

# La quimiotaxis y la adaptación al medio ácido asisten a *Helicobacter pylori* en la colonización del estómago.

Manuel Valenzuela V <sup>(1)</sup>, Oscar Cerda A <sup>(1)</sup>, Héctor Toledo A, PhD. <sup>(2)</sup>

## Resumen

*El pH ácido de la mucosa gástrica es probablemente una característica que hace a este nicho inaccesible a otras bacterias que no sea Helicobacter pylori. La bacteria debe estar bien adaptada a crecer en estas condiciones de acidez y emplear mecanismos especializados de protección al ácido. La capacidad de sobrevivir bajo estas condiciones de pH bajo y las propiedades quimiotácticas de H. pylori le permiten colonizar el estómago. Algunos aspectos acerca de los mecanismos de sobrevivencia en medio ácido y las propiedades quimiotácticas de H. pylori se discuten.*

## Summary

*The acid pH in the gastric mucosa is probably one characteristic that makes this niche inaccessible to bacteria other than Helicobacter pylori. The bacterium must be well adapted to grow under acidic conditions and must employ specialized acid protective mechanisms. The ability to survive under these low pH conditions and the chemotactic properties enables H. pylori to colonize the stomach. Some aspect about acid survival mechanism in H. pylori and its chemotactic properties are discussed.*

<sup>(1)</sup> Estudiante tesista de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

<sup>(2)</sup> Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina; Universidad de Chile.

\*Autor correspondiente: Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina; Universidad de Chile. Casilla 70086, Santiago-7, Chile.  
Teléfono: (562) 678 6053; Fax: (562) 735 5580; E-mail: htoledo@machi.med.uchile.cl.

## Introducción

En bacterias la expresión genética puede ser modificada en respuesta a las condiciones ambientales a las que se enfrenta el microorganismo. Los cambios en la expresión de los genes como respuesta a las variaciones del medio ambiente se pueden estudiar bajo condiciones definidas como hambruna de nutrientes y/o hierro y modificando la tensión de oxígeno, la osmolaridad del medio, el pH o la temperatura. Todas estas condiciones pseudo-fisiológicas también están asociadas a la expresión de factores de virulencia en los microorganismos patógenos <sup>[1]</sup>.

En la colonización, la invasión de los tejidos y la proliferación en el sitio colonizado, las bacterias se enfrentan a cambios radicales dentro del huésped, entre los cuales deben enfrentar y evadir al sistema inmune. Estas situaciones a las que se enfrenta una bacteria, al invadir un organismo, deben ser superadas con estrategias que le permitan sobrevivir en el huésped invadido y finalmente colonizarlo. La respuesta principal de los microorganismos es la expresión específica de genes que les permiten

adaptarse a las nuevas condiciones. Algunas de las señales generadas en el medio, aportadas por el huésped, para inducir una respuesta a nivel de la expresión genética pueden ser la escasa disponibilidad de hierro u otros iones, la temperatura alta, los cambios de osmolaridad y de pH, la disminución de la tensión de oxígeno y/o CO<sub>2</sub> <sup>[1]</sup>. Dependiendo de la severidad y duración del estrés, se observa que tanto el crecimiento como la sobrevivencia de los microorganismos es inhibido o que las células pierden viabilidad.

Para colonizar el huésped mamífero, a través de la vía oral, las bacterias comensales como las patógenas entéricas deben sobrevivir al pH bajo del estómago (figura 1). Además, deben superar el estrés ácido al alcanzar el intestino. Aunque el pH del intestino delgado es próximo a la neutralidad, las bacterias deben superar el estrés ácido impuesto por la alta concentración de ácidos grasos de cadena corta presentes en este órgano, producto de la fermentación por la microflora intestinal que resulta agresiva para la bacteria. La concentración de ácidos orgánicos en el lumen

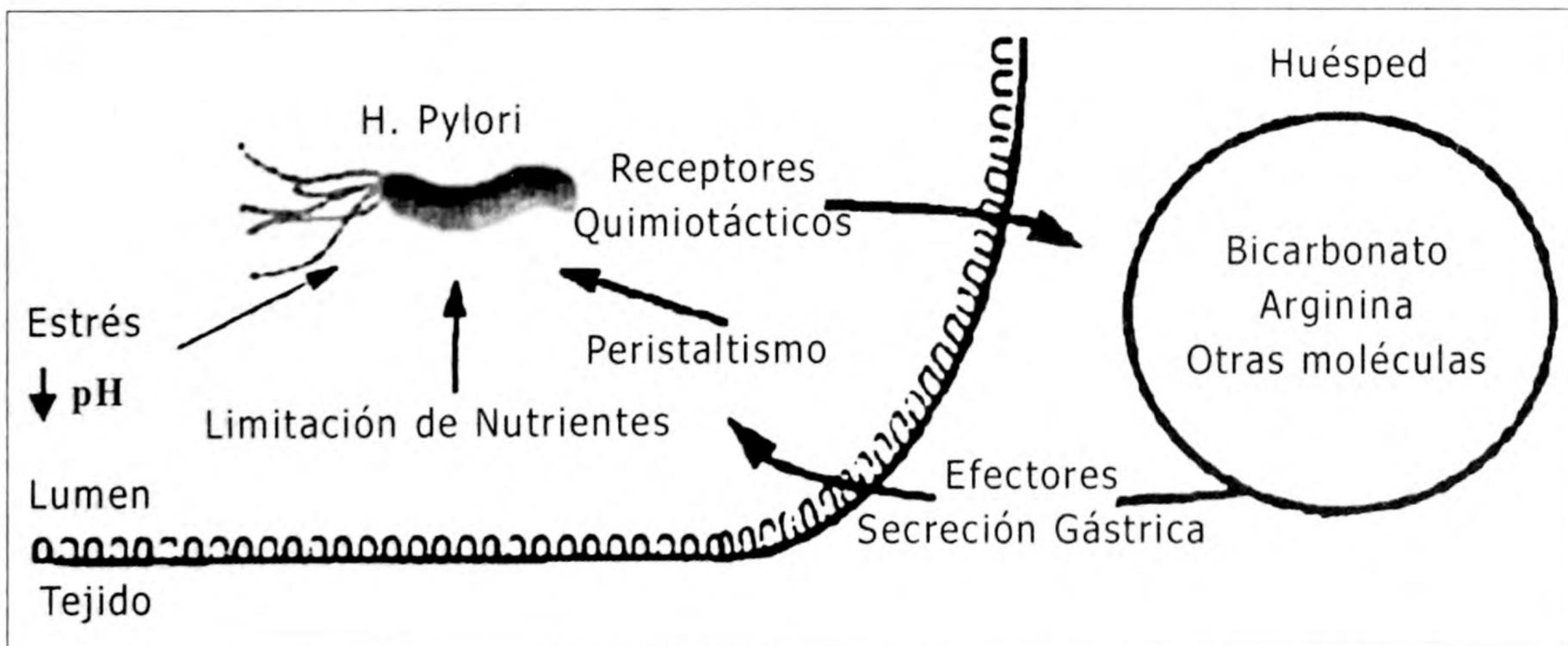


Figura 1: Efectos que asisten a la colonización del estómago por *H. pylori*. Los efectos medioambientales que afectan la población de *H. pylori* incluyen el pH gástrico, la limitación de nutrientes, la secreción gástrica y el peristaltismo.

del intestino humano se estima en 12 mmol/kg en el íleon y entre 70 a 120 mmol/kg en el intestino grueso <sup>[2]</sup> y debido a que las formas protonadas de los ácidos grasos pueden fácilmente equilibrarse a través de la membrana citoplasmática, estos ácidos alteran el pH citoplasmático de la bacteria, aún cuando el pH externo sea neutro.

La capacidad de adaptación desarrollada por las bacterias patógenas para tolerar ambientes injuriantes, tanto dentro del huésped como fuera de éste, juega un papel importante en determinar el éxito de ellas como patógenos. Cuando la ruta de infección es la vía oral, el pH ácido de las secreciones gástricas actúa como una barrera que impide la invasión del huésped por la bacteria <sup>[3,4]</sup>. Sin embargo, el pH ácido también afecta la virulencia de algunas bacterias patógenas. Recientemente, se demostró que *Vibrio cholerae* adaptado a pH ácido es más virulento, en un modelo murino, que la bacteria crecida a pH neutro <sup>[5]</sup>. De modo que la capacidad de sobrevivir a las condiciones ácidas del estómago puede contribuir a la virulencia, incrementando la probabilidad de colonizar el tracto gastrointestinal.

Los mecanismos de respuesta desarrollados por las bacterias como respuesta a los cambios de temperatura, sales, agentes que dañan el DNA y el estrés oxidativo son ampliamente conocidos y se han estudiado en detalle <sup>[6-9]</sup>. Sin embargo, se conoce mucho menos respecto de los mecanismos de adaptación desarrollados por las bacterias como respuesta a los pH extremos.

Se distinguen al menos dos mecanismos de respuesta, que desarrolla la mayoría de las bacterias, frente a condiciones de pH ácido. El primero, representa una adaptación de los microorganismos a un medio moderadamente ácido, pH 6 a 5,5, que induce la síntesis de

un grupo de proteínas (18 proteínas en *Salmonella typhimurium*), que mantienen la homeostasis de pH intracelular, protegiendo a la bacteria frente a condiciones más extremas de acidez, pH 3 <sup>[10]</sup>. Este mecanismo se conoce como respuesta de tolerancia al ácido. El segundo mecanismo corresponde a la respuesta al estrés ácido, que se desarrolla cuando la bacteria se enfrenta a condiciones de acidez más severa, pH 4,3 o inferior <sup>[11]</sup>, y que induce la síntesis de un número mayor de proteínas (aproximadamente 52 proteínas en *S. Typhimurium*).

Desde que se descubrió que *E. coli* y *S. typhimurium* se pueden adaptar a condiciones de acidez extrema, el fenómeno de tolerancia inducible al ácido se ha descrito como un mecanismo general en una gran cantidad de microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos.

#### **Adaptación de *Helicobacter pylori* al medio ácido.**

*Helicobacter pylori* es un bacilo espiral, Gram-negativo, flagelado, microaerófilo, neutrófilo, cuyo pH óptimo de crecimiento es 7. Sin embargo, la bacteria es capaz de crecer a pHs inferiores a 5,5 sólo en presencia de urea, la cual le permite mantener la homeostasis de pH intracelular y modificar el pH extracelular <sup>[12-14]</sup>. Esta bacteria desarrolla un rol importante en la etiología de la gastritis crónica en humanos y su presencia incrementa el riesgo de desarrollar úlcera péptica y adenocarcinoma en el estómago <sup>[15]</sup>. Es un organismo capaz de colonizar el estómago humano y puede permanecer décadas en la mucosa gástrica sin sintomatología aparente. Para lograr la colonización de este órgano, *H. pylori* debe haber desarrollado varios mecanismos que le permiten sobrevivir en este medio ácido y una vez lograda la colonización, debe combatir las

variaciones de pH que se producen en la capa de mucosa, donde el gradiente de pH va desde 2 en el lumen a aproximadamente 7 en la superficie del epitelio <sup>(16)</sup>. La forma helicoidal característica de *H. pylori* y los flagelos facilitan su movilidad en la capa mucosa, a pesar de su viscosidad, permitiéndole escapar del pH extremadamente bajo del lumen gástrico. Su capacidad quimiotáctica a urea y bicarbonato <sup>(17)</sup> como también a algunos aminoácidos <sup>(18)</sup> permiten a la bacteria alejarse de la superficie mucosa y dirigirse a los centros de mayor concentración de estos agentes químicos requeridos para amortiguar los cambios de pH (figura 1). Aunque, el mucus es una barrera parcial al contenido ácido del lumen del estómago, *H. pylori* está sujeto a exposiciones periódicas de acidez, sobre todo en los períodos de ayuno y en la etapa inicial de la colonización gástrica.

El principal mecanismo de adaptación desarrollado por *H. pylori* para tolerar el ambiente ácido es la expresión de una actividad ureasa muy eficiente, que hidroliza la urea presente en las secreciones gástricas produciéndose  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$  <sup>(19-21)</sup>, lo que le permite neutralizar el medio inmediatamente circundante. Esta enzima se expresa constitutivamente, es esencial para la colonización, la patogénesis y se encuentra en el citosol y también adherida a la membrana externa de la bacteria <sup>(22, 23)</sup>. El  $\text{NH}_3$ , generado por la ureasa citosólica, tiene como función no sólo la de aportar el nitrógeno necesario para la síntesis de aminoácidos, sino que también es utilizado para amortiguar el exceso de protones que entran a la célula y con ello lograr la homeostasis de pH que le permite a la bacteria tolerar el ambiente ácido del estómago <sup>(19-21)</sup>.

Nuestros estudios sobre mecanismos de adaptación al pH ácido, en contraposición a la idea planteada por algunos autores de que *H.*

*pylori* es un microorganismo que estaría permanentemente adaptado al ácido, muestran que este microorganismo desarrolla una respuesta de tolerancia al ácido ya que se obtiene una sobrevivencia mayor de 1.000 veces en células adaptadas previamente a un pH levemente ácido (incubadas a pH 6) luego de ser sometidas a un estrés ácido (pH 3), que aquellas no adaptadas (incubadas a pH 7) y luego transferidas a pH 3 <sup>(12)</sup>. El análisis de las proteínas expresadas por *H. pylori*, mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, de las bacterias adaptadas a pH 6 muestra que aproximadamente 20 proteínas aumentan su expresión mientras que alrededor de 10 la disminuyen (Valenzuela y Toledo, datos no publicados). Este resultado está indicando que la modificación de la expresión de estos genes protege a la bacteria de condiciones más extremas de acidez y le permiten posiblemente regular la homeostasis de pH intracelular en forma similar a la observada en otros microorganismos <sup>(10)</sup>.

#### Respuesta quimiotáctica en *Helicobacter pylori*.

Un segundo mecanismo de adaptación al pH ácido es la hidrólisis del amino ácido arginina por la enzima arginasa para la generación de urea. Esta enzima participa en el ciclo de la urea y también se encuentra involucrada en el metabolismo del nitrógeno en *H. pylori* <sup>(24)</sup>. Recientemente, la actividad arginasa ha sido caracterizada en *H. pylori* e identificada en el ORF *hp1399*, el cual es ortólogo al gen *rocF* de *B. subtilis* que codifica para la arginasa <sup>(25)</sup>. Estudios realizados en *H. pylori* mostraron que la mutante *rocF*- (arginasa-) era aproximadamente 1.000 veces más sensible a la exposición al ácido que la cepa silvestre y que esta sensibilidad de la mutante al ácido no es revertida por el aminoácido arginina <sup>(25)</sup>, sugiri-

riendo que *rocF* en *H. pylori* es importante para la protección al ácido.

Esta observación nos llevó a estudiar la quimiotaxis a algunos aminoácidos, especialmente a arginina. Nuestros resultados fueron contradictorios en cuanto a que las cepas analizadas no presentaron quimiotaxis a urea, como fue inicialmente descrito por Mizote<sup>(17)</sup>. Sin embargo, mediante estudios de crecimiento en placas de agar blando, que permiten definir la capacidad de las bacterias de nadar, pudimos determinar que la falta de respuesta quimiotáctica a urea no se debía a la incapacidad de nadar dado que nuestras cepas difundieron mostrando que eran móviles. Por otra parte, observamos que las cepas estudiadas presentaron respuesta quimiotáctica a los aminoácidos aspártico, serina y arginina<sup>(18)</sup>. El metabolismo de los aminoácidos es esencial para el crecimiento de *H. pylori*<sup>(26)</sup>, este microorganismo no posee la maquinaria metabólica que le permite sintetizar L-arginina por lo que la quimiotaxis a este aminoácido es esencial no sólo para la síntesis de sus proteínas sino que también es necesaria para la adaptación a los cambios de pH, tal como se discute más arriba. Así, la búsqueda de aminoácidos, como la arginina, y de otras sustancias químicas, como urea y bicarbonato, son un importante factor para la colonización y persistencia de la bacteria en la capa mucosa gástrica (figura 1). De esta forma la quimiotaxis juega un rol importante en estos procesos.

## Referencias

1. Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992; 174: 1-7.
2. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CPE, and MacFarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *GUT* 1987; 28: 1221-7.
3. Drasar BS, Shiner M, and McLeod GM. Studies on the intestinal flora. The bacterial flora of the gastrointestinal tract in healthy and achlorhydric persons. *Gastroenterology* 1969; 56: 71-9.
4. Giannella RA, Broitman SA, and Zamcheck N. Influence of gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infections. *Ann Intern Med* 1973; 278: 271-6.
5. Merrell DS, Bailey C, Kaper JB, and Camilli A. The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholera* requires OmpU. *J Bacteriol* 2001; 183: 2746-54.
6. Little JW. LexA cleavage and other self-processing reactions. *J Bacteriol* 1993; 175: 4943-50.
7. Yura T, Nagai T, and Mori H. Regulation of the Heat-Shock Response in Bacteria. *Ann Rev Microbiol* 1993; 47: 321-50.
8. Farr SB, and Kogoma T. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 1991; 55: 561-85.
9. Bukau B. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol Microbiol* 1993; 9: 671-80.
10. Foster JW, and Hall HK. Inducible pH Homeostasis and the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 1991; 173: 5129-35.
11. Foster JW. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J Bacteriol* 1993; 175: 1981-7.
12. Toledo H, Valenzuela M, Rivas A, and Jerez CA. Acid stress response in *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Letters* 2002; 213: 67-72.
13. Marshall BJ, Barrett LJ, Prakash C, McCallum RW, and Guerrant RL. Urea protects *Helicobacter (Campylobacter) pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology* 1990; 99: 697-702.
14. Clyne M, Labigne A, and Drumm B. *Helicobacter pylori* requires an acidic environment to survive in the presence of urea. *Infect Immun* 1995; 63: 1669-73.
15. Cover TL, and Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implication for eradication and prevention. *Adv Intern Med* 1996; 41: 85-117.
16. Quigley EMM, and Turnberg LA. pH of the microclimate lining human gastric and duodenal mucosa in vivo. *Gastroenterology* 1987; 92: 1876-83.
17. Mizote T, Yoshiyama H, and Nakazawa T. Urease-

independent chemotaxis responses of *Helicobacter pylori* to urea, urease inhibitors, and sodium bicarbonate. *Infect Immun* 1997; 65: 1519-21.

18. Toledo H, Cerda O, and Rivas A. *Helicobacter pylori* ORF HP0099 encodes for the methyl-accepting chemotactic receptor protein responding to urea, sodium bicarbonate and arginine. Manuscrito enviado a publicación.

19. Dunn BE, Campbell GP, Perez-Perez GI, and Blaser MJ. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1990; 265: 9464-9.

20. Meyer-Rosberg K, Scott DR, Rex D, Melchers K, and Sachs G. The effect of environmental pH on the proton motive force of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1996; 111: 886-900.

21. Rektorschek M, Weeks D, Sachs G, and Melchers K. Influence of pH on Metabolism and Urease Activity of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 1998; 115: 628-41.

22. Dunn BE, Cohen H, and Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiol Rev* 1997; 10: 720-41.

23. Tsuda M, Karita M, Mizote T, Morshed MG, Okita K, and Nakazawa T. Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1994; Dec 6 (Suppl 1): S49-52.

24. Mendz GL, and Hazell SL. The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 1996; 142: 2959-67.

25. McGee DJ, Radcliff FJ, Mendz GL, Ferrero RL, and Mobley HL. *Helicobacter pylori* rocF is required for arginase activity and acid protection in vitro but is not essential for colonization of mice or for urease activity. *J Bacteriol* 1999; 181: 7314-22.

26. Marais A, Mendz GL, Hazell SL, and Mégraud F. Metabolism and Genetics of *Helicobacter pylori*: the Genome Era. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63: 642-74.

Nota: Trabajo financiado por Proyecto FONDECYT 1980721 y Proyecto DID ENL - 2001 - 2003