CAC CAT TTG CCT TTG AC CGT TCA ATT TCA GCG TGC TA	<i>hp0887</i>	58
<i>sabA</i>	TGG CGT TTC AAA CAC ATC CG ACC GCT TGT TGC AAA ATG GG	<i>hp0725</i>	58
<i>babA</i>	ACA CCA TCA ACG AAG CAT GC AAA GCG CCG CAT ATT TTC CC	<i>hp1243</i>	58
<i>hopQ</i>	AAG CGC AAA ACC TAG CCA AC ATT CAA GGC GCC GTT ATT CG	<i>hp1177</i>	59
<i>mraY</i>	CCA TTT CTA GCT TCG TGC CAA G ACA ACA CGC TCG CAA CAA TG	<i>hp0493</i>	59
<i>pbp1</i>	CCC CAG CAA TTA TTC TCG CAA G TTC AAA GCC AAG CTG ATC GC	<i>hp0597</i>	59
<i>waaL</i>	GCT TGC TTT TTG CCA GTT GC TTG CAC CAA TGA GAG CAA GC	<i>hp1039</i>	59
<i>nikR</i> ²	CAT CCG CTT TTC GGT TTC CAT GTC GCG CAC TAA TTC TG	<i>hp1338</i>	58
<i>Fur</i> ²	GAA GAA GTG GTG AGC GTT TTG CCT TTT GGC GGA TAG AAT GC	<i>hp1027</i>	58
<i>cheY</i> ²	TGG AAG CTT GGG AGA AAC TG CAG AGC GCA CCT TTT TAA CG	<i>hp1067</i>	58
<i>hrcA</i> ²	TTT CTT GCG CAC TGG GTT AC GAA AGA AGC AGC GAT TGA GC	<i>hp0111</i>	58
<i>arsR</i> ²	GAG CGA GTT TTT GCT CCA AC GCC CGT CTA AAT TAG GCA AAG	<i>hp0166</i>	58
<i>flgR</i> ²	CAG GCC TTA AAA GTC GCA AG CGC TAT AAA AGG GTG CTT GG	<i>hp0703</i>	58
<i>hspR</i> ²	CGG GCG TGG ATA TTA TCT TG TGT TTG TGC AGA GCG TCT TG	<i>hp1025</i>	58
<i>hsrA</i> ²	GGA AGA AGT CCA TGC GTT TG CAA ACG AGC CTC AAT CCT TG	<i>hp1043</i>	58
<i>Hup</i> ²	GTG GAG TTG ATC GGT TTT GG TTA GGC ACC CGT TTG TCT TC	<i>hp0835</i>	58
<i>crdR</i> ²	CTT AGG CGT GGC TAA AAT GC CAA ACG CCC CAA AAA CAC	<i>hp1365</i>	58
<i>16S</i> ¹	GTG TGG GAG AGG TAG GTG GA GTT TAG GGC GTG GAC TAC CA	<i>rrnA16S</i>	58

¹ Cárdenas *et al*, 2016; ²De la Cruz *et al*, 2017

6.5. Ensayos de *H. pylori* 26695 en presencia de los AGCL

Se prepararon las soluciones stock de los AGCL a una concentración de 25 mM (100X), para lo cual se pesó el lípido y se adicionó 1.5 mL tiloxapol al 10% (concentración final 0.5% o 100X), (Sigma-Aldrich® T8761-50G), 600 µL de etanol absoluto (Sigma-Aldrich® E7023) y 900 µL de caldo Brucella. Esta solución de lípido se solubilizó por completo calentando en baño maría a 80°C durante 5 min.

Una vez preparada la solución stock de los lípidos, se procedió a realizar los ensayos con AGCL para lo cual, se cultivó *H. pylori* 26695 en agar Brucella SFB 10% (como se indica en la sección de: Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento) y los 15 mL cultivo de *H. pylori* 26695, se distribuyeron en la placa de cultivo celular de 6 pozos (Nunc™ Thermo Scientific™) adicionando 3 mL de este cultivo en cada pozo y posteriormente se adicionaron, 30 µL de la solución stock de cada lípido, a una concentración de 25 mM, ácido palmítico (Sigma-Aldrich®, P0500-10G, 99%) (C16:0), ácido esteárico (Sigma-Aldrich®, S4751-1G, 98.5%) (C18:0), ácido oleico (Sigma-Aldrich®, 01008-1G, 99%) (C18:1), ácido linoleico (Sigma-Aldrich®, L1376-500MG, 99%) (C18:2 n-6), ácido linolénico (Sigma-Aldrich®, L2376-500MG, 99%) (C18:3 n-3) con lo que se consiguió una concentración final de 250 µM del lípido en cada pozo; excepto en los pozos control en los cuales no se adiciono lípido, a estos controles se les adicionó 30 µL de solución stock (Tiloxapol 0.5% o 100X, 600 µL de etanol absoluto y 900 µL de caldo Brucella); la placa se incubó 1 hora a 37°C en atmósfera microaerofílica y agitación constante, una vez transcurrido este tiempo, se tomó el cultivo de *H. pylori*, tratado con lípido de cada uno de los pozos y se centrifugó a 8000 x g durante 10 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla obtenida con el sedimento

celular tratado con lípido, se almacenó a -70°C hasta que se realizó la extracción de RNA.

6.6. Extracción de RNA de *H. pylori* 26695

El RNA total se extrajo de los cultivos de *H. pylori* 26695, tratados con cada uno de los AGCL (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico), utilizando el método de fenol ácido (Jahn *et al.*, 2008) con algunas modificaciones.

Rompimiento celular: La pastilla obtenida en el paso anterior, se resuspendió en 500 μL de solución de lisis (SDS 0.5%, Acetato de sodio 20 mM, EDTA 10 mM) y se colocó en tubos con tapón de rosca de 2 mL.

Las bacterias se rompieron con vórtex de la siguiente manera: 6 ciclos de 1 min a velocidad máxima, seguido de 1 min de incubación en hielo. El lisado celular se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 500 μL de fenol ácido (Sigma) precalentado a 65°C ; posteriormente los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron a 65°C durante 10 min con agitación en ThermoMixer®. Después de la incubación, los tubos se colocaron en hielo y se centrifugaron a $24100 \times g$ a 4°C durante 5 min y el lisado celular (fase superior) se recuperó en tubos limpios. A cada tubo se le adicionó 1 mL de etanol absoluto frío (Alcohol etílico puro, sigma-Aldrich®), y el RNA se dejó precipitar a -70°C toda la noche.

Precipitación del RNA: Los tubos obtenidos en la fase anterior se centrifugaron a $24100 \times g$ durante 10 min a 4°C . El etanol se eliminó teniendo cuidado de no llevarse la pastilla obtenida y se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a $24100 \times g$ durante 2 min, la pastilla se resuspendió en 400 μL de solución de lisis.

El procedimiento se repitió desde la adición de etanol absoluto frío, hasta la centrifugación a $24,100 \times g$ (omitiendo la incubación a -70°C). Después de la eliminación cuidadosa del etanol, el sedimento se secó en el equipo Concentrador Eppendorf® 5301 durante 15 min, finalmente el RNA se resuspendió en 20 μL de agua libre de nucleasas. El RNA se almacenó a -70°C hasta su uso.

Purificación del RNA: A los tubos del paso anterior se les adicionó 2 μL de regulador para DNasa 10X y 1 μL de DNasa TURBO™ (Ambion); posteriormente, se incubó a 37°C durante 30 min. Pasado el tiempo de incubación, a cada tubo se le adicionaron 2 μL del Agente de Inactivación de la DNasa y se mezcló suavemente con micropipeta hasta homogeneizar; se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a $8000 \times g$ durante 2 min. La fase acuosa que contenía al RNA se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo. El RNA se sometió a un segundo proceso de purificación.

Visualización de RNA de *H. pylori* 26695 en gel de agarosa

Para observar la integridad del RNA aislado, se realizó electroforesis en gel de agarosa, utilizando el método descrito por (Aranda *et al.*, 2012). El gel de agarosa al 1% se preparó mezclando 0.3 g de agarosa, 600 μL de amortiguador (TAE) (50X) y 300 μL de hipoclorito de sodio (Cloralex®) y se aforó a 30 mL con agua desionizada, esta solución se incubó 5 min a temperatura ambiente y se mezcló cada minuto, finalmente la agarosa se fundió utilizando un horno de microondas. Posteriormente se cargó 1 μL del RNA con buffer de carga y la electroforesis se realizó a 80 V durante 80 min- Al finalizar el corrimiento electroforético, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (concentración 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 10 min, y después se eliminó el exceso de bromuro de etidio incubando el gel durante 5 min en agua destilada.

Finalmente, el gel se visualizó empleando un fotodocumentador de imágenes (Equipo UVP BioDoc-It® Imaging System).

Cuantificación de RNA de *H. pylori* 26695

El RNA purificado (libre de DNA), fue cuantificado por espectrofotometría, empleando el espectrofotómetro (Nanodrop 2000, Eppendorf®), se tomó 1 µL de RNA para obtener la concentración y además se identificó la relación 260/280 nm y 260/230 nm, los cuales son indicativos de la calidad del RNA extraído. Posteriormente, la concentración de RNA se ajustó a 1 µg en un volumen de 11 µL de agua DEPC. Este RNA se empleó para realizar la síntesis del DNA complementario (cDNA) y/o se almacenó a -70°C.

Verificación de pureza del RNA

Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras de RNA, se tomaron 2 µL de cada RNA total purificado, para emplearlo en una PCR de punto final empleando iniciadores específicos para el gen del rRNA16S de *H. pylori*; como control positivo de la PCR, se empleó DNA genómico de la cepa silvestre. Se realizó un gel de agarosa para visualizar los productos amplificados.

6.7. Síntesis de cDNA

El cDNA se sintetizó utilizando los reactivos del Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Thermo Scientific® Ref. K1622. Se realizó la mezcla de reacción que contenía lo siguiente: 4 µL del regulador de reacción 5X, 2 µL de mezcla de dNTP 10 mM, 1 µL de Primer Random Hexamer, 1 µL del Inhibidor de RNasa RiboLock (20

U/ μ L), 1 μ L de la enzima RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L), 1 μ g (11 μ L) del RNA de *H. pylori* 26695. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo en el termociclador Eppendorf® MasterCycler Personal, con las siguientes condiciones de reacción: incubación a 25°C durante 5 min, después a 42°C durante 60 min, finalmente 70°C durante 5 min. El producto de reacción de transcripción inversa se diluyó 1:50 (15 μ L de cDNA y 735 μ L de agua libre de nucleasas) y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.8. Amplificación de los genes mediante PCR en tiempo real

Para realizar la PCR en tiempo real (qPCR), se empleó el termociclador LightCycler® 480 Roche; y el sistema de detección fue el fluorocromo SYBR® Green I. Las reacciones para los ensayos de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en placas de 96 pozos Lightcycler®480. Se preparó la mezcla de reacción con los siguientes componentes: 1.5 μ L de agua grado PCR, 1.0 μ L de *primers* 20 μ M, 5.0 μ L de LightCycler® 480 SYBR Green I Master 10X y 2.5 μ L de cDNA diluido (1:50). Finalmente, la mezcla de reacción se colocó por triplicado en cada pozo de la placa, luego la placa se selló con *sealing foil* LightCycler® 480 y ésta se cargó en el Instrumento de detección y amplificación de PCR en tiempo real (Termociclador LightCycler® 480 Roche).

Las reacciones de qPCR se realizaron bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización (95°C durante 10 min); 45 ciclos de amplificación y cuantificación (95°C durante 10 s, 58 y 59°C (temperatura de hibridación correspondiente para cada par de iniciadores empleados) durante 20 s, 72°C durante 30 s (en este punto se realiza la medición de la fluorescencia); posteriormente la curva de disociación, para confirmar

la especificidad de los *primers* empleados: un ciclo en las siguientes condiciones: (95°C durante 10 s, 65°C durante 1 min con medición de fluorescencia continua a 97°C); y finalmente un paso de enfriamiento a 40°C durante 10 s. El gen rRNA 16S (*rrnA16S*) se utilizó como gen de referencia para la normalización.

6.8.1. Determinación de la expresión génica relativa

Se empleó el método descrito por Livak y Schmittgen (2001), para determinar la expresión génica, en unidades de expresión relativa mediante la aplicación de la fórmula matemática $2^{-\Delta CT}$. La ΔCT se determinó al restar el valor de CT (“crossing threshold”) del gen en estudio, al valor de CT del gen rRNA 16S (*rrnA16S*) el cual fue el gen normalizador. Los valores obtenidos se multiplicaron por un factor con la finalidad de que el resultado final sea mayor o igual a 1.

6.9. Cuantificación de la secreción de IL-8

La secreción de IL-8 se determinó como se describió previamente en Vázquez-Jiménez *et al.* (2016), empleando el kit comercial BD Opt EIA™ Human IL-8 ELISA, 555244. Se adicionaron 100 µL del anticuerpo de captura diluido 1:250 a cada uno de los pozos de la placa de ELISA de 96 pozos (Corning CLS3590, Costar) empleando una pipeta multicanal (Socorex, Acura® manual 855) y se incubó 4°C toda la noche. Posteriormente se retiró el anticuerpo y se hicieron 3 lavados con 300 µL de buffer de lavado (PBS/Tween 20 al 0.005%). Después se adicionaron 200 µL de buffer diluyente (PBS/SFB 10%) y se incubó 1 h a temperatura ambiente, se retiró el buffer diluyente y se realizaron 3 lavados con 300 µL buffer de lavado; en seguida se adicionaron 100 µL de cada una de las diluciones de la curva estándar de IL-8 (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25,

50,100 y 200 pg/mL), las cuales se prepararon a partir de un stock (standard Recombinant Human IL-8, 95 ng/ mL) incluido en el kit y también se adicionaron 100 µL los sobrenadantes obtenidos en la infección (150 µL de los sobrenadantes y 150 µL del buffer diluyente), tanto la curva estándar como los sobrenadantes se adicionaron por duplicado y se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiraron tanto los sobrenadantes como la curva estándar y se realizaron 5 lavados con 300 µL buffer de lavado, luego se adicionaron 100 µL del anticuerpo de detección diluido (1:250: 0.5 µL Detection Antibody Biotin anti-human IL-8 y 5.976 mL del buffer diluyente) también se diluyó la enzima SAV-HRP (1:250: 0.5 µL Enzyme Reagent SAV-HRP y 5.976 mL de la solución de anticuerpo de detección previamente diluido) y se incubó 1 h a temperatura ambiente y se retiró el anticuerpo y se realizaron 7 lavados con 300 µL buffer de lavado y se adicionaron 100 µL del sustrato diluido en una proporción (1:1) es decir 50 µL del reactivo A y 50 µL del reactivo B) y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Finalmente se adicionó 50 µL de solución de paro (Capture Antibody Purified antihuman IL-8). Se tomó la densidad óptica a 450 nm usando un espectrofotómetro (MultiScan Ascent, Thermo Scientific). Los ensayos se realizaron por triplicado en tres días distintos, y se analizaron los datos empleando el software GraphPadPrism (Software versión 6.0 for MacOS, San Diego, CA, USA).

6.10. Ensayos de motilidad en Agar Suave

A partir del cultivo de *H. pylori* 26695 en 15 mL caldo *Brucella*/SFB 10% y vancomicina 10 µg/mL (DO_{600} inicial=0.1 nm / 37°C /24h /10% CO₂; agitación constante), se realizó el

ensayo con los lípidos, adicionando 3 mL de este cultivo en cada pozo y 30 μ L del lípido a una concentración final de 250 μ M (1 h/ 37°C/ CO₂ 10% /agitación constante), una vez transcurrido este tiempo, se tomaron 10 μ L del cultivo de *H. pylori* 26695/lípido (DO₆₀₀=0.8 nm) y se inocularon por punción y triplicado en agar (Bacto agar 0.35% /triptona 1%/SFB 2.5%) y en tres diferentes días, después se incubó 37°C /CO₂ 10%/ 3 días. Finalmente se midió el diámetro de migración de *H. pylori* 26695 en presencia de cada lípido. Los datos fueron analizados y graficados empleando el software GraphPadPrism (Software versión 6.0 for MacOS, San Diego, CA, USA) (Sanders *et al.*, 2013).

6.11. Ensayos de adherencia celular

Los ensayos de adherencia se realizaron como se describe en De la Cruz y col. (2017), lo cual se sincronizó tanto el cultivo de *H. pylori* 26695 en presencia de los ácidos grasos: ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico (como se indicó en la sección correspondiente) como la infección de la línea celular epitelial de adenocarcinoma gástrico humano (AGS), ATCC CRL-1739™. Las células epiteliales AGS se incubaron en una placa de cultivo celular de 6 pozos con tapa (Corning, Costar® 3516) a una confluencia del 80% con medio F12 (HAM) con L glutamina (Invitro® ME-032), suplementado con SFB (Gibco® Ref. 16000-044) al 10% y se incubó a 37°C con 5% CO₂. Para realizar la infección de las células epiteliales de AGS, se retiró el medio F12 /SFB al 10% y se adicionó medio F12 sin SFB. Posteriormente, se adicionó *H. pylori* 26695 a una multiplicidad de infección (MDI) de 100, la infección se realizó durante 6 h a 37°C con 5% CO₂. Una vez transcurrido las 6 h de infección

se tomó el medio de cultivo F12 y se conservó a -70°C para posteriormente realizar la detección de IL-8. A las células epiteliales de AGS infectadas con *H. pylori* 26695 se les realizaron 3 lavados con 1 mL PBS esteril, luego se adicionó 1 mL de Triton X-100 al 0.1% y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min; finalmente se tomó el lisado celular de los pozos y se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se realizaron 10 diluciones decimales del lisado celular: 900 μL de PBS + 100 μL de lisado (dilución 1:10) ó (-1). Se plaquearon 20 μL de cada una de las diluciones por triplicado en agar Brucella/SFB10%, se incubaron a 37°C con 10% CO_2 y se calcularon las UFC/mL empleando la siguiente fórmula: $\text{UFC/mL} = (\text{Promedio de las UFC contadas}) (\mu\text{L plaqueados} \times \text{Factor de dilución})$. Los ensayos de adherencia se realizaron por triplicado, en tres diferentes días. Los resultados obtenidos fueron graficados empleando GraphPadPrism (Software versión 6.0 for MacOS, San Diego, CA, USA).

6.12. Formación de biopelícula

De igual forma que en los ensayos de motilidad, para los experimentos de formación de biopelículas se partió del cultivo de *H. pylori* / lípido 250 μM en fase estacionaria, el cual fue centrifugado a 12000 rpm durante 2 min y resuspendido en caldo Brucella / SFB 2% ajustando la DO_{600} a 0.1. Se cuantificó la capacidad de formación de biopelículas siguiendo la metodología propuesta por Cárdenas-Mondragón y colaboradores (2016). Para ello, se adicionaron 200 μL en cada pozo de la placa de poliestireno de 96 pozos y se incubó a $37^{\circ}\text{C}/9\%\text{CO}_2/3$ días. Posteriormente, se desechó el medio de cultivo (cel planctónicas) con una micropipeta y se realizaron 3 lavados con 200 μL de PBS; después se adicionaron 100 μL Cristal Violeta 1% y se

incubó a temperatura ambiente durante 20 min; se retiró el Cristal violeta y se realizaron 3 lavados con 200 μ L de PBS y se dejó secar la biopelícula, para solubilizarla con 100 μ L de etanol al 70% durante 5 min. Finalmente, se cuantificó la cantidad de Cristal Violeta adherida a la biopelícula usando un espectrofotómetro MultiScan Ascent (Thermo Scientific) a una DO_{590nm} . Estos ensayos se realizaron por quintuplicado, en 3 días diferentes.

6.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPadPrism (Software versión 6.0 for MacOS, San Diego, CA, USA), utilizando el análisis de varianza (ANOVA) unidireccional, seguido por la prueba de comparación de Tukey; donde los valores de $p \leq 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

6.14. Mapas de calor de la expresión diferencial de los factores de virulencia y reguladores transcripcionales

Los cambios en la expresión génica relativa de los genes de virulencia y los reguladores transcripcionales de *H. pylori* en presencia de AGCL se trazaron en un mapa de calor (se seleccionó la función "heatmap.2" del software R, utilizando el paquete "gplots") para visualizar más fácilmente su efecto (Figura 17).

7. RESULTADOS

7.1. Cepa bacteriana y condiciones de crecimiento de *H. pylori* 26695

En nuestro grupo de trabajo se reportaron recientemente las condiciones óptimas de crecimiento para *H. pylori* en medio líquido suplementado con SFB al 10% (Cárdenas *et al.*, 2016; De la Cruz *et al.*, 2017). *Helicobacter pylori* 26695 creció tanto en agar como en caldo *Brucella* suplementado con SFB al 10% a 37°C en una atmósfera de 10% CO₂, de 2 a 3 días. El crecimiento de *H. pylori* 26695 en caldo *Brucella* requirió de condiciones microaerofílicas y agitación constante para que fuera homogéneo (Figura 1A y 1B).

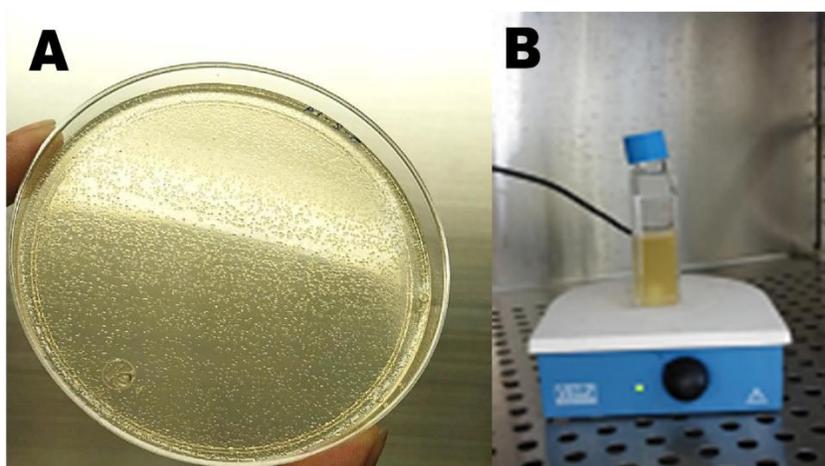


Figura 1: Cultivo de *H. pylori* 26695 en agar y caldo *Brucella* SFB al 10% a 37°C en una atmósfera de 10% CO₂. A) Incubación de 2 a 3 días en medio sólido; B) Incubación en medio líquido a las 24 h de incubación.

7.2. Cinética de crecimiento de *H. pylori* 26695

En la Figura 2 se muestra la curva de crecimiento de *H. pylori* 26695: la DO_{600nm} se incrementó desde el inicio del crecimiento del cultivo hasta la fase logarítmica a las 24 h. A pesar de que el cultivo bacteriano continúa creciendo (por estimaciones de la DO), la bacteria alcanza la fase estacionaria después de las 60 h de cultivo.

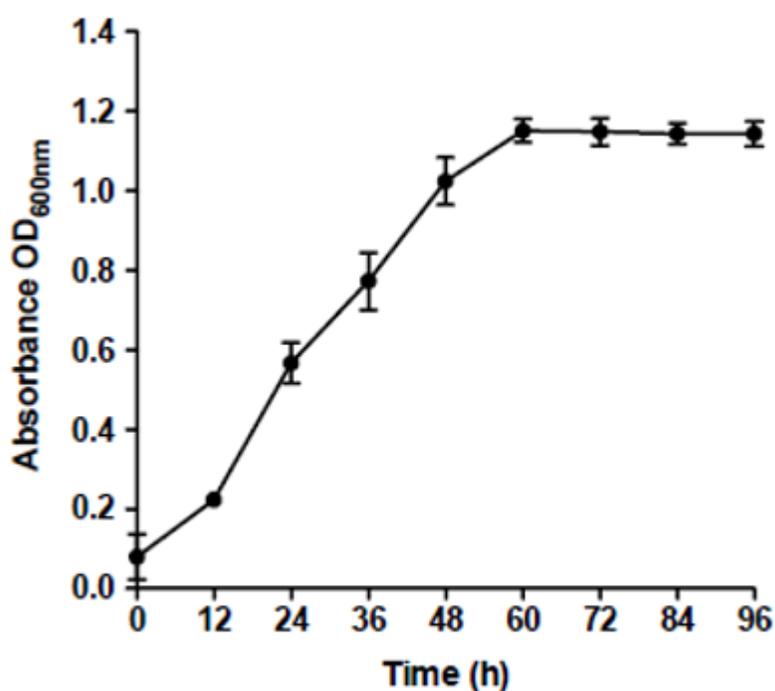


Figura 2: Curva de crecimiento de *H. pylori* en caldo *Brucella* SFB 10% a 37°C y 10% CO₂.

7.3. Especificidad de los iniciadores

Los oligonucleótidos que se diseñaron para los genes que codifican para factores de virulencia de *H. pylori* 26695 están descritos en la Tabla 3. Son oligonucleótidos diseñados específicamente para qPCR, con las siguientes características: i) longitud

de 20-22 nucleótidos; ii) contenido de GC del 50%; iii) Tm entre 57 y 62°C; iv) tamaño del amplicón de 100 a 207pb.

7.3.1. Extracción de DNA de *H. pylori* 26695

La extracción de DNA se realizó con el método descrito por Pitcher *et al.* (1989), el cual utiliza tiocianato de guanidina como agente caotrópico. Con este método se obtuvo un rendimiento en promedio de 32 µg de DNA/placa de agar *Brucella*/SFB 10%. La pureza e integridad del DNA fue la adecuada ($A_{260}/A_{280nm}=1.8$) (Figura 3).

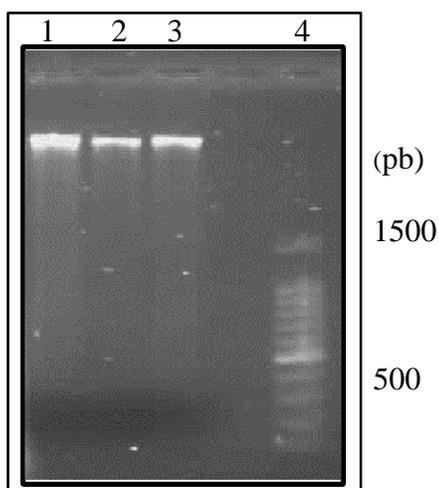


Figura 3: Gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE IX, teñido con Gel Red del DNA genómico de *H. pylori* 26695. Carriles 1-3: DNA de *H. pylori* 26695; carril 4: Escalera de DNA de 100 pb (Promega).

7.3.2. PCR en punto final de los principales genes que codifican para factores de virulencia de *H. pylori* 26695.

Se obtuvieron los amplicones específicos, con los tamaños esperados, usando los oligonucleótidos que se diseñaron para qPCR de los principales genes que codifican

para factores de virulencia (Figura 4) y de los reguladores transcripcionales de *H. pylori* 26695 (Figura 5).

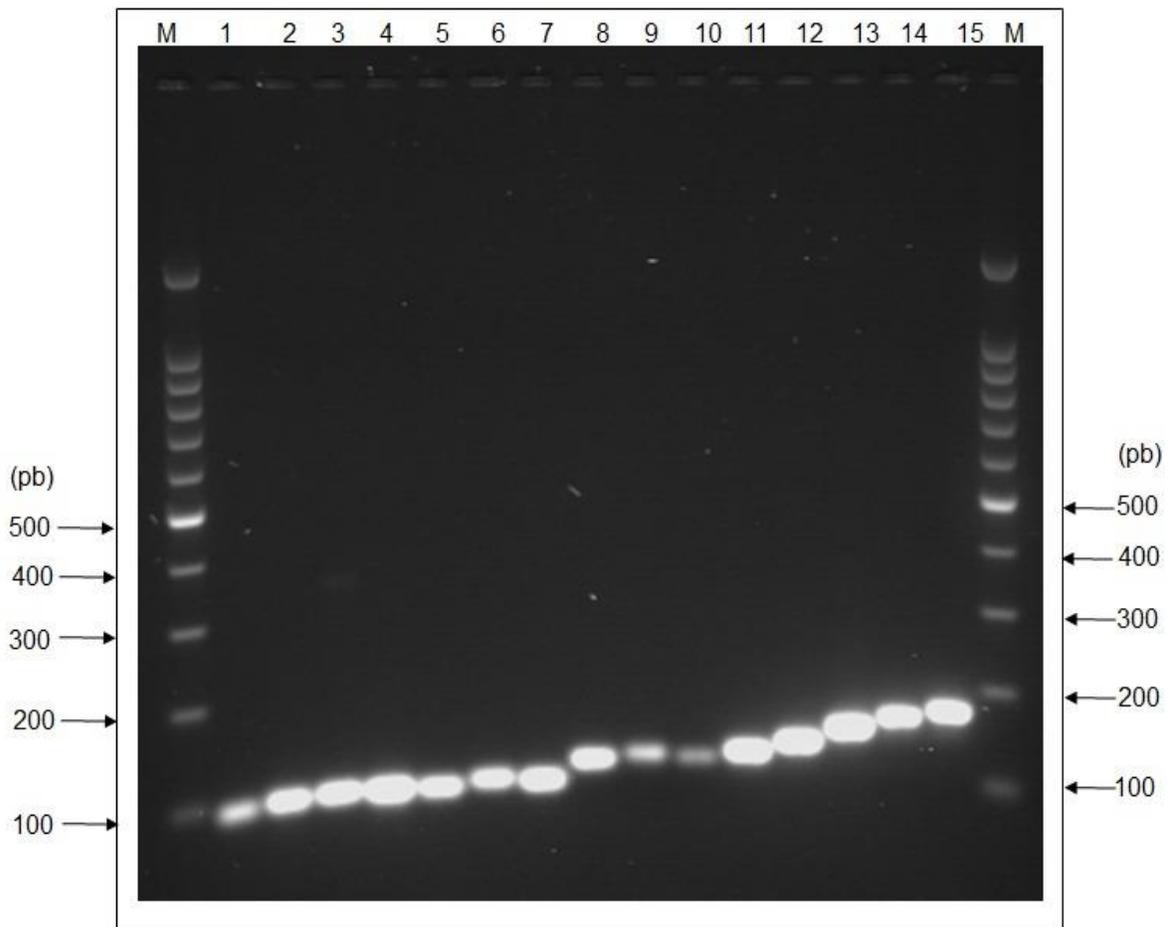


Figura 4: Gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X, teñido con Gel Red, de los amplicones de los principales genes que codifican para factores de virulencia de *H. pylori* 26695, obtenidos por PCR en punto final. Carriles 1. *mraY* (98 pb), 2. *babA* (100 pb), 3. *ureA* (102 pb), 4. *hopQ* (103 pb), 5. *waa1* (103 pb), 6. *pbp1A* (108 pb), 7. *sabA* (105 pb), 8. *cagM* (124 pb), 9. *cagL* (128 pb), 10. *flaB* (128 pb), 11. *flaA* (135 pb), 12. *ureB* (147 pb), 13. *rrmA16S* (163 pb), 14. *cagA* (172 pb), 15. *vacA* (182 pb), M. Marcador de escalera de DNA de 100 pb (Promega).

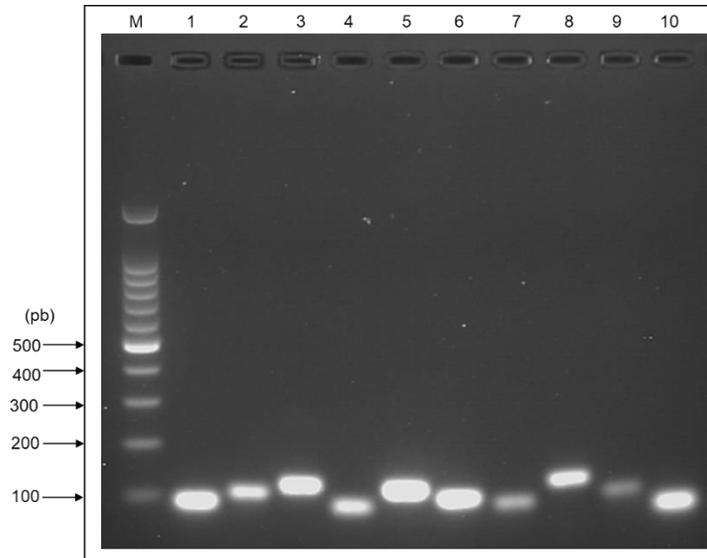


Figura 5: Gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X, teñido con Gel Red. Amplicones de diez genes que codifican para reguladores transcripcionales de *H. pylori* 26695, obtenidos por PCR en punto final. Carriles: M. Marcador de escalera de DNA de 100 pb (Promega), 1. *hsrA* (96 pb), 2. *hup* (109 pb), 3. *flgR* (124 pb), 4. *hspR* (87 pb), 5. *arsR* (130 pb), 6. *cheY* (107pb), 7. *hrcA* (97 pb), 8. *crdR* (154 pb), 9. *nikR* (101 pb), 10. *fur* (78pb).

7.4. Curvas estándar de los genes de virulencia de *H. pylori* 26695

Se construyeron diez curvas estándar de DNA de *H. pylori* 26695 con concentraciones conocidas de DNA (6.25, 3.25, 0.65 ng/μL). Se amplificaron mediante qPCR, nueve fragmentos de los principales genes que codifican para factores de virulencia de *H. pylori* y uno del gen normalizador *rrnA16S*. En las curvas obtenidas se puede observar claramente la emisión de la fluorescencia antes del ciclo 15 para los amplicones: *rrnA16S* (Figura 6), *cagL* (Figura S1), *vacA* (Figura S4), *ureA* (Figura S7), *ureB* (Figura S10), *flaA* (Figura S13), *flaB* (Figura S16), *babA* (Figura S19) y *sabA* (Figura S22). El rango inferior de detección de DNA analizado para la curva de amplificación fue de 0.65 ng/μL.

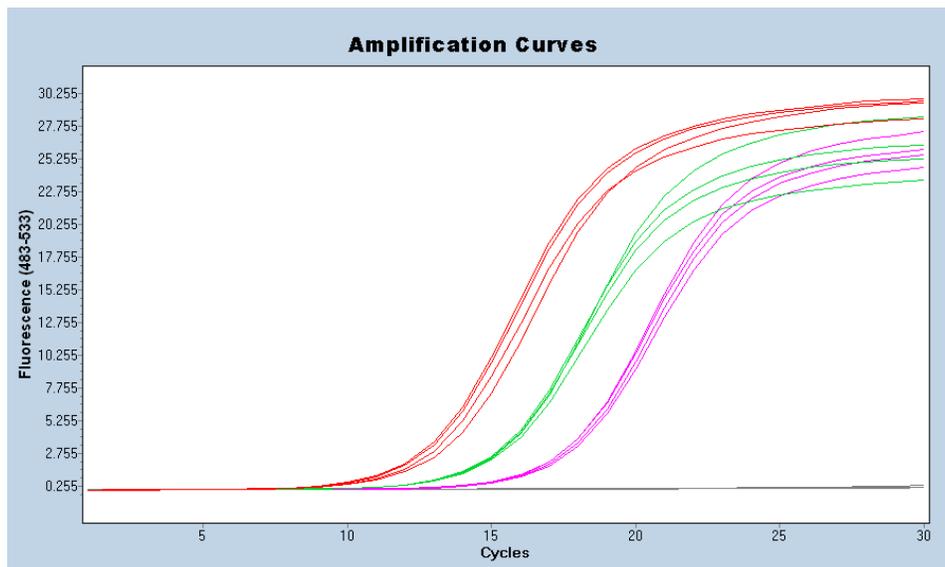


Figura 6: Curva de amplificación del fragmento de 163pb del gen *rrnA16S* de *H. pylori*. La curva fue realizada usando el equipo LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

Las curvas estándares generadas para los genes *cagA* (Figura 7), *rrnA16S* (Figura 8), *cagL* (Figura S2), *vacA* (Figura S5), *ureA* (Figura S8), *ureB* (Figura S11), *flaA* (Figura S14), *flaB* (Figura S17), *babA* (Figura S20) y *sabA* (Figura S23) tuvieron parámetros de eficiencia y error confiables (Tabla 4) para ser utilizadas en los experimentos de determinación de expresión génica por qPCR. Por ejemplo, para el gen *cagA* (Figura 7), el error obtenido para la curva estándar fue de 0.000505 y la eficiencia de 1.925, ambos parámetros están dentro de los parámetros aceptados para la curva estándar (error \leq 0.09 y eficiencia \leq 2.1). Lo mismo sucedió para el gen *rrnA16S* (Figura 8) con un error= 0.0485 y eficiencia= 2.097.

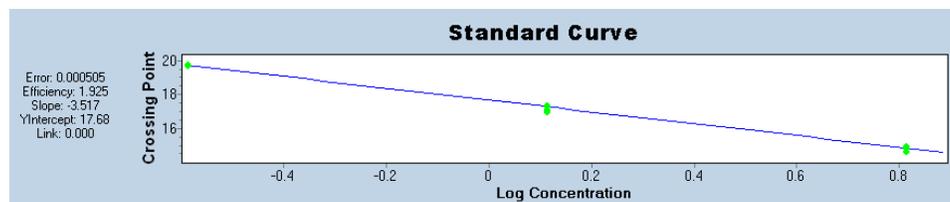


Figura 7: Curva estándar de DNA del gen *cagA* de *H. pylori* 26695, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar.

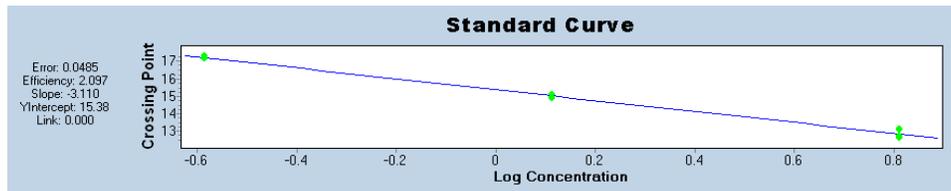


Figura 8: Curva estándar de DNA del gen *rrnA16S* de *H. pylori* 26695, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar.

Finalmente, las curvas de disociación de los diez genes amplificados: *cagA* (Figura 9), *rrnA16S* (Figura 10), *cagL* (Figura S3), *vacA* (Figura S6), *ureA* (Figura S9), *ureB* (Figura S12), *flaA* (Figura S15), *flaB* (Figura S18), *babA* (Figura S21) y *sabA* (Figura S24) mostraron un solo pico de amplificación en la curva, lo que indicó la especificidad de los oligonucleótidos empleados para amplificar un solo fragmento específico y único, así como la calidad de DNA usado en la curva.

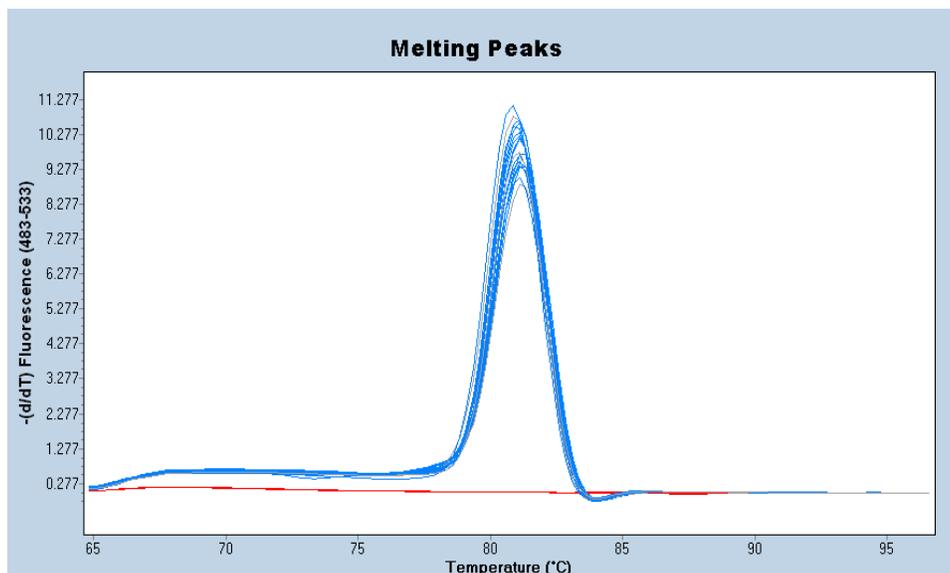


Figura 9: Curva de disociación del DNA del fragmento de 172 pb del gen *cagA* de *H. pylori* 26695, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

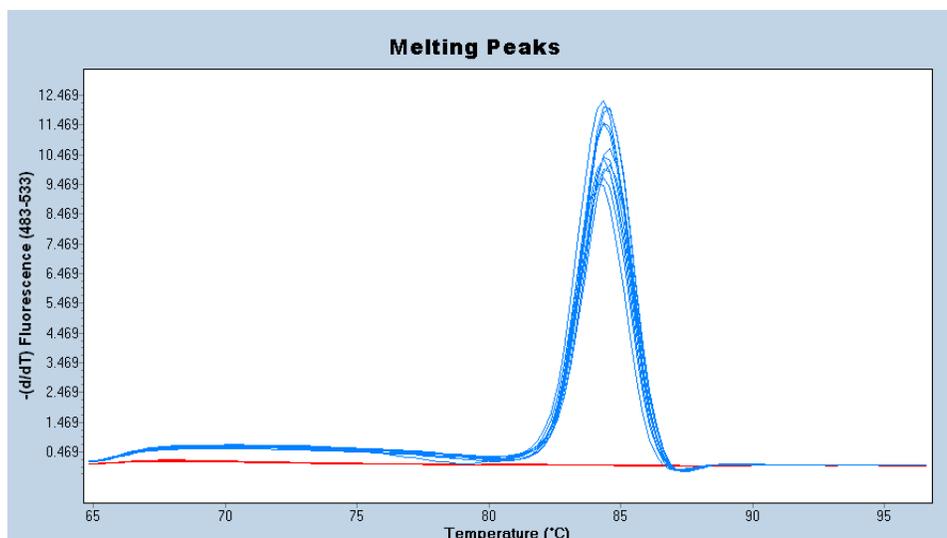


Figura 10: Curva de disociación del DNA del fragmento de 163pb del gen *rna16S* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

Tabla 4: Diseño de oligonucleótidos para la amplificación mediante qPCR de los genes que codifican para los factores de virulencia de *H. pylori*.

Gen	Error	Eficiencia	pendiente
<i>cagA</i>	0.000505	1.925	-3.517
<i>cagL</i>	0.0450	1.859	-3.713
<i>vacA</i>	0.00000698	1.806	-3.895
<i>ureA</i>	0.0162	1.897	-3.598
<i>ureB</i>	0.0315	1.814	-3.866
<i>flaA</i>	0.0860	1.802	-3.909
<i>flaB</i>	0.0429	1.901	-3.585
<i>babA</i>	0.0154	1.889	-3.622
<i>sabA</i>	0.00335	1.962	-3.418
<i>rrnA16s</i>	0.0485	2.097	-3.110

7.5. Extracción de RNA de *H. pylori* 26695

Se extrajo el RNA total de *H. pylori* 26695 para analizar la transcripción de los factores de virulencia y de reguladores transcripcionales en la fase logarítmica temprana (24 h) en presencia de ácido palmítico, oleico, linoleico y linolénico, utilizándose una concentración final de 250 μM para cada ácido graso. Al cuantificar en el espectrofotómetro (ND-1000) el RNA total aislado de las diferentes condiciones de crecimiento de *H. pylori* 26695 con los AGCL, se obtuvieron concentraciones de entre 0.758 y 1.815 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y purezas de 1.98 a 2.05 según el coeficiente de absorción $A_{260/280}$ nm.

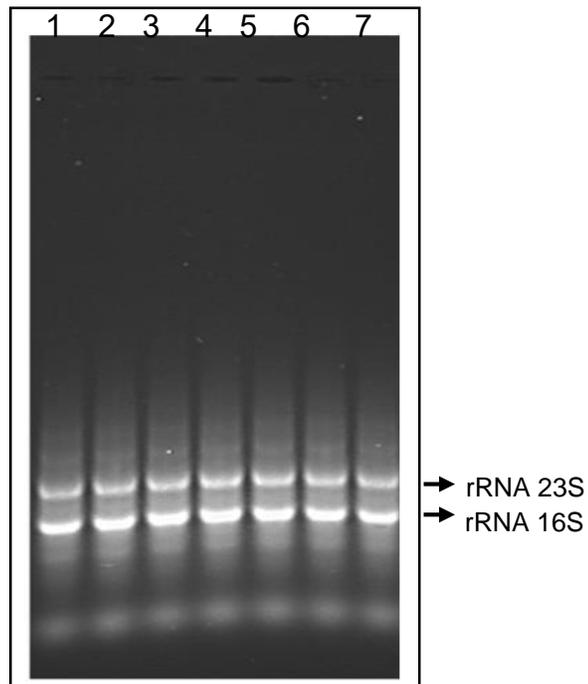


Figura 11: Gel de agarosa al 1% con hipoclorito de sodio (Cloralex®) y amortiguador TAE 1X h, teñido con Gel RED. RNA total obtenido a partir del crecimiento de *H. pylori*: 1) control, 2) Tiloxapol, 3) Ácido palmítico, 4) Ácido esteárico, 5) Ácido oleico, 6) Ácido linoleico 7) Ácido linolénico.

El RNA de todos los ensayos con lípidos presentó una calidad adecuada, las bandas fueron nítidas y correspondientes al rRNA 23S y al rRNA 16S. En la Figura 11, se muestra el RNA obtenido de los ensayos con ácido palmítico, esteárico, oleico y

linoleico. Para comprobar la ausencia de DNA en las muestras de RNA total, se realizó una PCR en tiempo real (qPCR) con el RNA como molde de la reacción a una concentración final de 50 ng y empleando los iniciadores específicos para el gen constitutivo *rrnA16S* que codifica para el RNA ribosomal 16S de *H. pylori*. Como control positivo se empleó DNA genómico a una concentración final de 50 ng. No se detectó amplificado alguno en las muestras de RNA, por lo tanto, dichas muestras se encontraban libres de DNA. Debido a lo anterior, se pudo continuar con los experimentos.

7.6. Efecto de los AGCL sobre los componentes del SST4 de *H. pylori* 26695

Para determinar el efecto de los AGCL en la expresión del SST4 de *H. pylori*, se analizó la expresión transcripcional por RT-qPCR de los genes *cagA*, *cagL*, y *cagM*, los cuales codifican para componentes estructurales del SST4, en presencia de ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. La transcripción de los genes *cagL* y *cagM*, que codifican para una estructura de pilus y una proteína transmembrana del SST4, respectivamente, fueron inducidas significativamente en presencia de ácido palmítico, oleico y linolénico (Figura 12A). Interesantemente, el ácido linoleico ejerció un efecto positivo y negativo en la transcripción de *cagM* y *cagL*, respectivamente (Figura 12A). En contraste, la transcripción del gen *cagA*, el cual codifica para la citotoxina oncogénica translocada en las células del huésped a través del SST4, no fue afectada significativamente por ningún AGCL probado (Figura 12A). La secreción de IL-8 de las células epiteliales de AGS, la cual requiere de un SST4 funcional, incrementó significativamente sólo en respuesta al crecimiento de *H. pylori* en presencia de ácido palmítico, pero no con los otros AGCL probados.

Nuestros datos muestran que ácido palmítico, oleico y linolénico mejoran la transcripción de los componentes estructurales del SST4 de *H. pylori*, y que solamente el ácido palmítico indujo la secreción de IL-8 de las células epiteliales gástricas mediadas por *H. pylori*.

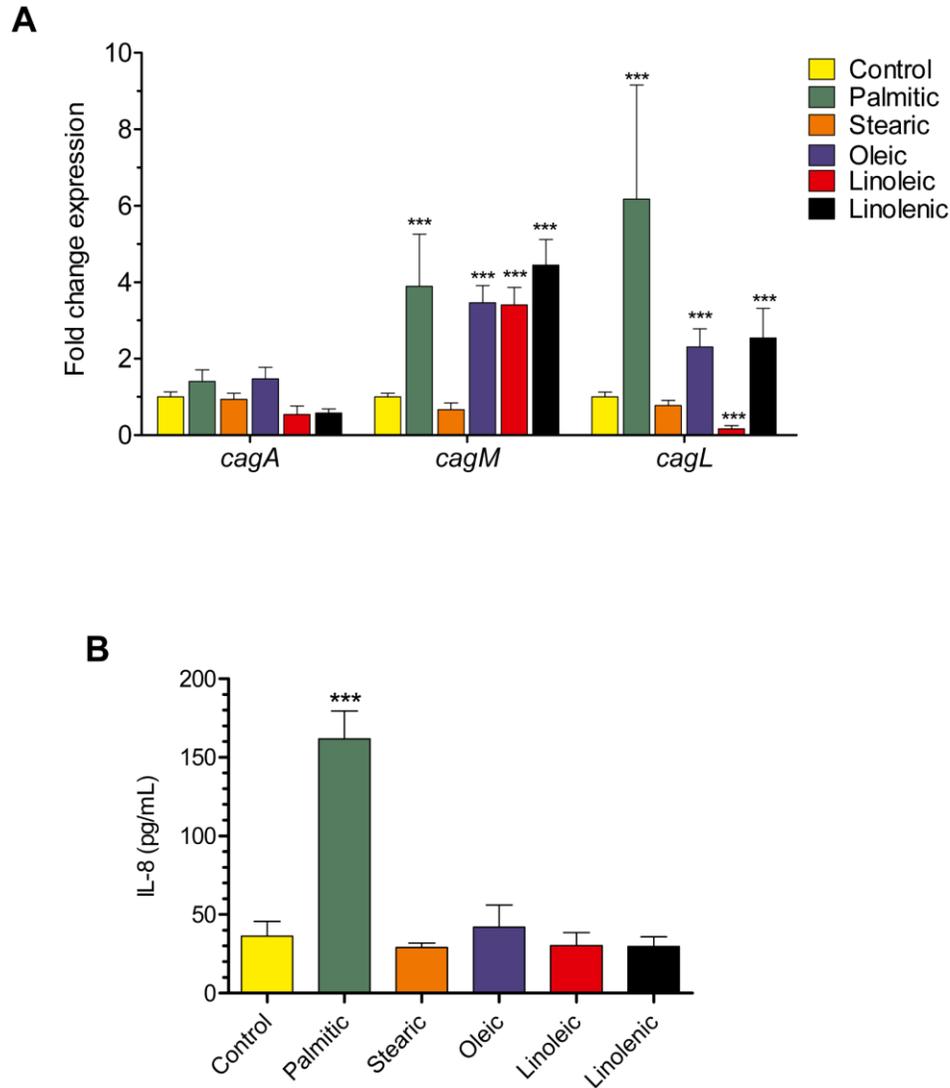


Figura 12: Efecto del ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico sobre la expresión de cagPAI. **A)** La expresión detectada por (RT-qPCR) de los genes *cag* de *H. pylori* en fase logarítmica de crecimiento en presencia o no de AGCL a una concentración final de lípidos de 250 μ M. **B)** Análisis de ELISA de la expresión de la proteína IL-8 en el sobrenadante de las células epiteliales de AGS infectadas con *H. pylori* a las 6 h post infección. Los datos representan la media con desviación estándar obtenidas de tres experimentos separados realizados por triplicado. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control: ***, $p < 0,001$.

7.7. Efecto de los AGCL sobre la expresión de los genes que codifican para las flagelinas y adhesinas

Para determinar si los AGCL afectaban la motilidad y la adherencia de *H. pylori*, se analizó la transcripción de los genes flagelares y de adhesinas en presencia de ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico. Se evaluaron tanto los genes flagelares *flaA* y *flaB*, los cuales codifican la flagelina mayoritaria y minoritaria, respectivamente, así como los genes de las adhesinas *sabA*, *babA* y *hopQ*. La transcripción de *flaB* fue incrementada 24 y 3 veces en presencia del ácido palmítico y ácido oleico, respectivamente, y no se afectó por los otros AGCL probados. En contraste, ninguno de los AGCL evaluados modificó la transcripción de *flaA* (Figura 13A). De acuerdo con su efecto altamente inductivo en la expresión del gen *flaB*, el ácido palmítico también aumentó significativamente ($p < 0.001$) la motilidad de *H. pylori* en agar suave (Figura 13B). Por otro lado, la transcripción de *sabA* se incrementó significativamente en presencia de la mayoría de los AGCL probados; los ácidos palmítico y oleico indujeron la transcripción hasta 15 veces el nivel de transcripción de este gen (Figura 13C). De acuerdo con estos datos de expresión, tanto el ácido palmítico como el oleico aumentaron 3 veces la capacidad de adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales AGS (Figura 13D); los AGCL evaluados no afectaron la transcripción de los genes *babA* y *hopQ*, con la excepción del ácido linoleico que redujo 2.5 veces el nivel de transcripción de *babA* (Figura 13C). Además, ninguno de los AGCL probados afectó la formación de biopelículas por *H. pylori* (Figura 13E), mostrando que los ácidos palmítico y oleico no afectaron la adherencia de *H. pylori* a una superficie abiótica. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan que los ácidos palmítico y oleico mejoran la motilidad y la adherencia

de *H. pylori* regulando positivamente la transcripción de los genes *flaB* y *sabA*, respectivamente.

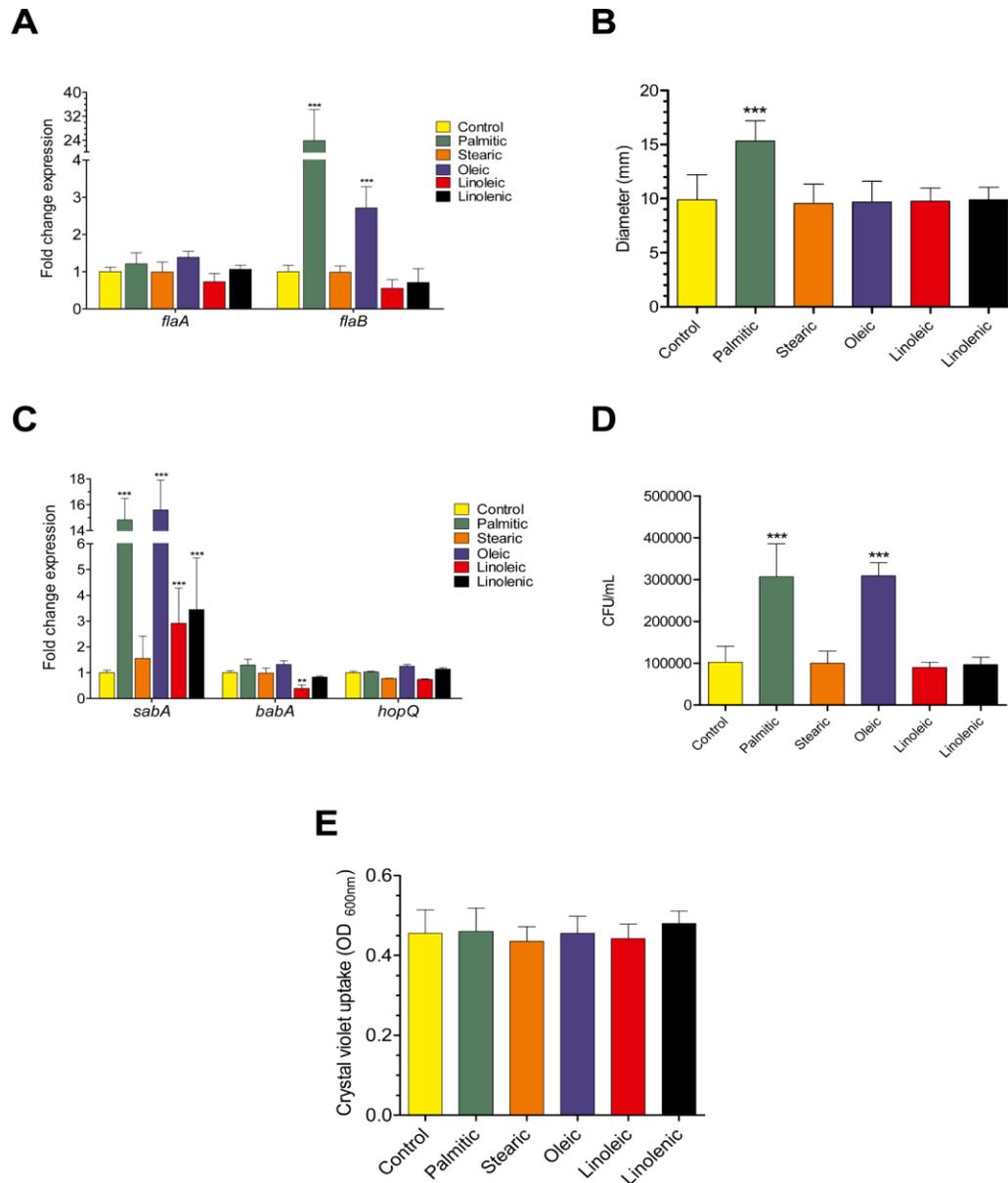


Figura 13. Efecto de los AGCL en la expresión de los genes flagelares y de adhesinas, así como en la motilidad y adherencia de *H. pylori*. **A)** Expresión medida por RT-qPCR de los genes del flagelares *flaA* y *flaB* de *H. pylori* en fase logarítmica de crecimiento. **B)** Efecto de los AGCL en la motilidad *H. pylori* en placas de agar suave, la cual está expresado como diámetro de las distancias de migración de las colonias. **C)** Expresión detectada por RT-qPCR de los genes de las adhesinas *sabA*, *babA*, y *hopQ* de *H. pylori* en la fase logarítmica de crecimiento. **D)** Niveles de adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales de AGS. Las bacterias fueron crecidas en presencia de cada AGCL probado y entonces inoculado con AGCL a una monocapa de células epiteliales de AGS a una MOI de 100 durante 6h a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% CO₂. **E)** Cuantificación de la formación de biopelículas en presencia o no de de AGCL. La formación de biopelículas fue determinada midiendo la captación de Cristal Violeta de la bacteria. Todos los experimentos fueron realizados en presencia o no de una concentración final de AGCL

de 250 μ M. Datos expresados como veces de cambio de la expresión, UFC/mL o absorbancia, representan la media con desviaciones estándar obtenida de tres experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

7.8. Los ácidos palmítico y oleico estimulan la transcripción del gen *mraY* para la síntesis del peptidoglicano

Con el fin de determinar el efecto de los AGCL en la expresión de los componentes de la envoltura celular de *H. pylori*, se cuantificó el nivel de transcripción de los genes *mraY*, *pbp1A* y *waaL*, los cuales codifican para la fosfo-N-acetilmuramoil-pentapéptido-transferasa, la proteína de unión a penicilina 1A y a la ligasa lípido A core-O-antígeno, respectivamente. El nivel de transcripción del gen *mraY* incrementó 13 y 6 veces en presencia del ácido palmítico y oleico, respectivamente, mientras que no se afectó por los otros AGCL probados (Figura 14). Por el contrario, ninguno de los AGCL evaluados afectó significativamente la transcripción de los genes *pbp1* y *waaL* (Figura 14). Por lo tanto, estos resultados indican que los ácidos palmítico y oleico aumentan el nivel de transcripción del gen *mraY*, requerido para la síntesis del peptidoglicano.

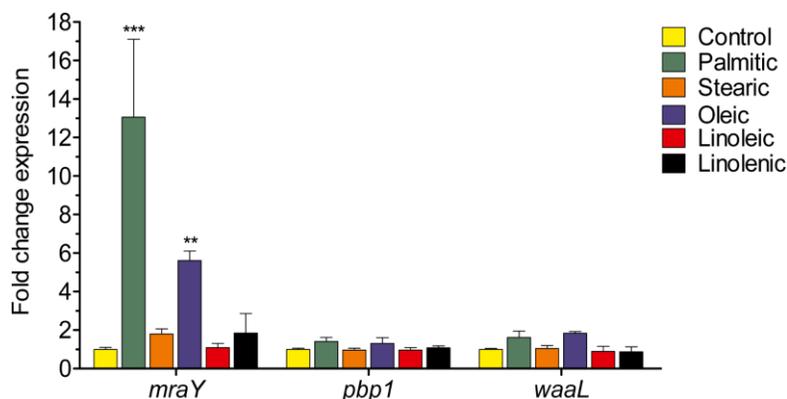


Figura 14: Efecto de los AGCL sobre la expresión de los genes de la envoltura celular. A) La expresión cuantificada por RT-qPCR de los genes de la envoltura de *H. pylori* en fase logarítmica de crecimiento en presencia o no de AGCL a una concentración final 250 μ M. Los datos representan la media con desviaciones estándar obtenidos de tres experimentos realizados por triplicado. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

7.9. El efecto de los AGCL en la transcripción de los genes *vacA* y *ureAB*

En *H. pylori*, la citotoxina *VacA* y la enzima ureasa son requeridos para la vacuolización de células eucariotas y supervivencia bacteriana a pH ácido, respectivamente (Mobley, 1996; Palframan *et al.*, 2012). Para determinar si los AGCL afectan estos fenotipos de virulencia de *H. pylori*, se cuantificó el nivel de transcripción de los genes *vacA*, *ureA* y *ureB*. La transcripción de *vacA* se incrementó significativamente 2 veces ($p < 0,01$) en presencia de los ácidos palmítico y oleico, pero no se vió afectada por los otros AGCL probados (Figura 15A). Aunque el nivel de transcripción de *ureA* no se afectó con ninguno de los AGCL probados, se observó una disminución de dos veces en la expresión genética de *ureB* cuando *H. pylori* se trató con ácido linoleico (Figura 15B).

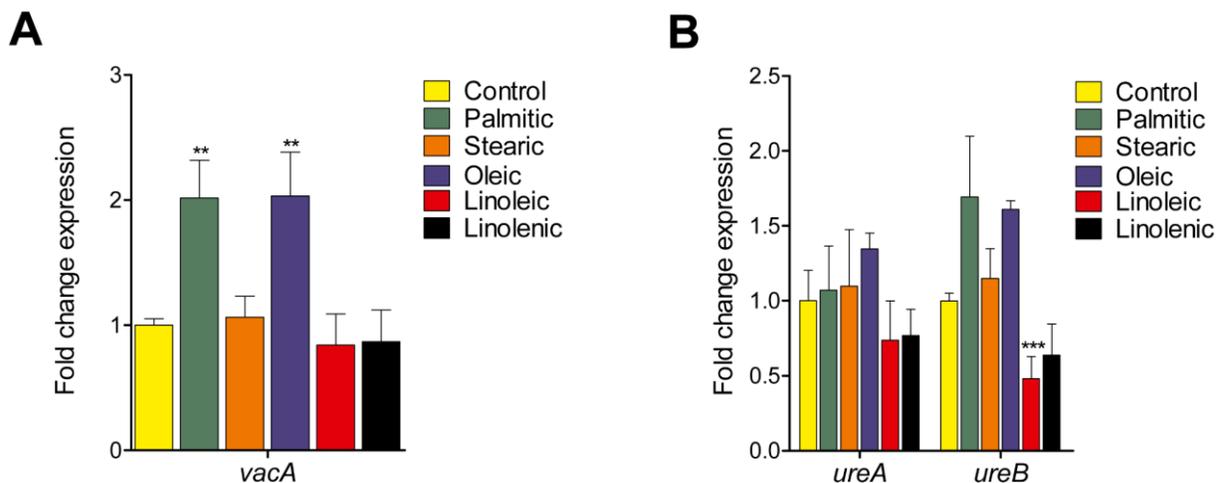


Figura 15: Efecto de los AGCL en la expresión de los genes *vacA* y *ureAB*. La expresión determinada por RT-qPCR del gen *vacA* que codifica la citotoxina vacuolizante (A), y los genes *ureA* y *ureB* que codifican las subunidades de la enzima ureasa (B), en fase logarítmica de crecimiento en presencia o no de AGCL a una concentración final 250 μ M. Los datos representan la media con desviaciones estándar obtenidos de tres experimentos separados realizados por triplicado. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

7.10. Los AGCL regulan diferencialmente la transcripción de los genes reguladores de *H. pylori*.

El genoma de *H. pylori* codifica un número limitado de reguladores transcripcionales, los cuales controlan la expresión de genes involucrados en la supervivencia, el metabolismo y la patogenicidad bacteriana. Se determinó el efecto de los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico sobre la transcripción de genes que codifican para varios de estos factores de transcripción. Con excepción del gen *hrcA*, el resto de genes reguladores evaluados (*nikR*, *fur*, *cheY*, *arsR*, *flgR*, *hspR*, *hsrA*, *hup* y *crdR*) mostraron niveles aumentados de transcripción en presencia de los ácidos palmítico y oleico, mientras que los ácidos linoleico y linolénico regulan positivamente o negativamente la transcripción de varios de estos genes como *fur*, *hrcA*, *arsR*, *flgR*, *hspR*, *hup* y *crdR* (Figura 16). Por lo tanto, estos resultados revelan que los AGCL probados ejercen un efecto regulador diferencial sobre los genes que codifican varios reguladores transcripcionales de *H. pylori*.

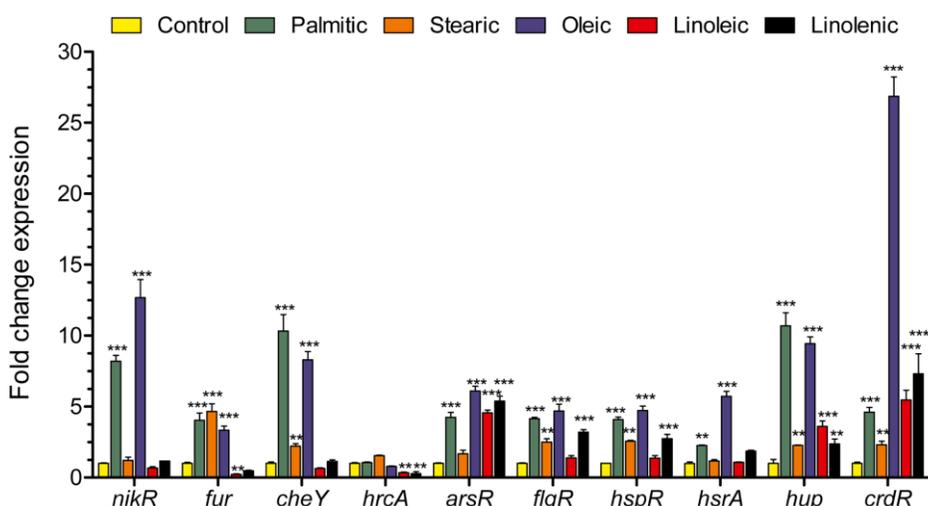


Figura 16: Efecto de AGCL en la expresión de diferentes genes reguladores. Expresión determinada por RT-qPCR de los genes reguladores *nikR*, *fur*, *cheY*, *hrcA*, *arsR*, *flgR*, *hspR*, *hsrA*, *hup* y *crdR* en fase logarítmica de crecimiento en presencia o no de AGCL a una concentración final de 250 μ M. Los datos representan la media con desviaciones estándar obtenidos de tres experimentos separados realizados por triplicado. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control: **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Los cambios en la expresión génica relativa de los genes de virulencia y los reguladores transcripcionales de *H. pylori* en presencia de AGCL se integraron en un mapa de calor, para visualizar más fácilmente el perfil de expresión (Figura 17). Los ácidos palmítico y oleico fueron los dos AGCL que principalmente regularon positivamente los genes de virulencia evaluados, como *flaB*, *sabA*, *cagM*, *cagL*, *vacA* y *mraY*, así como también estimularon la transcripción de casi todos los genes que codifican factores de transcripción probados. Por otro lado, los ácidos linoleico y linolénico afectaron de manera similar a dos grupos de genes reguladores: *nikR*, *fur*, *cheY* y *hrcA* fueron reprimidos, mientras que *arsR*, *flgR*, *hspR*, *hsrA*, *hup* y *crdR* fueron regulados positivamente por estos AGCL.

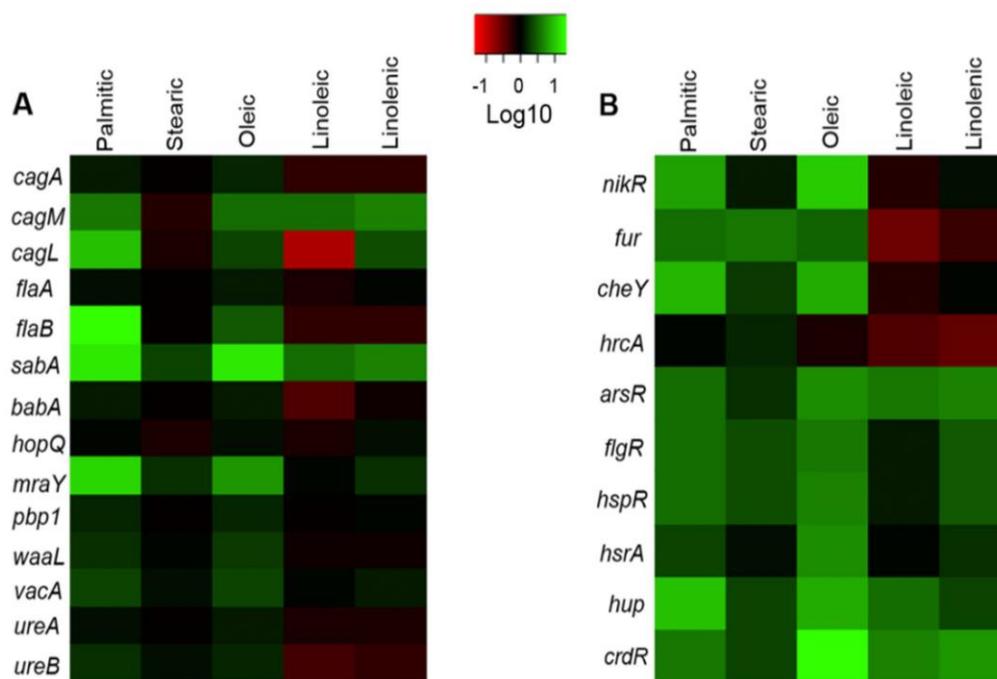


Figura 17: Resumen de los efectos de diferentes AGCL sobre la expresión transcripcional de la virulencia de *H. pylori* y los reguladores transcripcionales. Mapa de calor de los niveles de expresión génica en presencia de diferentes AGCL: palmítico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico, **A)** De los factores de virulencia y **B)** De los reguladores transcripcionales. Los valores de expresión génica relativa se expresan como *fold change* o veces de cambio en una escala Log^{10} . La escala de codificación de colores denota regulación positiva en verde y regulación negativa en rojo.

8. DISCUSIÓN

Helicobacter pylori es un microorganismo adaptado a un nicho específico: la mucosa gástrica humana, la cual además extremo dadas las condiciones de acidez del mismo. Nuestro grupo ha descrito que las señales ambientales como el pH ácido, el hierro, el níquel o el cobre son cruciales para controlar la transcripción de genes de virulencia y reguladores de esta bacteria (Cárdenas-Mondragón *et al.*, 2016; De la Cruz *et al.*, 2017). En este contexto, algunos reportes indican que los AGCL pueden actuar como moléculas señalizadoras, alterando la transcripción de genes que codifican factores de virulencia en diferentes bacterias patógenas (Chatterjee *et al.*, 2007; Ehrh y Schnappinger, 2007; Golubeva *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2010). Los AGCL se encuentran principalmente en los fosfolípidos, tanto de membranas procariotas como de eucariotas, lípido A de LPS, sales biliares y dieta diaria. Los ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico y araquidónico son los principales AGCL que forman los fosfolípidos de la membrana eucariota, que pueden sintetizarse *de novo* o modificarse mediante reacciones de desacilación/reacilación (Hulbert *et al.*, 2014; Schmid *et al.*, 1995). En este trabajo se evaluó el efecto del ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico sobre la transcripción de genes que codifican los principales factores de virulencia y diferentes reguladores transcripcionales de *H. pylori*.

Los ácidos palmítico y oleico fueron los dos AGCL que regularon principalmente positivamente los genes de virulencia evaluados, como *flaB*, *sabA*, *cagM*, *cagL*, *vacA* y *mraY*, los cuales están involucrados en la motilidad, adherencia y síntesis de la pared celular. Los ácidos palmítico y oleico también estimularon la expresión de casi todos los genes que codifican para factores de transcripción probados. Por otro lado, los ácidos linoleico y linolénico afectaron de manera similar a dos grupos de genes reguladores:

nikR, *fur*, *cheY* y *hrcA* fueron reprimidos, mientras que *arsR*, *flgR*, *hspR*, *hsrA*, *hup* y *crdR* fueron regulados positivamente por estos AGCL.

Se ha demostrado que algunos AGCL afectan la función de factores transcripcionales de diferentes familias. HlID y ToxT son dos factores de transcripción tipo AraC, que actúan como reguladores maestros de los genes de virulencia en *Salmonella* y *Vibrio*, respectivamente (Ellermeier y Slauch, 2007; Weber y Klose, 2011). Los ácidos palmítico y oleico reprimieron la expresión de *hlID* y *toxT*; además, el ácido oleico se une directamente y, por lo tanto, bloquea la actividad de unión al DNA de HlID y ToxT (Cruite *et al.*, 2019; Golubeva *et al.*, 2016). Además, los ácidos palmítico y oleico redujeron la afinidad de unión al DNA de los reguladores tipo TetR Rv3249c/Rv1816 y TfmR de *M. tuberculosis* y *Xanthomonas citri*, respectivamente (Delmar *et al.*, 2015; Teper *et al.*, 2019). Por lo tanto, es razonable proponer que los ácidos palmítico y oleico también interactúan con algunos reguladores transcripcionales positivos o negativos de *H. pylori* y, por lo tanto, afectan la expresión de genes de virulencia en esta bacteria.

Con respecto al efecto de los AGCL sobre la expresión de *cagPAI*, los ácidos palmítico, oleico y linolénico activaron la transcripción de los genes *cagL* y *cagM*, que codifican para los componentes estructurales del SST4, mientras que la transcripción del gen de la citotoxina CagA no se vio afectada significativamente por cualquiera de los AGCL probados. Además, la secreción de IL-8 de las células epiteliales de AGS se estimuló solamente cuando *H. pylori* creció en presencia de ácido palmítico. Nuestros resultados sugieren que el ácido palmítico podría ser una molécula de señalización involucrada en la estimulación de la inflamación de la mucosa gástrica independiente de CagA. De acuerdo con esta noción, se ha demostrado que CagL es capaz de estimular la secreción de IL-8 independientemente de la translocación de CagA (Gorrell *et al.*,

2013). Esta inflamación independiente de CagA podría estar respaldada por la baja asociación entre la dispepsia y las cepas *H. pylori* CagA+ observada en algunas cohortes de pacientes en todo el mundo (Andreolla *et al.*, 2016; Bommelaer *et al.*, 2001; Heikkinen *et al.*, 1998; Nordenstedt *et al.*, 2007; Vasiliou *et al.*, 2014). Los efectos positivos del ácido palmítico sobre la transcripción de *sabA* y sobre la adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales de AGS potenciarían el proceso inflamatorio, ya que SabA es una adhesina necesaria para una fuerte interacción entre la bacteria y las células epiteliales gástricas, lo que favorece la inflamación de la mucosa gástrica (Mahdavi *et al.*, 2002). Aunque se ha reportado que los flagelos y el peptidoglicano son estructuras implicadas en la formación de biopelículas por *H. pylori* (Hathroubi *et al.*, 2018), la presencia del ácido palmítico, que regula positivamente la transcripción de los genes *flaB* y *mraY* (los cuales codifican para la flagelina FlaB y la enzima MraY relacionada con la biosíntesis de peptidoglicano, respectivamente), no afectó a la formación de biopelículas por *H. pylori*. Estas observaciones sugieren que múltiples factores están involucrados en la formación de biopelículas por *H. pylori* en respuesta a diferentes señales ambientales.

A diferencia de los ácidos palmítico y oleico, el ácido linolénico reguló negativamente la transcripción de genes de virulencia como *flaB*, *ureB*, *babA* y *cagL*, y también la de los genes reguladores *fur* y *hrcA*. En *V. cholerae*, los ácidos oleico, linoleico y araquidónico reprimieron la expresión de los genes *ctxAB* y *tcpA*, que codifican para la toxina del cólera y el pilus tipo IV TCP, respectivamente (Chatterjee *et al.*, 2007). Es destacable que el ácido linoleico también aumentó la motilidad de *V. cholerae*, estimulando la expresión del gen *flrA*, que codifica el regulador transcripcional superior que controla la motilidad en esta bacteria (Chatterjee *et al.*, 2007). Este doble efecto sobre la virulencia o los genes reguladores también se observó para algunos

AGCL en nuestro estudio. Por ejemplo, el ácido linolénico mejoró la transcripción de los genes reguladores *arsR*, *hsrA*, *hup* y *crdR*, pero disminuyó la transcripción de los genes reguladores *hrcA* y *fur*.

Nuestros datos apoyan las vías reguladoras previamente reportadas para algunos de los genes y fenotipos que evaluamos en este estudio. Por ejemplo, se ha demostrado que el regulador transcripcional FlgR induce la expresión de *flaB* pero no la de *flaA*, los genes que codifican para las flagelinas de *H. pylori*, que se expresan como unidades transcripcionales independientes, y se demostró que FlgR es necesario para la motilidad de *H. pylori* (Spohn y Scarlato, 1999). De forma coherente con estos hallazgos, nuestros resultados indicaron que los ácidos palmítico y oleico regulan positivamente la transcripción de los genes *flgR* y *flaB*, pero no la del gen *flaA*. Aunque el ácido esteárico y linolénico indujeron la expresión del gen *flgR*, estos AGCL no afectaron la expresión de *flaB*, lo que sugiere otros mecanismos reguladores. Además, se encontró que el ácido palmítico mejoraba la motilidad de *H. pylori*. Como se describió anteriormente, se observó el efecto positivo de un AGCL sobre la motilidad para *V. cholerae*, ya que el ácido linoleico aumentó el nado bacteriano por sobrerregulación del regulador flagelar FlrA (Chatterjee *et al.*, 2007). Nuestros resultados sugieren que el ácido palmítico actúa como una molécula de señalización que favorece la motilidad de *H. pylori*, al inducir la expresión del gen *flaB* a través del regulador FlgR.

La transcripción de los genes *fur* y *ureB* se reprimió en presencia de ácido linoleico, lo que respalda las observaciones de que *ureB* está controlado negativamente por 5' *ureB*-sRNA, que a su vez es reprimido por el sistema de dos componentes ArsRS (Wen *et al.*, 2003), y este operón bicistrónico es reprimido por el regulador Fur (Roncarati *et al.*, 2016). En términos de *sabA*, se reportó anteriormente que este gen de adhesina

fue reprimido por el sistema de dos componentes ArsRS en la cepa J99 de *H. pylori* (Goodwin *et al.*, 2008). Sin embargo, nuestros datos mostraron que todos los AGCL, excepto el ácido esteárico, pudieron estimular la expresión de los genes *arsR* y *sabA*, lo que sugiere que el sistema de dos componentes ArsRS regula positivamente la transcripción de *sabA* en la cepa *H. pylori* 26695 en presencia de estos AGCL. Estas diferencias en la regulación de *sabA* entre ambas cepas podrían estar asociadas con la longitud del tracto poli-CT dentro de la porción 5' de la región codificante de cada cepa (Åberg *et al.*, 2014; Goodwin *et al.*, 2008), y la actividad de unión a DNA de ArsR podría ser modificada por la estructura local del DNA y/o interacción directa con algún AGCL.

Nuestro estudio muestra por primera vez que los AGCL afectan la expresión de los genes reguladores y de virulencia de *H. pylori*. El esclarecimiento de los mecanismos por los cuales los AGCL alteran la expresión de estos genes podría ayudar a desarrollar estrategias antiinfecciosas para contrarrestar las infecciones por *H. pylori*. El ácido palmítico y oleico fueron los dos principales AGCL que aumentaron la transcripción de genes de virulencia involucrados en la motilidad, adherencia y síntesis de la pared celular de *H. pylori*. Estos mismos ácidos grasos mejoran la expresión de casi todos los genes reguladores probados. Mientras, el ácido linolénico reprimió la transcripción de genes reguladores y de virulencia. Mientras que el ácido linolénico mostró un efecto dual sobre la expresión de ambas clases de genes en *H. pylori*.

9. CONCLUSIONES

- Los ácidos palmítico y oleico fueron los dos principales AGCL que incrementaron la transcripción de genes de virulencia involucrados en la motilidad, adherencia y síntesis de la pared celular de *H. pylori*.
- Los ácidos palmítico y oleico aumentaron la transcripción de casi todos los genes regulatorios examinados en este trabajo.

Mientras que el ácido linoleico reprimió la transcripción de los genes de virulencia y regulatorios, el ácido linolénico mostró un efecto dual sobre la expresión de ambas clases de genes en *H. pylori*.

10. PERSPECTIVAS

- Realizar un estudio de transcriptómica en presencia de los AGCL empleados en este estudio: ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico.
- Observar el efecto de otros AGCL de importancia en la dieta del humano como el ácido araquidónico (omega 6); ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico (ambos omega 3).
- Purificar los 10 reguladores transcripcionales (NikR, Fur, CheY, ArsR, FlgR, HspR, HsrA, Hup, CrdR y HrcA), sobre todo aquellos en donde se conozca mejor su regulatoria sobre de los factores de virulencia de *H. pylori* como Fur, FlgR y realizar ensayos de retardo electroforético con cada AGCL empleados en este estudio: ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Åberg, A., Gideonsson, P., Vallström, A., Olofsson, A., Öhman, C., Rakhimova, L., Borén, T., Engstrand, L., Brännström, K., & Arnqvist, A. (2014). A Repetitive DNA Element Regulates Expression of the *Helicobacter pylori* Sialic Acid Binding Adhesin by a Rheostat-like Mechanism. *PLoS Pathogens*, *10*(7), e1004234. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004234>
2. Akopyants, N. S., Clifton, S. W., Kersulyte, D., Crabtree, J. E., Youree, B. E., Reece, C. A., Bukanov, N. O., Drazek, E. S., Roe, B. A., & Berg, D. E. (2002). Analyses of the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori*: *H. pylori* pathogenicity island. *Molecular Microbiology*, *28*(1), 37-53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00770.x>
3. Alm, R. A., Ling, L.-S. L., Moir, D. T., King, B. L., Brown, E. D., Doig, P. C., Smith, D. R., Noonan, B., Guild, B. C., deJonge, B. L., Carmel, G., Tummino, P. J., Caruso, A., Uria-Nickelsen, M., Mills, D. M., Ives, C., Gibson, R., Merberg, D., Mills, S. D., ... Trust, T. J. (1999). Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, *397*(6715), 176-180. <https://doi.org/10.1038/16495>
4. Alm, R. A., y Noonan, B. (2001). Chapter 27 The Genome. En *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics* (pp. 1-48). American Society For Microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2429/>
5. Andreolla, H. F., Bona, L. R. de, Sander, G. B., Mazzoleni, L. E., Tavares, R. G., y Prolla, J. C. (2016). Lack of association between *Helicobacter pylori*'s virulence and increased serum c-reactive protein levels in functional dyspeptic patients.

- Arquivos de Gastroenterologia*, 53(1), 49-54. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032016000100010>
6. Ang, S., Lee, C.-Z., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., y Wang, J.-T. (2001). Acid-Induced Gene Expression in *Helicobacter pylori*: Study in Genomic Scale by Microarray. *Infection and Immunity*, 69(3), 1679-1686. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1679-1686.2001>
 7. Ansorg, R., y Schmid, E. N. (1998). Adhesion of *Helicobacter pylori* to yeast cells. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 288(4), 501-508. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(98\)80069-8](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(98)80069-8)
 8. Aranda, P. S., LaJoie, D. M., y Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
 9. Atherton, J. C., Cover, T. L., Papini, E., y Telford, J. L. (2001). Chapter 9 Vacuolating Cytotoxin. En *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics* (pp. 1-42). American Society For Microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2454/>
 10. Baj J, Forma A., Sitarz M., Sitarz M., Portincasa P., Garruti G., Krasowska D. y Maciejewski, R. (2020). *Helicobacter pylori* Virulence Factors-Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells*, 10(1):27. <https://doi.org/10.3390/cells10010027>
 11. Barragán, C. E, Gutiérrez-Escobar, A.J, y Castiblanco, L.P, R. J. (2014). Membrana externa de *Helicobacter pylori* y su papel en la adhesión al epitelio gástrico. *Universitas Médica*, 56(221), 44-62

12. Bereswill, S., Lichte, F., Vey, T., Fassbinder, F., y Kist, M. (1998). Cloning and characterization of the *fur* gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*, 159(2), 193-200. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb12860.x>
13. Bommelaer, G., Bruley Des Varannes, S., Fléjou, J. F., Matysiak, T., Poynard, T., Richard, A., Slama, A., Mégraud, F., y Groupe d'Etude HELIGASTRE. (2001). [CagA status and virulence of *Helicobacter pylori* strains. Results of a French multicentric prospective study]. *Gastroenterologie Clinique Et Biologique*, 25(12), 1084-1089. <https://doi.org/PMID: 11910990>
14. Bury-Moné, S., Thiberge, J.-M., Contreras, M., Maitournam, A., Labigne, A., y De Reuse, H. (2004). Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*: Regulation of the adaptive response of *H. pylori* to moderate acidity. *Molecular Microbiology*, 53(2), 623-638. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04137.x>
15. Campbell, E. A., Choi, S. Y., y Masure, H. R. (1998). A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Molecular Microbiology*, 27(5), 929-939. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00737.x>
16. Cárdenas-Mondragón, M. G., Ares, M. A., Panunzi, L. G., Pacheco, S., Camorlinga-Ponce, M., Girón, J. A., Torres, J., y De la Cruz, M. A. (2016). Transcriptional Profiling of Type II Toxin–Antitoxin Genes of *Helicobacter pylori* under Different Environmental Conditions: Identification of HP0967–HP0968 System. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01872>
17. Carrero, J. J., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., y Jiménez, J. (2005). Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición. Hospitalaria.*, XX (1), 63-69.

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112005000100010

18. Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., & Covacci, A. (1996). *Cag* a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14648-14653. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14648>
19. Chatterjee, A., Dutta, P. K., y Chowdhury, R. (2007). Effect of Fatty Acids and Cholesterol Present in Bile on Expression of Virulence Factors and Motility of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 75(4), 1946-1953. <https://doi.org/10.1128/IAI.01435-06>
20. Choi, S.-G., Won, S.-R., y Rhee, H.-I. (2010). Oleic Acid and Inhibition of Glucosyltransferase. En *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 1375-1383). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00153-4>
21. Correia, M., Michel, V., Matos, A. A., Carvalho, P., Oliveira, M. J., Ferreira, R. M., Dillies, M.-A., Huerre, M., Seruca, R., Figueiredo, C., Machado, J. C., y Touati, E. (2012). Docosahexaenoic Acid Inhibits *Helicobacter pylori* Growth In Vitro and Mice Gastric Mucosa Colonization. *PLoS ONE*, 7(4), e35072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035072>
22. Correia, M., Michel, V., Osório, H., El Ghachi, M., Bonis, M., Boneca, I. G., De Reuse, H., Matos, A. A., Lenormand, P., Seruca, R., Figueiredo, C., Machado, J. C., & Touati, E. (2013). Crosstalk between *Helicobacter pylori* and Gastric Epithelial Cells Is Impaired by Docosahexaenoic Acid. *PLoS ONE*, 8(4), e60657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060657>

23. Covacci, A., y Rappuoli, R. (1998). *Helicobacter pylori*: Molecular evolution of a bacterial quasi-species. *Current Opinion in Microbiology*, 1(1), 96-102. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80148-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80148-3)
24. Cover, T. L., Puryear, W., Perez-Perez, G. I., y Blaser, M. J. (1991). Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Infection and Immunity*, 59(4), 1264-1270. <https://doi.org/10.1128/iai.59.4.1264-1270.1991>
25. Cruite, J. T., Kovacicova, G., Clark, K. A., Woodbrey, A. K., Skorupski, K., y Kull, F. J. (2019). Structural basis for virulence regulation in *Vibrio cholerae* by unsaturated fatty acid components of bile. *Communications Biology*, 2(1), 440. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0686-x>
26. Danielli, A., Amore, G., y Scarlato, V. (2010). Built Shallow to Maintain Homeostasis and Persistent Infection: Insight into the Transcriptional Regulatory Network of the Gastric Human Pathogen *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000938. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000938>
27. De la Cruz, M. A., Ares, M. A., von Bargen, K., Panunzi, L. G., Martínez-Cruz, J., Valdez-Salazar, H. A., Jiménez-Galicia, C., y Torres, J. (2017). Gene Expression Profiling of Transcription Factors of *Helicobacter pylori* under Different Environmental Conditions. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00615>
28. Delmar, J. A., Chou, T.-H., Wright, C. C., Licon, M. H., Doh, J. K., Radhakrishnan, A., Kumar, N., Lei, H.-T., Bolla, J. R., Rajashankar, K. R., Su, C.-C., Purdy, G. E., y Yu, E. W. (2015). Structural Basis for the Regulation of the MmpL Transporters

- of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(47), 28559-28574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683797>
29. Denic, M., Touati, E., Y De Reuse, H. (2020). Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 25(S1). <https://doi.org/10.1111/hel.12736>
30. Doig, P., de Jonge, B. L., Alm, R. A., Brown, E. D., Uria-Nickelsen, M., Noonan, B., Mills, S. D., Tummino, P., Carmel, G., Guild, B. C., Moir, D. T., Vovis, G. F., & Trust, T. J. (1999). *Helicobacter pylori* Physiology Predicted from Genomic Comparison of Two Strains. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 675-707. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.675-707.1999>
31. Dorocicz, I. R., Williams, P. M., y Redfield, R. J. (1993). The *Haemophilus influenzae* adenylate cyclase gene: Cloning, sequence, and essential role in competence. *Journal of Bacteriology*, 175(22), 7142-7149. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7142-7149.1993>
32. Dunn, B. E., Campbell, G. P., Perez-Perez, G. I., y Blaser, M. J. (1990). Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *Journal of Biological Chemistry*, 265(16), 9464-9469. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38872-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38872-6)
33. Eaton, K. A., Morgan, D. R., y Krakowka, S. (1989). *Campylobacter pylori* virulence factors in gnotobiotic piglets. *Infection and Immunity*, 57(4), 1119-1125. <https://doi.org/10.1128/iai.57.4.1119-1125.1989>
34. Eaton, K. A., Morgan, D. R., y Krakowka, S. (1992). Motility as a factor in the colonisation of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori*. *Journal of Medical Microbiology*, 37(2), 123-127. <https://doi.org/10.1099/00222615-37-2-123>

35. Ehrt, S., y Schnappinger, D. (2007). Mycobacterium tuberculosis virulence: Lipids inside and out. *Nature Medicine*, 13(3), 284-285. <https://doi.org/10.1038/nm0307-284>
36. Ellermeier, J. R., y Slauch, J. M. (2007). Adaptation to the host environment: Regulation of the SPI1 type III secretion system in *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. *Current Opinion in Microbiology*, 10(1), 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.12.002>
37. Fattore, E., y Fanelli, R. (2013). Palm oil and palmitic acid: A review on cardiovascular effects and carcinogenicity. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 64(5), 648-659. <https://doi.org/10.3109/09637486.2013.768213>
38. Golubeva, Y. A., Ellermeier, J. R., Cott Chubiz, J. E., y Slauch, J. M. (2016). Intestinal Long-Chain Fatty Acids Act as a Direct Signal To Modulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System. *MBio*, 7(1), e02170-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02170-15>
39. Goodwin, A. C., Weinberger, D. M., Ford, C. B., Nelson, J. C., Snider, J. D., Hall, J. D., Paules, C. I., Peek, R. M., y Forsyth, M. H. (2008). Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction system. *Microbiology*, 154(8), 2231-2240. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016055-0>
40. Gorrell, R. J., Guan, J., Xin, Y., Tafreshi, M. A., Hutton, M. L., McGuckin, M. A., Ferrero, R. L., y Kwok, T. (2013). A novel NOD1- and CagA-independent pathway of interleukin-8 induction mediated by the *Helicobacter pylori* type IV secretion

- system: The role of *H. pylori* CagL in IL-8 secretion. *Cellular Microbiology*, 15(4), 554-570. <https://doi.org/10.1111/cmi.12055>
41. Harris, P., Mobley, H., Perez-Perez, G., Blaser, M., y Smith, P. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology*, 111(2), 419-425. <https://doi.org/10.1053/gast.1996.v111.pm8690207>
42. Hathroubi, S., Zerebinski, J., y Ottemann, K. M. (2018). *Helicobacter pylori* Biofilm Involves a Multigene Stress-Biased Response, Including a Structural Role for Flagella. *MBio*, 9(5), e01973-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01973-18>
43. Heikkinen, M., Mayo, K., Mégraud, F., Vornanen, M., Marin, S., Pikkarainen, P., y Julkunen, R. (1998). Association of CagA-Positive and CagA-Negative *Helicobacter pylori* Strains with Patients' Symptoms and Gastritis in Primary Care Patients with Functional Upper Abdominal Complaints. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 33(1), 31-38. <https://doi.org/10.1080/00365529850166176>
44. Hu, L. T., Foxall, P. A., Russell, R., y Mobley, H. L. (1992). Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB. *Infection and Immunity*, 60(7), 2657-2666. <https://doi.org/10.1128/iai.60.7.2657-2666.1992>
45. Hug, I., Couturier, M. R., Rooker, M. M., Taylor, D. E., Stein, M., y Feldman, M. F. (2010). *Helicobacter pylori* Lipopolysaccharide Is Synthesized via a Novel Pathway with an Evolutionary Connection to Protein N-Glycosylation. *PLoS Pathogens*, 6(3), e1000819. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000819>

46. Hulbert, A. J., Kelly, M. A., y Abbott, S. K. (2014). Polyunsaturated fats, membrane lipids and animal longevity. *Journal of Comparative Physiology B*, 184(2), 149-166. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0786-8>
47. Ilver, D., Arnqvist, A., Ögren, J., Frick, I.-M., Kersulyte, D., Incecik, E. T., Berg, D. E., Covacci, A., Engstrand, L., y Borén, T. (1998). *Helicobacter pylori* Adhesin Binding Fucosylated Histo-Blood Group Antigens Revealed by Retagging. *Science*, 279(5349), 373-377. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.373>
48. Jahn, C. E., Charkowski, A. O., y Willis, D. K. (2008). Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *Journal of Microbiological Methods*, 75(2), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.004>
49. Javaheri, A., Kruse, T., Moonens, K., Mejías-Luque, R., Debraekeleer, A., y Asche, C. L. (2016). *Helicobacter pylori* adhesin HopQ engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nature Microbiology*, 1-16. <http://www.nature.com/articles/nmicrobiol2016189>.
50. Jenks, P. J., Foynes, S., Ward, S. J., Constantinidou, C., Penn, C. W., y Wren, B. W. (1997). A flagellar-specific ATPase (Flil) is necessary for flagellar export in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiology Letters*, 152(2), 205-211. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10429.x>
51. Jiang, Q., Hiratsuka, K., y Taylor, D. E. (1996). Variability of gene order in different *Helicobacter pylori* strains contributes to genome diversity. *Molecular Microbiology*, 20(4), 833-842. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02521.x>

52. Jiménez-Soto, L. F., Rohrer, S., Jain, U., Ertl, C., Sewald, X., y Haas, R. (2012). Effects of Cholesterol on *Helicobacter pylori* Growth and Virulence Properties *In Vitro*: Effects of Cholesterol in *H. pylori*. *Helicobacter*, 17(2), 133-139. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2011.00926.x>
53. Kang, Y., Zarzycki-Siek, J., Walton, C. B., Norris, M. H., y Hoang, T. T. (2010). Multiple FadD Acyl-CoA Synthetases Contribute to Differential Fatty Acid Degradation and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 5(10), e13557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013557>
54. Kao, C.-Y., Chen, J.-W., Wang, S., Sheu, B.-S., y Wu, J.-J. (2017). The *Helicobacter pylori* J99 jhp0106 Gene, under the Control of the CsrA/RpoN Regulatory System, Modulates Flagella Formation and Motility. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00483>
55. Kaur, N., Chugh, V., y Gupta, A. K. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2289-2303. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0677-0>
56. Kenar, J. A., Moser, B. R., y List, G. R. (2017). Chapter 2—Naturally Occurring Fatty Acids: Source, Chemistry, and Uses. En *Fatty Acids: Chemistry, Synthesis, and Applications* (pp. 23-82). Elsevier. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128095218000027>
57. Königer, V., Holsten, L., Harrison, U., Busch, B., Loell, E., Zhao, Q., Bonsor, D. A., Roth, A., Kengmo-Tchoupa, A., Smith, S. I., Mueller, S., Sundberg, E. J., Zimmermann, W., Fischer, W., Hauck, C. R., y Haas, R. (2016). Erratum: *Helicobacter pylori* exploits human CEACAMs via HopQ for adherence and

- translocation of CagA. *Nature Microbiology*, 2(1), 16233.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.233>
58. Krishnamurthy, P., Phadnis, S. H., DeLoney, C. R., Rosenthal, R. S., y Dunn, B. E. (2001). Chapter 14 Biosynthetic Pathways Related to Cell Structure and Function. En *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. American Society For Microbiology. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2415/>
59. Li, H., Yang, T., Liao, T., Debowski, A. W., Nilsson, H.-O., Fulurija, A., Haslam, S. M., Mulloy, B., Dell, A., Stubbs, K. A., Marshall, B. J., y Benghezal, M. (2017). The redefinition of *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide O-antigen and core-oligosaccharide domains. *PLOS Pathogens*, 13(3), e1006280.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006280>
60. Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
61. Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F. O., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.-A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D. E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.-E., Norberg, T., Lindh, F., ... Borén, T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA Adhesin in Persistent Infection and Chronic Inflammation. *Science*, 297(5581), 573-578.
<https://doi.org/10.1126/science.1069076>
62. Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S., y Buono, P. (2015). Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules*, 20(9), 17339-17361.
<https://doi.org/10.3390/molecules200917339>

63. Marshall, B. J. (1991). III. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 6(2), 121-124.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.1991.tb01450.x>
64. Matta, A. J., Zambrano, D. C., Martínez, Y. C., y Fernández, F. F. (2022). Point mutations in the glycosyltransferase domain of the *pbp1a* gene in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori* isolates. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, S2255534X22000457.
<https://doi.org/10.1016/j.rgm xen.2021.05.015>
65. Matsuo, Y., Kido, Y., Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins*, 9(3), 101.
<https://doi.org/10.3390/toxins9030101>
66. Mendum, T. A., Wu, H., Kierzek, A. M., y Stewart, G. R. (2015). Lipid metabolism and Type VII secretion systems dominate the genome scale virulence profile of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *BMC Genomics*, 16(1), 372.
<https://doi.org/10.1186/s12864-015-1569-2>
67. Merrell, D. S., Goodrich, M. L., Otto, G., Tompkins, L. S., y Falkow, S. (2003). PH-Regulated Gene Expression of the Gastric Pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 71(6), 3529-3539. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3529-3539.2003>
68. Mobley, H. L. T. (1996). Defining *Helicobacter pylori* as a Pathogen: Strain Heterogeneity and Virulence. *The American Journal of Medicine*, 100, 2S-11S.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(96\)80223-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(96)80223-3)

69. Molnar, B., Galamb, O., Sipos, F., Leiszter, K., y Tulassay, Z. (2010). Molecular Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection: The Role of Bacterial Virulence Factors. *Digestive Diseases*, 28(4-5), 604-608. <https://doi.org/10.1159/000320060>
70. Nelson, D., L., & Cox, M. M. (2017). Lehninger principles of biochemistry. (7th ed.). New York, NY: W.H. Freeman. ISBN: 1464126119.
71. Necchi, V., Candusso, M. E., Tava, F., Luinetti, O., Ventura, U., Fiocca, R., Ricci, V., Y Solcia, E. (2007). Intracellular, Intercellular, and Stromal Invasion of Gastric Mucosa, Preneoplastic Lesions, and Cancer by *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*, 132(3), 1009-1023. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.049>
72. Nordenstedt, H., Nilsson, M., Johnsen, R., Lagergren, J., y Hveem, K. (2007). *Helicobacter pylori* Infection and Gastroesophageal Reflux in a Population-Based Study (The HUNT Study). *Helicobacter*, 12(1). <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2007.00466.x>
73. Ohnishi, N., Yuasa, H., Tanaka, S., Sawa, H., Miura, M., Matsui, A., Higashi, H., Musashi, M., Iwabuchi, K., Suzuki, M., Yamada, G., Azuma, T., y Hatakeyama, M. (2008). Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 1003-1008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711183105>
74. Okamoto, T. (2002). A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6), 849-856. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf140>

75. Palframan, S. L., Kwok, T., y Gabriel, K. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00092>
76. Park, J.-M., Jeong, M., Kim, E.-H., Han, Y.-M., Kwon, S. H., y Hahm, K.-B. (2015). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Intake to Regulate *Helicobacter pylori* - Associated Gastric Diseases as Nonantimicrobial Dietary Approach. *BioMed Research International*, 2015, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2015/712363>
77. Paul, R., Postius, S., Melchers, K., y Schäfer, K. P. (2001). Mutations of the *Helicobacter pylori* Genes *rdxA* and *pbp1* Cause Resistance against Metronidazole and Amoxicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 962-965. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.962-965.2001>
78. Pellicciari, S., Pinatel, E., Vannini, A., Peano, C., Puccio, S., De Bellis, G., Danielli, A., Scarlato, V., y Roncarati, D. (2017). Insight into the essential role of the *Helicobacter pylori* HP1043 orphan response regulator: Genome-wide identification and characterization of the DNA-binding sites. *Scientific Reports*, 7(1), 41063. <https://doi.org/10.1038/srep41063>
79. Pitcher, D. G., Saunders, N. A., y Owen, R. J. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151-156. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1989.tb00262.x>
80. Porwollik, S., Noonan, B., y O'Toole, P. W. (1999). Molecular Characterization of a Flagellar Export Locus of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 67(5), 2060-2070. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.5.2060-2070.1999>

81. PubChem Compound Summary for CID 5281, Stearic acid. (2022). *National Center for Biotechnology Information*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Stearic-acid>
82. PubChem Compound Summary for CID 445639, Oleic acid. (2022). *National Center for Biotechnology Information*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleic-acid>
83. PubChem Compound Summary for CID 5280450, Linoleic acid. (2022). *National Center for Biotechnology Information*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linoleic-acid>
84. PubChem Compound Summary for CID 5280934, Linolenic acid. (2022). *National Center for Biotechnology Information* (2022).
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Linolenic-acid>
85. Rassow, J., y Meinecke, M. (2012). *Helicobacter pylori* VacA: A new perspective on an invasive chloride channel. *Microbes and Infection*, 14(12), 1026-1033.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.07.002>
86. Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T., y Sasatsu, M. (2008). Mutations in penicillin-binding proteins 1, 2 and 3 are responsible for amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 995-998.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkn051>
87. Roncarati, D., Pellicciari, S., Doniselli, N., Maggi, S., Vannini, A., Valzania, L., Mazzei, L., Zambelli, B., Rivetti, C., y Danielli, A. (2016). Metal-responsive promoter DNA compaction by the ferric uptake regulator. *Nature Communications*, 7(1), 12593. <https://doi.org/10.1038/ncomms12593>

88. Ruan, X., Loyola, D. E., Marolda, C. L., Perez-Donoso, J. M., y Valvano, M. A. (2012). The WaaL O-antigen lipopolysaccharide ligase has features in common with metal ion-independent inverting glycosyltransferases*. *Glycobiology*, 22(2), 288-299. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr150>
89. Sanders, L., Andermann, T. M., y Ottemann, K. M. (2013). A supplemented soft agar chemotaxis assay demonstrates the *Helicobacter pylori* chemotactic response to zinc and nickel. *Microbiology*, 159(Pt_1), 46-57. <https://doi.org/10.1099/mic.0.062877-0>
90. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., y Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234-258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
91. Schmid, P. C., Deli, E., y Haral, H. O. (1995). Generation and Remodeling of Phospholipid Molecular Species in Rat Hepatocytes. 1995, 319(1), 168-176. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1279>
92. Spohn, G., y Scarlato, V. (1999). Regulation of transcription in *Helicobacter pylori*: Simple systems or complex circuits? *Journal of Bacteriology*, 181(2), 593-599. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93415/>
93. Sycuro, L. K., Wyckoff, T. J., Biboy, J., Born, P., Pincus, Z., Vollmer, W., y Salama, N. R. (2012). Multiple Peptidoglycan Modification Networks Modulate *Helicobacter pylori*'s Cell Shape, Motility, and Colonization Potential. *PLoS Pathogens*, 8(3), e1002603. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002603>

94. Szczebara, F., Dhaenens, L., Armand, S., y Husson, M. O. (1999). Regulation of the transcription of genes encoding different virulence factors in *Helicobacter pylori* by free iron. *FEMS Microbiology Letters*, 175(2), 165-170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13615.x>
95. Teper, D., Zhang, Y., y Wang, N. (2019). TfmR, a novel TetR-family transcriptional regulator, modulates the virulence of *Xanthomonas citri* in response to fatty acids. *Molecular Plant Pathology*, 20(5), 701-715. <https://doi.org/10.1111/mpp.12786>
96. Thompson, L., Cockayne, A., y Spiller, R. C. (1994). Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on the growth of *Helicobacter pylori*: A possible explanation of the effect of diet on peptic ulceration. *Gut*, 35(11), 1557-1561. <https://doi.org/10.1136/gut.35.11.1557>
97. Thompson, L. J., Merrell, D. S., Neilan, B. A., Mitchell, H., Lee, A., y Falkow, S. (2003). Gene expression profiling of *Helicobacter pylori* reveals a growth-phase-dependent switch in virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 71(5), 2643-2655. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.5.2643-2655.2003>
98. Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., Ketchum, K. A., Klenk, H. P., Gill, S., Dougherty, B. A., Nelson, K., Quackenbush, J., Zhou, L., Kirkness, E. F., Peterson, S., Loftus, B., Richardson, D., Dodson, R., Khalak, H. G., ... Venter, J. C. (1997). The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388(6642), 539-547. <https://doi.org/10.1038/41483>
99. Vannini, A., Pinatel, E., Costantini, P. E., Pellicciari, S., Roncarati, D., Puccio, S., De Bellis, G., Peano, C., y Danielli, A. (2017). Comprehensive mapping of the

- Helicobacter pylori* NikR regulon provides new insights in bacterial nickel responses. *Scientific Reports*, 7(1), 45458. <https://doi.org/10.1038/srep45458>
100. Vasiliou, C., Xiromeritou, V., Kafiri, G., y Papatheodoridis, G. (2014). Endoscopic and histological findings and *Helicobacter pylori* status in patients with reflux and/or dyspeptic symptoms: A recent greek cohort study. *Gastroenterology Nursing*, 37(6), 431-438. <https://doi.org/10.1097/SGA.0000000000000075>
101. Vázquez-Jiménez, F. E., Torres, J., Flores-Luna, L., Giono Cerezo, S., y Camorlinga-Ponce, M. (2016). Patterns of adherence of *Helicobacter pylori* clinical isolates to epithelial cells, and its association with disease and with virulence factors. *Helicobacter*, 21(1), 60-68. <https://doi.org/10.1111/hel.12230>
102. Weber, G. G., y Klose, K. E. (2011). The complexity of ToxT-dependent transcription in *Vibrio cholerae*. *Indian Journal of Medical Research*, 6. <https://doi.org/PMC3089052>
103. Wen, Y., Marcus, E. A., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., Scott, D. R., y Sachs, G. (2003). Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*, 71(10), 5921-5939. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5921-5939.2003>
104. Whelan, J., y Fritsche, K. (2013). Linoleic acid. *Advances in Nutrition*, 4(3), 311-312. <https://doi.org/10.3945/an.113.003772>
105. Yamaoka, Y., Ojo, O., Odenbreit, S., Haas, R., Gutierrez, O., Zimaity, H. E., Reddy, R., Arnqvist, R., y Graham, D. Y. (2006). *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastroduodenal disease. *Gut*, 55(6), 775-781. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.083014>

106. Yamaoka, Y. (2008). Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 14(27), 4265. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.4265>

12. Apéndice I. Figuras suplementarias

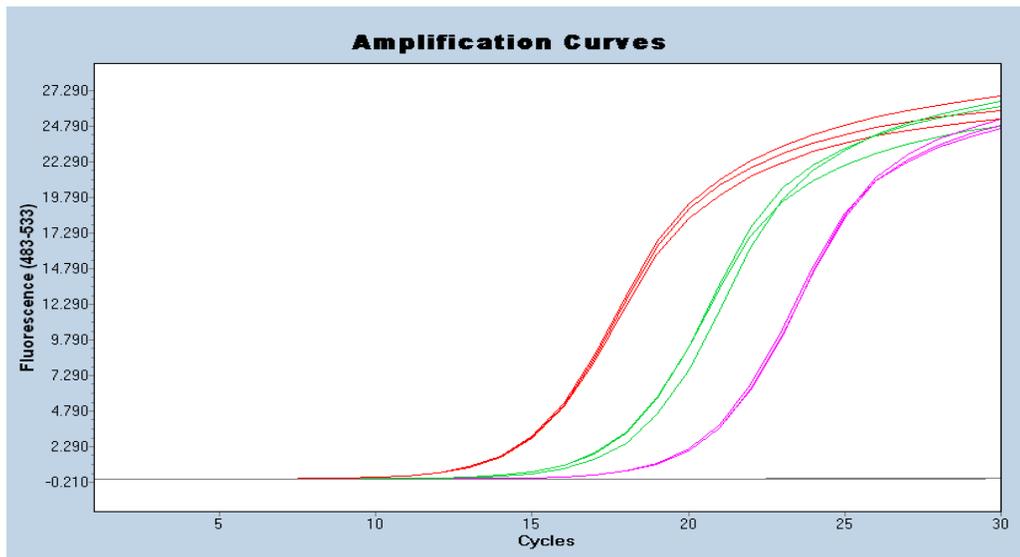


Figura S1: Curva de amplificación del fragmento de 128 pb del gen *cagL* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

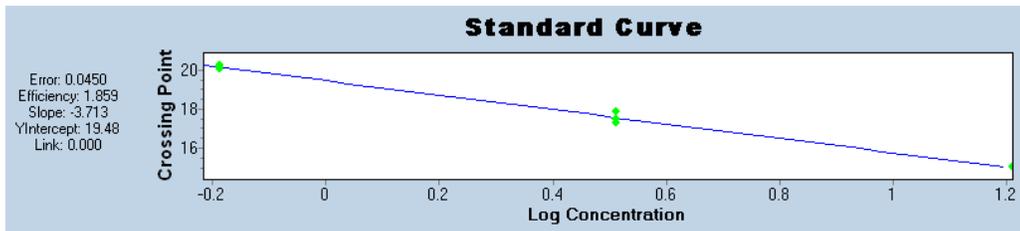


Figura S2: Curva estándar de DNA del gen *cagL* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/ μ L para generar la curva estándar.

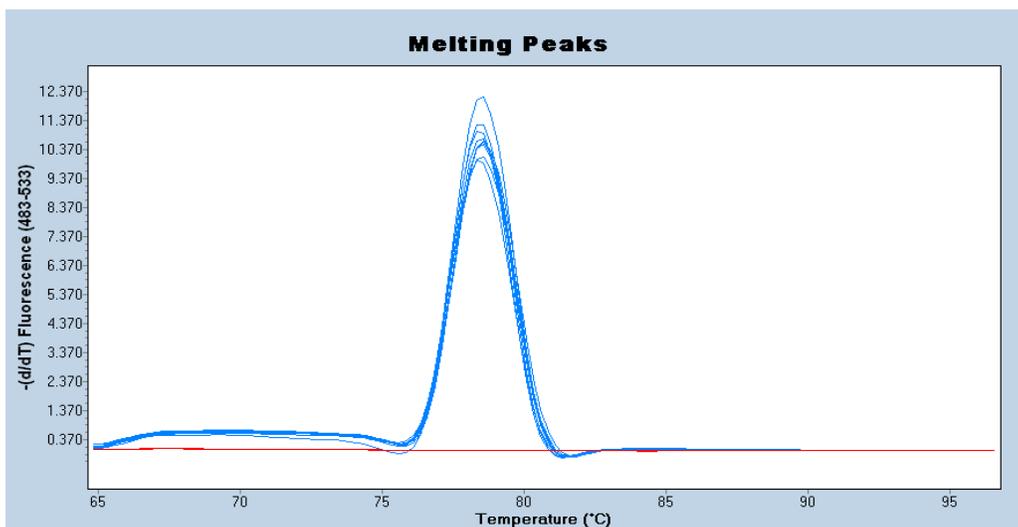


Figura S3: Curva de disociación de DNA del fragmento de 128 pb del gen *cagL* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

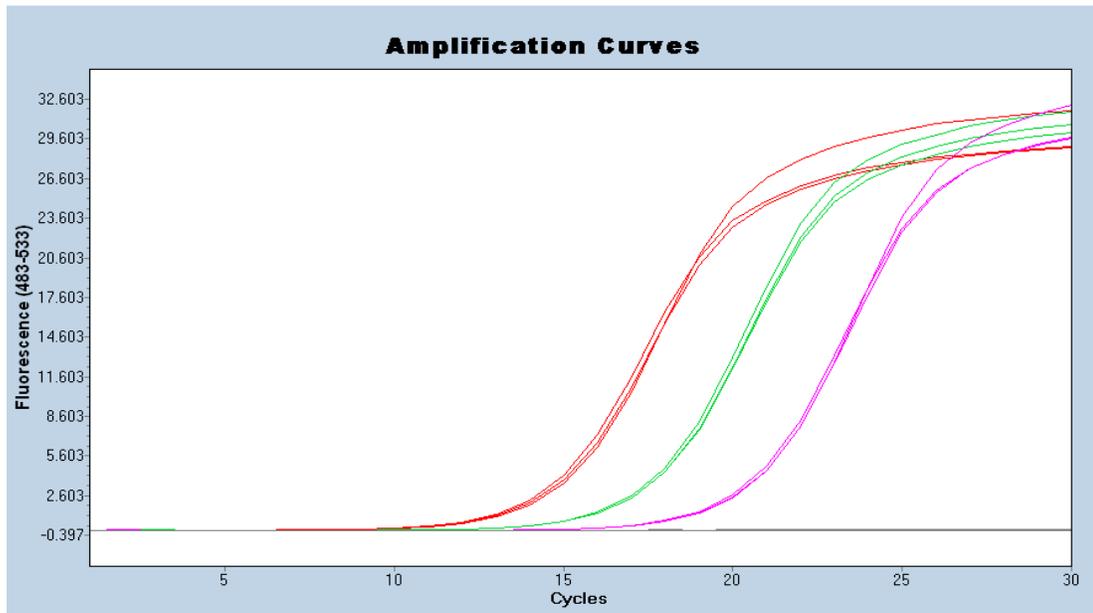


Figura S4: Curva de amplificación del fragmento de 182 pb del gen *vacA* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

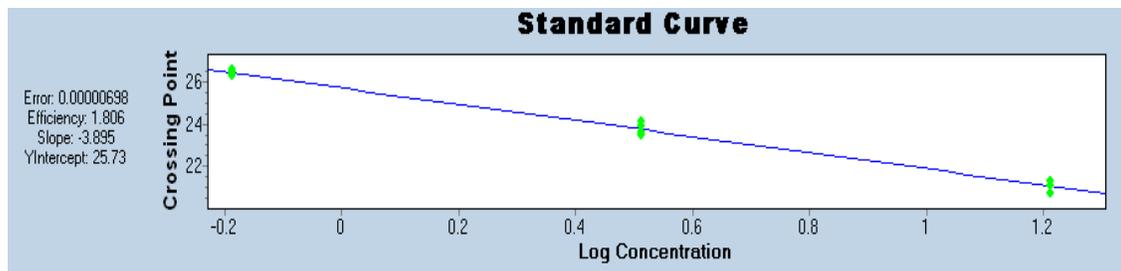


Figura S5: Curva estándar de DNA del gen *vacA* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar.

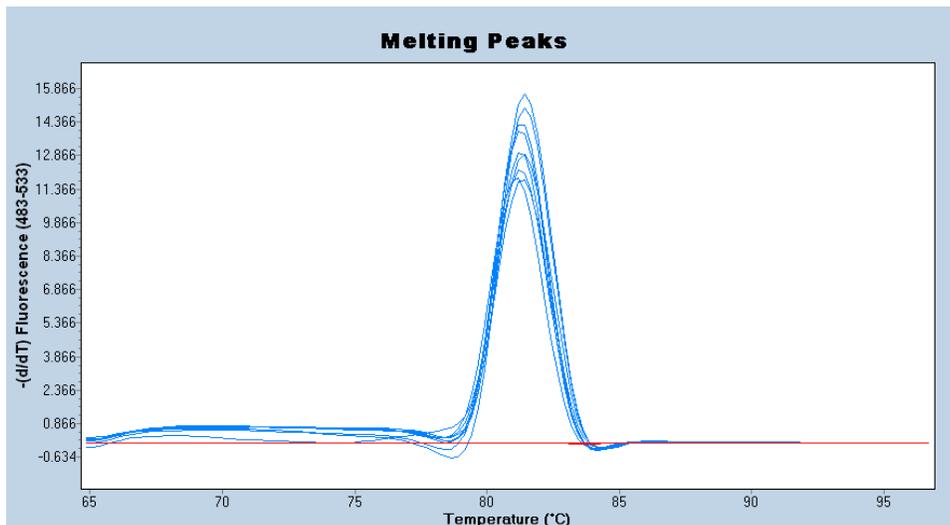


Figura S6: Curva de disociación de DNA del fragmento de 182 pb del gen *vacA* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

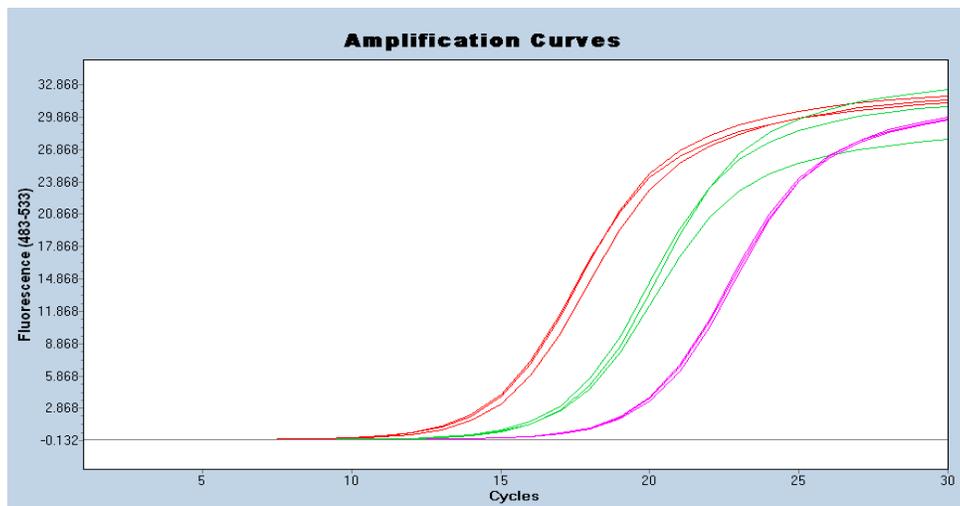


Figura S7: Curva de amplificación del fragmento de 102 pb del gen *ureA* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

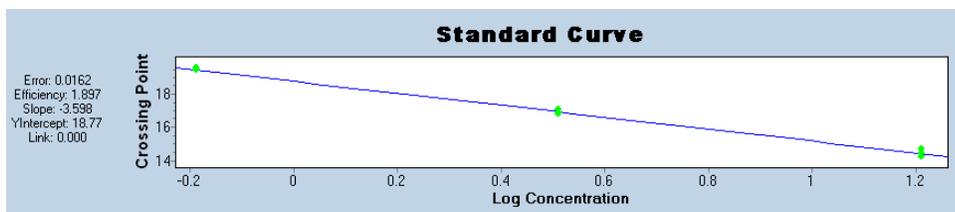


Figura S8: Curva estándar de DNA del gen *ureA* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar.

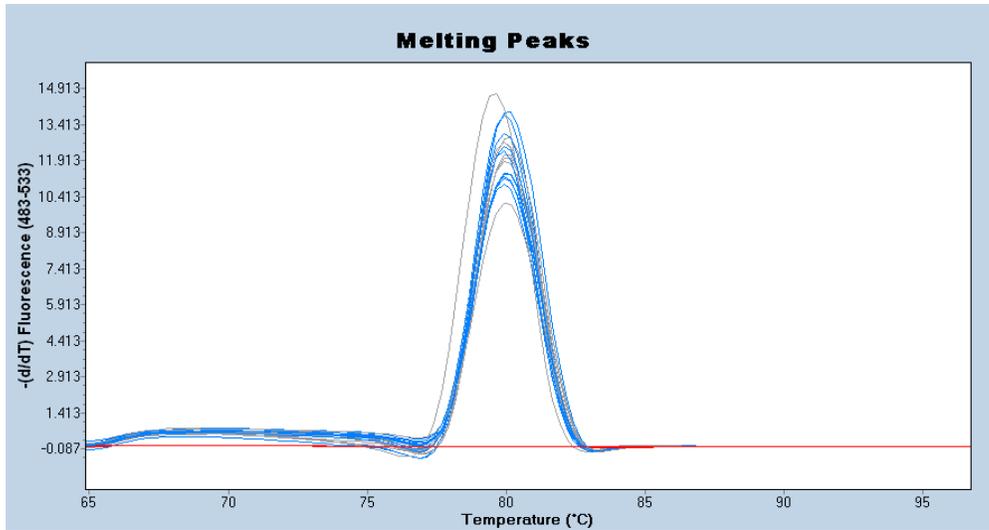


Figura S9: Curva de disociación de DNA del fragmento de 102 pb del gen *ureA* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

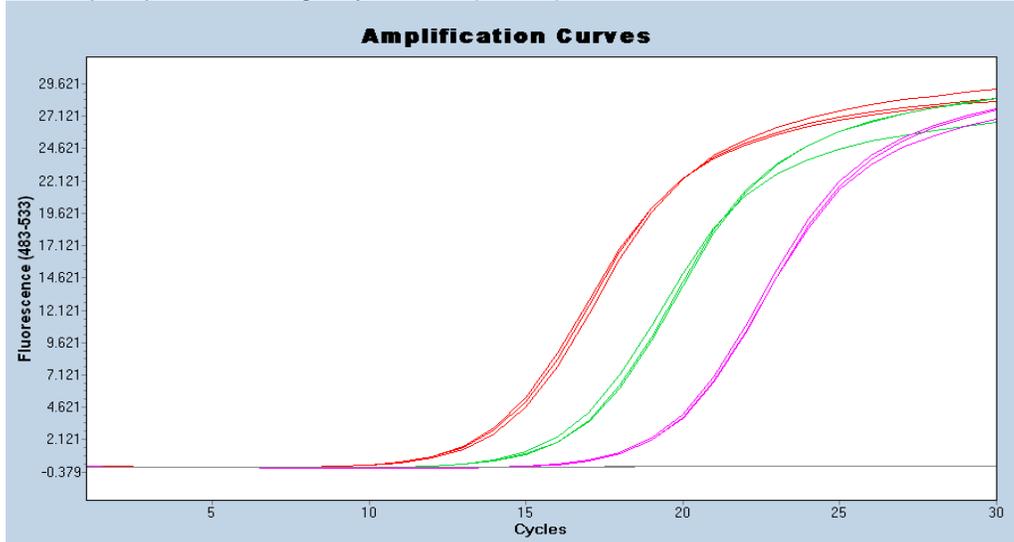


Figura S10: Curva de amplificación del fragmento de 147 pb del gen *ureB* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

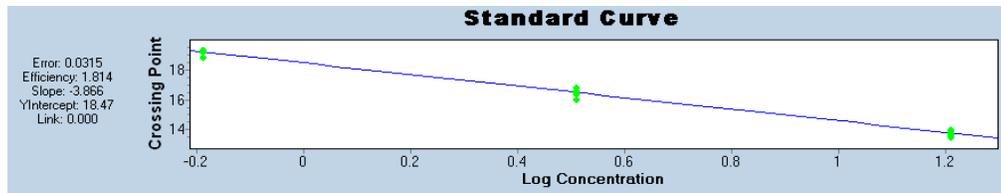


Figura S11: Curva estándar de DNA del gen *ureB* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/ μ L para generar la curva estándar.

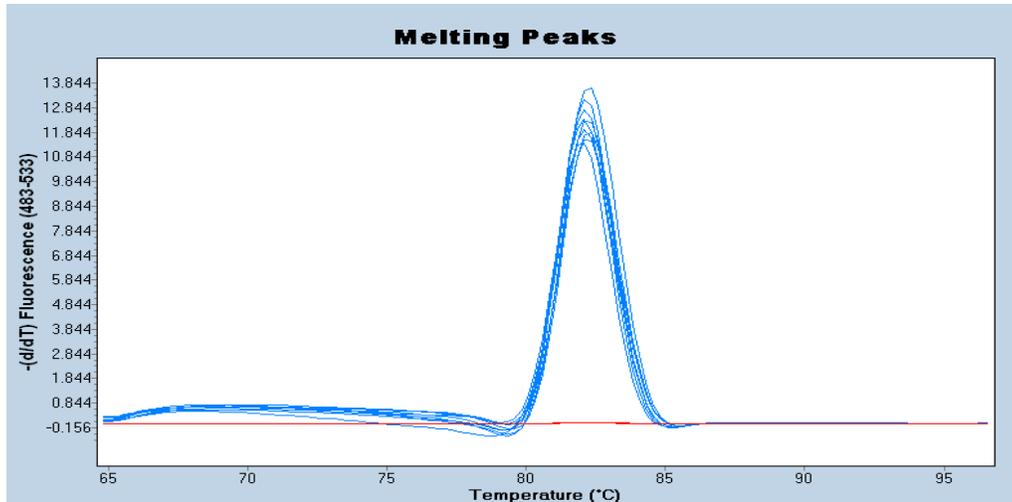


Figura S12: Curva de disociación de DNA del fragmento de 147 pb del gen *ureB* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green

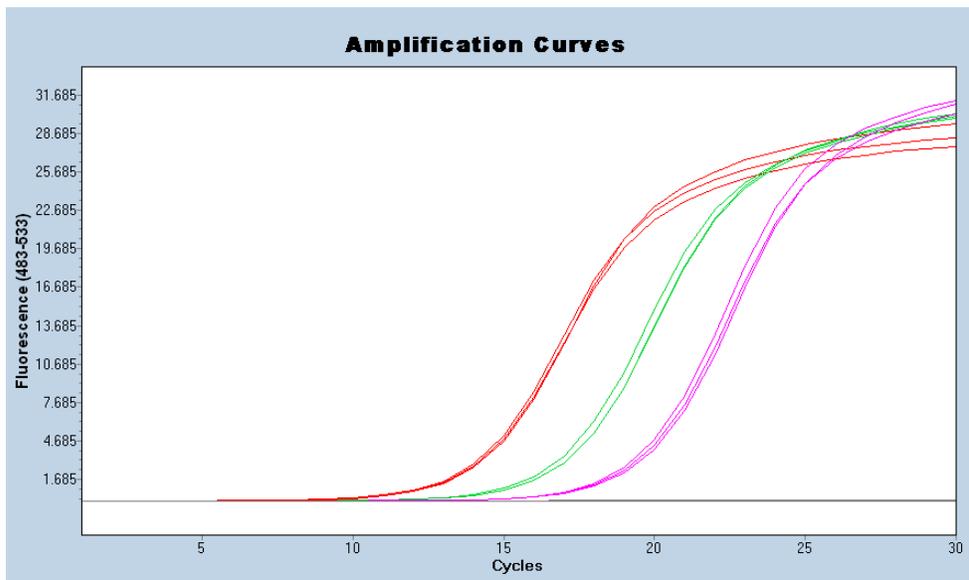


Figura S13: Curva de amplificación del fragmento de 135 pb del gen *flaA* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

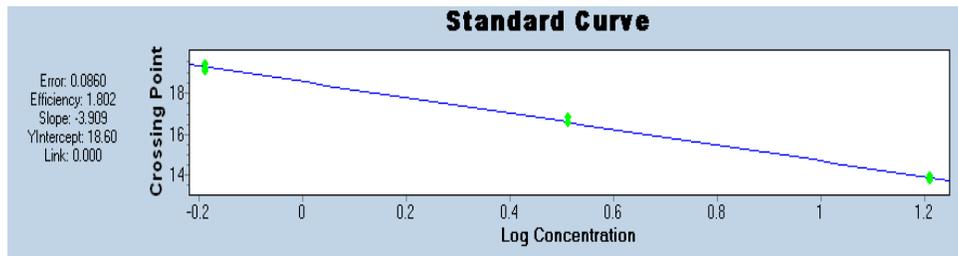


Figura S14: Curva estándar de DNA del gen *flaA* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar.

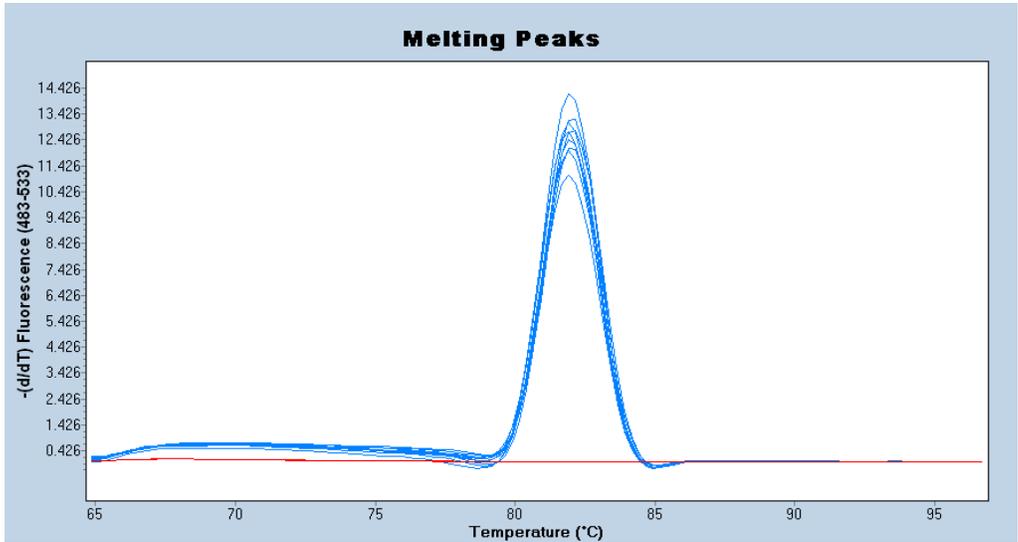


Figura S15: Curva de disociación de DNA del fragmento de 135 pb del gen *flaA* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

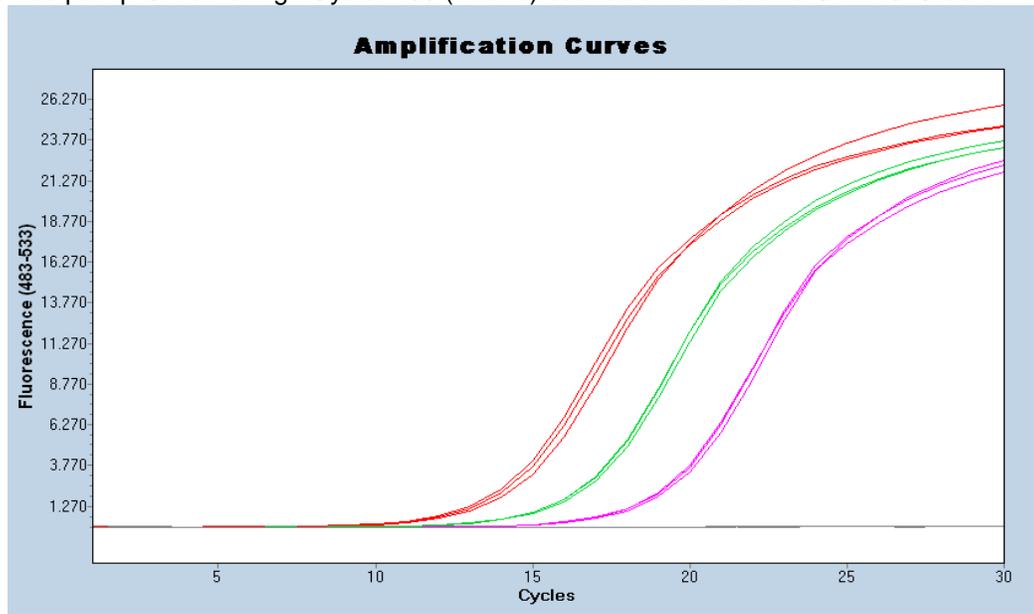


Figura S16: Curva de amplificación del fragmento de 128 pb del gen *flaB* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

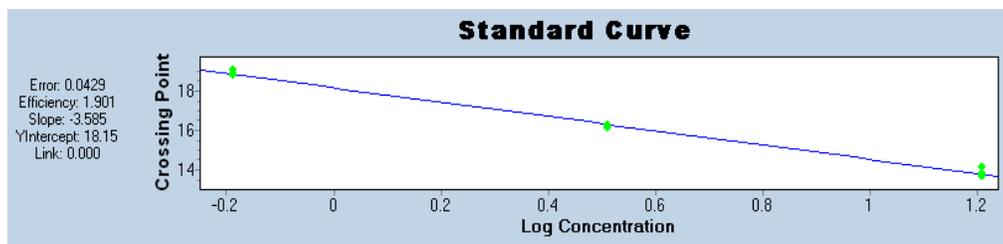


Figura S17: Curva estándar de DNA del gen *flaB* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar.

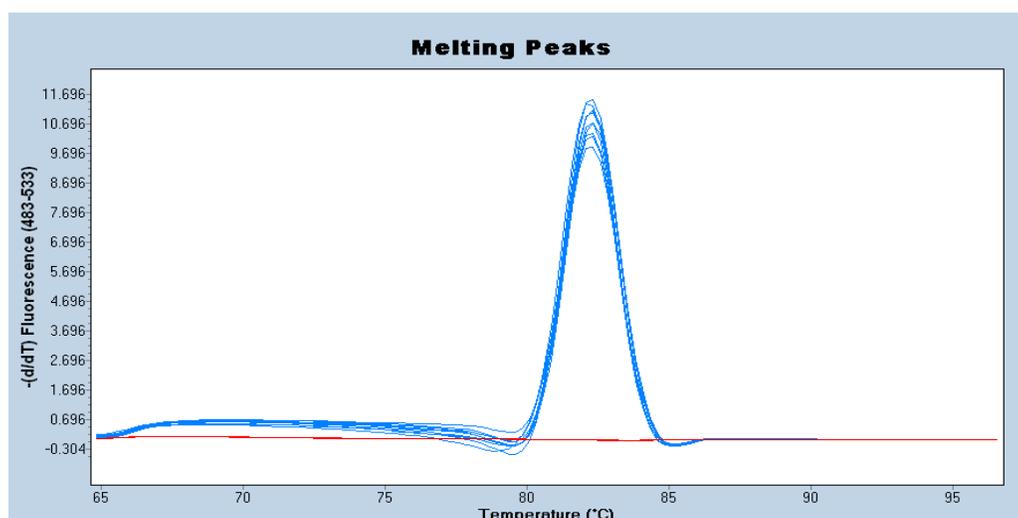


Figura S18: Curva de disociación de DNA del fragmento de 128 pb del gen *flaB* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

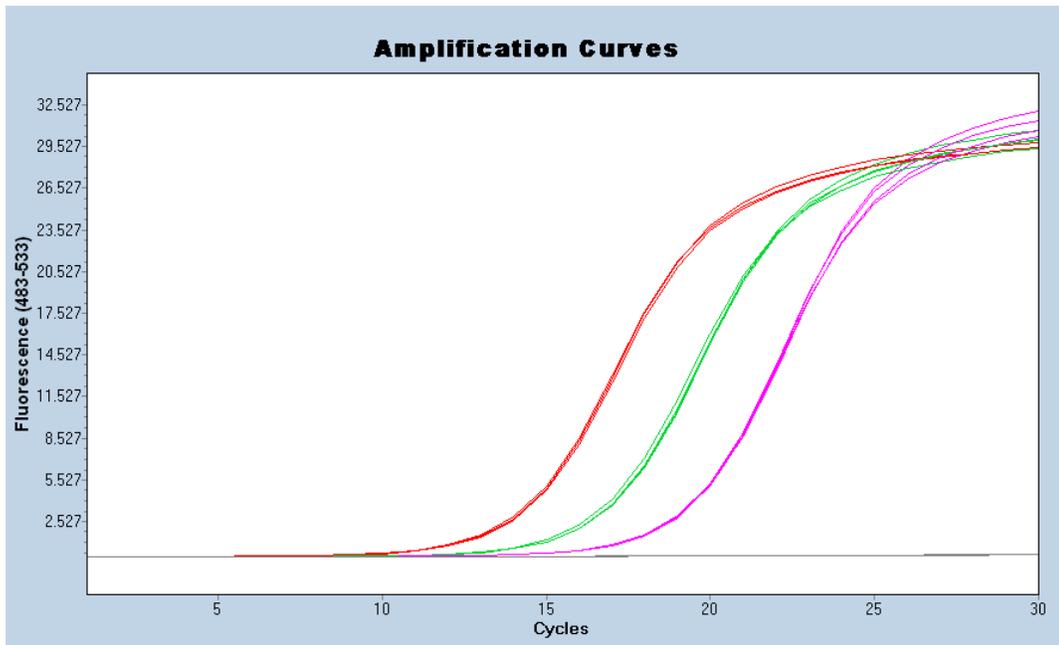


Figura S19: Curva de amplificación del fragmento de 100 pb del del gen *babA* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

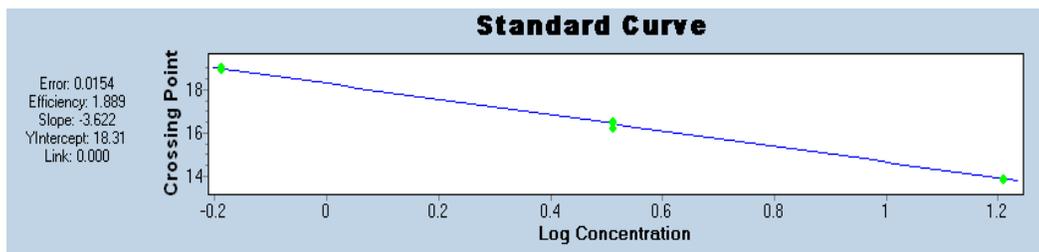


Figura S20: Curva estándar de DNA del gen *babA* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar

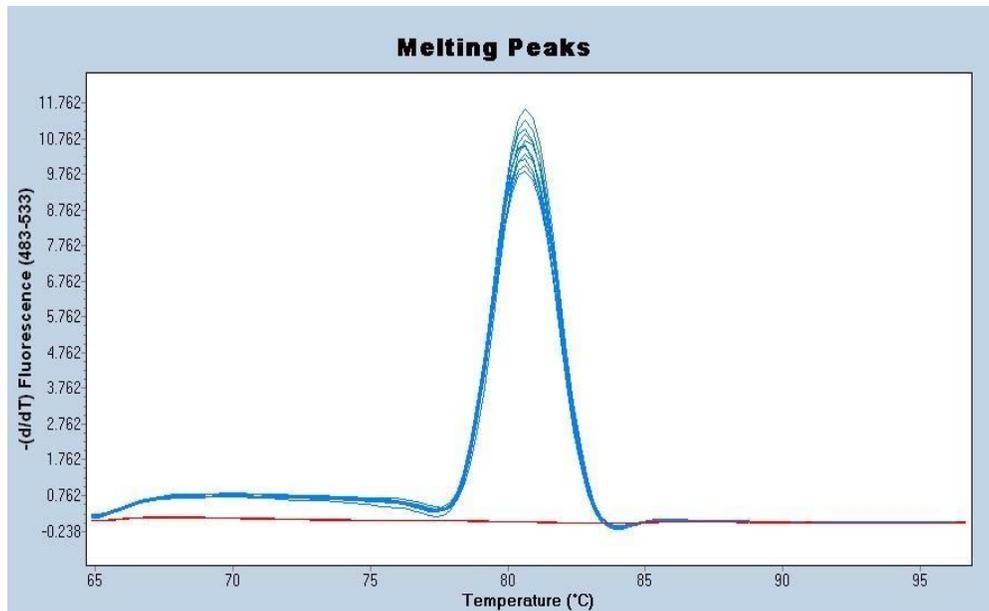


Figura S21: Curva de disociación de DNA del fragmento de 100 pb del gen *babA* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

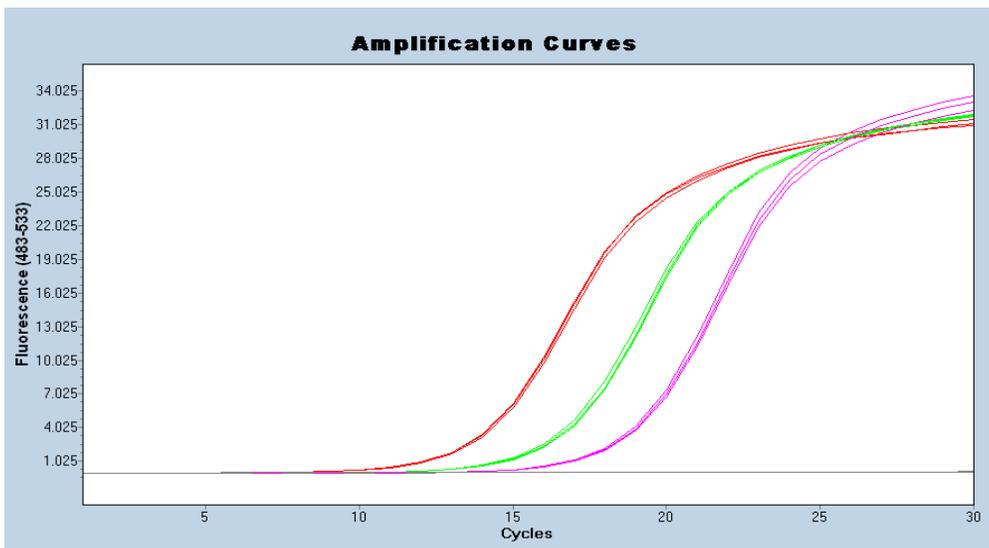


Figura S22: Curva de amplificación del fragmento de 105 pb del gen *sabA* de *H. pylori*, realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

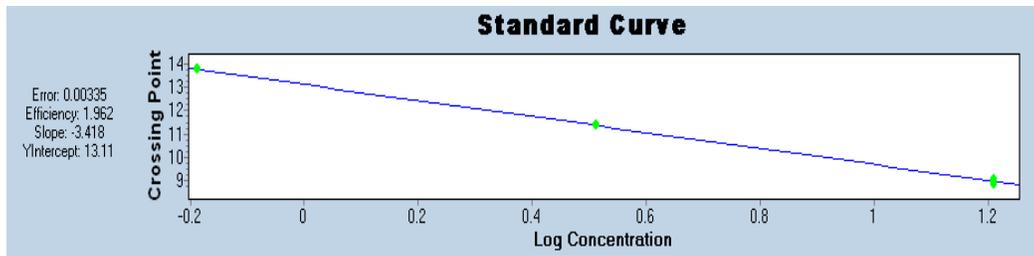


Figura S23: Curva estándar de DNA del gen *sabA* de *H. pylori* realizada por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) y el fluorocromo SYBR® Green. Se usaron concentraciones de 16.25, 3.25, 0.65 ng/μL para generar la curva estándar.

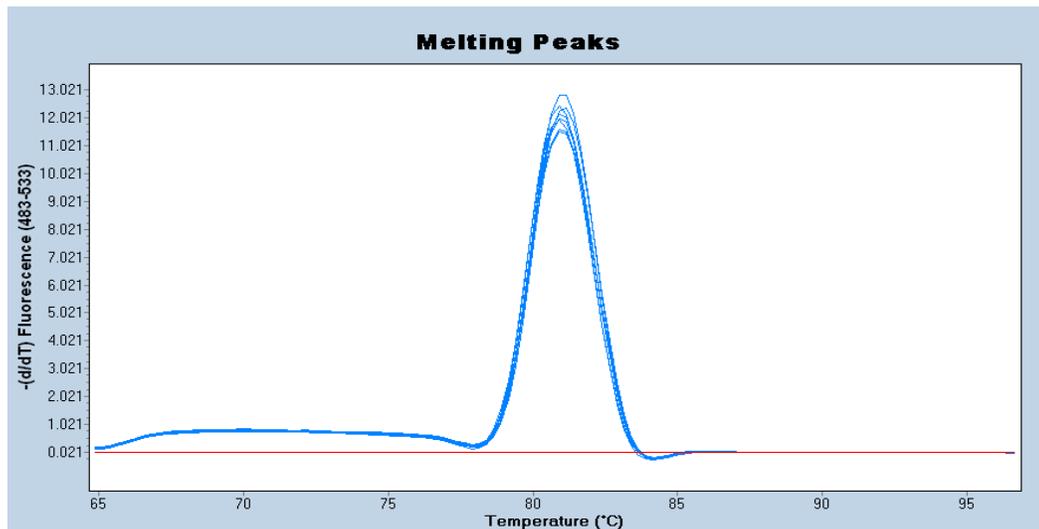


Figura S24: Curva de disociación de DNA del fragmento de 105 pb del gen *sabA* de *H. pylori*, obtenida por qPCR en el LightCycler 480 (Roche) usando el fluorocromo SYBR® Green.

13. Apéndice II. Difusión de los resultados



Long-chain fatty acids alter transcription of *Helicobacter pylori* virulence and regulatory genes

Hilda A. Valdez-Salazar^{1,2}, Miguel A. Ares^{1,3}, Francisco J. Fernández⁴, J Antonio Ibarra³, Javier Torres¹, Víctor H. Bustamante⁵ and Miguel A. De la Cruz¹

¹Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social, Mexico City, Mexico

²Posgrado en Biología Experimental, DCBS., Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Iztapalapa, Mexico City, Mexico

³Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

⁴Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolismo Secundario, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City, Mexico

⁵Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

ABSTRACT

Infection with *Helicobacter pylori* is one of the most important risk factors for developing gastric cancer (GC). The type IV secretion system (T4SS) encoded in the *cag* pathogenicity island is the main virulence factor of *H. pylori* associated with GC. Additionally, other virulence factors have been shown to play a role in the *H. pylori* virulence, such as vacuolizing cytotoxin (VacA), urease, flagella, and adhesins. Long-chain fatty acids (LCFAs) are signaling molecules that affect the transcription of virulence genes in several pathogenic bacteria such as *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium tuberculosis*. However, the effect of LCFAs on the transcription of *H. pylori* virulence and regulatory genes remains unknown. Here we analyzed whether the transcription of virulence genes that encode T4SS and cellular envelope components, flagellins, adhesins, toxins, urease, as well as the transcription of different regulatory genes of the *H. pylori* strain 26695, are altered by the presence of five distinct LCFAs: palmitic, stearic, oleic, linoleic, and linolenic acids. Palmitic and oleic acids up-regulated the transcription of most of the virulence genes tested, including *cagL*, *cagM*, *flaB*, *sabA*, *mraY* and *vacA*, as well as that of the genes encoding the transcriptional regulators NikR, Fur, CheY, ArsR, FlgR, HspR, HsrA, Hup, and CrdR. In contrast, the other LCFAs differentially affected the transcription of the virulence and regulatory genes assessed. Our data show that LCFAs can act as signaling molecules that control the transcription of the *H. pylori* virulome.

Submitted 26 June 2020
Accepted 17 September 2021
Published 1 November 2021

Corresponding author
Miguel A. De la Cruz,
miguel_angel_81@live.com

Academic editor
Jesús Campos-García

Additional Information and
Declarations can be found on
page 15

DOI 10.7717/peerj.12270

© Copyright
2021 Valdez-Salazar et al.

Subjects Biochemistry, Microbiology, Molecular Biology

Keywords LCFA, *Helicobacter pylori*, Virulence factors, Transcription



Efecto de los ácidos grasos de cadena larga sobre la expresión transcripcional de los factores virulencia de *Helicobacter pylori*.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 12 del mes de septiembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. OCTAVIO LOERA CORRAL
- DRA. MARGARITA CAMORLINGA PONCE
- DR. MIGUEL ANGEL ARES JIMENEZ
- DR. JOSE ANTONIO IBARRA GARCIA



HILDA ALICIA VALDEZ SALAZAR
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL
DE: HILDA ALICIA VALDEZ SALAZAR

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

VOCAL

DRA. MARGARITA CAMORLINGA PONCE

VOCAL

DR. MIGUEL ANGEL ARES JIMENEZ

SECRETARIO

DR. JOSE ANTONIO IBARRA GARCIA