

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Identificación y caracterización parcial del gen *hsbp47* de *Helicobacter pylori*
ATCC 43504



Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Niyirma Vásquez Mirazo

Hermosillo, Sonora

Noviembre de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



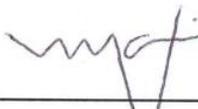
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

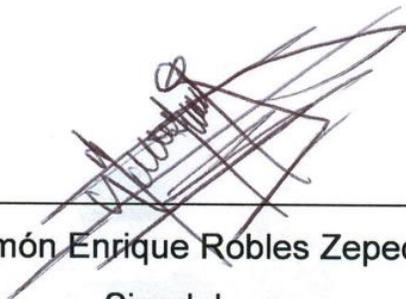
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar la Tesis de Niyirma Vásquez Mirazo, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Director



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna
Secretario



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Sinodal



Dra. Olivia Valenzuela Antelo
Sinodal

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo otorgado mediante beca para estudios de maestría (218776).

A la **Universidad de Sonora** por ofrecer este Programa de Maestría en Ciencias de la Salud, así como también al Departamento de Ciencias Químico Biológicas.

A mis **sinodales**, Dra. María Auxiliadora Islas Osuna, Dra. Olivia Valenzuela Antelo, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda por su valiosa asesoría para la realización de este trabajo.

A mi **Director de tesis**, Dr. Eduardo Ruiz Bustos, por su invaluable apoyo, paciencia, y dirección.

Al **Laboratorio Estatal de Salud Pública** y su entonces Director M.C. Román Escobar López que me permitieron estudiar.

A **mis compañeros** de trabajo que comparten a diario conmigo momentos de esparcimiento, pero también de arduo trabajo, gracias a todos ustedes por brindarme su amistad.

A **Daniel**, gracias por tu insistencia, tu amor y compañía.

Cuando decidí desistir me mostraste tu voluntad, **GRACIAS PADRE**.

Finalmente dedico el presente con amor a Dios, a mis hijos Ulises y Niyirma y a mis padres.

CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE TABLAS | v |
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| OBJETIVOS | vii |
| Objetivo General | vii |
| Objetivos Particulares | vii |
| RESUMEN | viii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES | 3 |
| Generalidades de <i>Helicobacter pylori</i> | 3 |
| Enfermedades Asociadas | 3 |
| Gastritis Aguda y Crónica | 3 |
| Enfermedad Úlcero-Péptica | 3 |
| Cáncer Gástrico | 4 |
| Factores de Virulencia | 6 |
| Métodos de Detección | 6 |
| Tratamiento | 9 |
| Resistencia a Antibióticos | 9 |
| Nuevas Estrategias: Perspectiva de Vacunas | 11 |
| HSBPs de <i>Helicobacter pylori</i> como Candidato de Vacuna | 11 |
| La Clonación como Herramienta para Obtención de Proteína | 13 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504 | 15 |

| | |
|---|----|
| Extracción de Proteínas de Superficie | 15 |
| Purificación y Caracterización Parcial de la HSBP47.2 de Superficie | 15 |
| Cromatografía de Afinidad | 15 |
| Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) | 16 |
| Ensayo DOT BLOT | 16 |
| Transferencia Electroforética | 17 |
| Western Blot de HSBP | 17 |
| Determinación del Punto Isoeléctrico | 17 |
| Secuenciación de Aminoácidos | 18 |
| Identificación del Gen <i>hsbp47</i> | 18 |
| Comparación del Gen <i>hsbp47</i> | 18 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 19 |
| Cultivo y Purificación de HSBP | 19 |
| Caracterización de HSBP47.2 | 19 |
| Inmunodetección de HSBP | 23 |
| Ensayo de Doble Dimensión de HSBP de <i>H. pylori</i> ATCC 43504 | 25 |
| Identificación de la Proteína HSBP47.2 de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504 | 29 |
| Análisis in silico de Genes <i>hsbp47</i> de <i>H. pylori</i> . | 31 |
| Diseño de Iniciadores para la Amplificación del Gen <i>hsbp47</i> | 31 |
| CONCLUSIONES | 37 |
| PERSPECTIVAS | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA | 39 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| I | Factores de virulencia de <i>H. pylori</i> . | 7 |
| II | Diagnóstico de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> . | 8 |
| III | Regímenes terapéuticos aprobados por FDA en tratamiento de <i>H. pylori</i> . | 10 |
| IV | Obtención de HSBP. | 22 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Representación esquemática de los factores contribuyentes a la patología gástrica y consecuente enfermedad asociada a <i>H. pylori</i> . | 5 |
| 2 | Resultados de la verificación de la cepa ATCC 43504 de <i>H. pylori</i> . | 20 |
| 3 | Cromatograma de afinidad. | 21 |
| 4 | Electroforesis en gel de poliacrilamida de HSBP purificadas de <i>H. pylori</i> ATCC 43504. | 24 |
| 5 | Ensayo para definir las concentraciones adecuadas a utilizar en el ensayo de inmunodetección. | 26 |
| 6 | Western Blot de HSBP de <i>Helicobacter pylori</i> ATCC 43504. | 27 |
| 7 | Punto Isoeléctrico de HSBPs aisladas de <i>H. pylori</i> ATCC 43504. | 28 |
| 8 | Secuencia de aminoácidos obtenida de la HSBP 47.2 de <i>H. pylori</i> cepa 26695. | 30 |
| 9 | Alineamiento de los genes codificantes para EF-Tu, de 10 cepas de <i>H. pylori</i> . | 32 |

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar y caracterizar parcialmente el gen *hsbp47* de *Helicobacter pylori* ATCC 43504.

Objetivos Particulares

Obtener y purificar la proteína de superficie de 47.2 KDa con afinidad a sulfato de heparina de *Helicobacter pylori*.

Identificar el gen *hsbp47* codificante para la proteína de superficie OMP con función de adhesina.

Comparar la secuencia de nucleótidos del gen *hsbp47* entre las cepas de *Helicobacter pylori* reportadas.

Proponer la secuencia de iniciadores para la amplificación del gen *hsbp47*.

RESUMEN

El género *Helicobacter* agrupa alrededor de 20 especies reconocidas, con muchas especies aguardando el reconocimiento formal. Los miembros de este género son todos organismos microaerófilos y en la mayoría de los casos son catalasa, oxidasa y ureasa positivos. La infección por *Helicobacter pylori* afecta cerca del 50% de la población humana; de los casos infectados, 10-15% desarrollan úlcera péptica y arriba del 3% presentan cáncer gástrico. Esto sugiere que alrededor del 7% de la población mundial eventualmente puede desarrollar enfermedad gastrointestinal asociada a *H. pylori*. La erradicación de la bacteria con el empleo de múltiples fármacos, se asocia a un mal cumplimiento de la terapia por parte del paciente, y el consecuente desarrollo de resistencia antimicrobiana por parte del patógeno. Adicionalmente, una eficacia inconsistente, fármacos que no son accesibles en la mayoría de la población, costos para su uso en gran escala, efectos adversos y el riesgo de reinfección, hacen recomendable el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento, tales como vacunas. En el presente trabajo se logró identificar el gen que codifica la proteína con afinidad a sulfato de heparina (HSBP) de 47.2 KDa, que se ha demostrado participa en el proceso de adhesión y se propone como candidato para el desarrollo de una vacuna. Mediante comparación con las secuencias de genomas reportados para este patógeno, se identificaron polimorfismos en el gen *Ef-Tu* y se proponen los iniciadores para la amplificación del gen, para una posterior clonación del mismo, y se investigue su eficacia como materia prima en la elaboración de una vacuna contra *H. pylori*.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori coloniza el estómago de aproximadamente la mitad de la población humana mundial, está asociado con gastritis crónica, a menudo asintomática en todos los individuos infectados. Según varios criterios, enfermedades gástricas más severas, incluyendo la enfermedad úlcero péptica pueden ocurrir hasta en un 10-15% de las personas infectadas (Backert y col., 2011).

A pesar de un descenso general en la incidencia de cáncer gástrico, sigue siendo el cuarto padecimiento más común y la segunda causa principal de muertes relacionadas con cáncer en todo el mundo. La patogénesis de los diversos casos clínicos es multifactorial, incluyendo condiciones ambientales (principalmente dieta) que desempeñan a menudo un papel dominante influenciado por los factores del huésped, especialmente aquellos que gobiernan la severidad de la respuesta inmune así como la virulencia del organismo de infección (Yamaoka, 2012).

La infección por *H. pylori* es generalmente adquirida en la infancia y persiste durante toda la vida. La resolución espontánea es rara, y por ello se necesita una terapia dirigida. Es una bacteria Gram-negativa que coloniza bajo la capa de la mucosa gástrica, se une fuertemente a las células epiteliales, incluso dentro de las mismas donde la acción antibiótica está deteriorada, y por lo tanto, curar dicha infección es difícil. Se han propuesto diferentes combinaciones de antibióticos, administrados junto con un inhibidor de la bomba de protones (PPI), en las últimas décadas. Desgraciadamente, ninguna terapia disponible es capaz de erradicar el *H. pylori* en los pacientes tratados.

El fracaso en la erradicación de *H. pylori* puede ser debido a mutaciones o por la adquisición de genes acarreados en elementos genéticos móviles (transferencia horizontal de gen); esto causa cambios en cada sitio de acción de la droga, y no puede ser revertido aumentando la dosis o la duración (Wu y col., 2012).

Se encontró que *H. pylori* se une con gran afinidad a glicosaminoglicanos como heparina y sulfato de heparina, y a factores de crecimiento dependientes de heparina. Los proteoglicanos son importantes en el desarrollo normal de la función celular,

coagulación sanguínea, organización de la matriz extracelular, adhesión celular y acción citoquina. El sulfato de heparina (HS) participa como una molécula de adhesión uniendo las proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina y vitronectina) en interacciones que pueden afectar la adhesión celular. Se ha demostrado que muchos organismos usan la matriz extracelular como un medio de adhesión una vez que el tejido está dañado (Ruiz-Bustos y col., 2001).

También se ha reportado que la inmunización oral de ratones BALB/c con HSBP (Proteínas de unión a Sulfato de Heparina) suscita una respuesta inmune mucosa específica y sistémica (Ruiz-Bustos y col., 1999).

Por ello se considera la elaboración de vacunas como una estrategia anti-adhesión, y se propone probar diferentes adhesinas con afinidad a sulfato de heparina. De éstas, las que se encontraron en mayor proporción entre las cepas de *Helicobacter pylori* fueron dos proteínas de superficie de 71.5 y 66.2 KDa y una proteína de membrana externa de 47.2 KDa (Guzmán-Murillo y col., 2001; Ruiz-Bustos y col., 2001). De esta última HSBP de 47.2 KDa, se identificó el gen que la codifica mediante la caracterización parcial de la proteína en la cepa de *H. pylori* ATCC 43504, la identificación del gen *hsbp47* y su análisis in silico para diseñar los cebadores adecuados para ser amplificado.

El objetivo del presente trabajo, fue identificar el gen codificante para la proteína de 47.2 KDa con afinidad al sulfato de heparina, hacer estudios de alineamiento del gen reportado para 10 cepas de *H. pylori* y proponer iniciadores para la amplificación del mismo, con perspectivas a futuros ensayos de clonación y expresión en vías de un diseño de una vacuna contra este patógeno gastrointestinal humano.

ANTECEDENTES

Generalidades de *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori es un microorganismo espiral o curvo en condiciones óptimas, mide 0.5 x 5 µm de longitud con 5 a 7 flagelos polares envainados. Esta morfología corresponde a la requerida por el bacilo para obtener una máxima motilidad dentro de la mucosa del tracto gastrointestinal del huésped. Es una bacteria gram negativo con una profusa producción de ureasa lo que le favorece la sobrevivencia al ambiente ácido del estómago, así como la producción de oxidasa y catalasa que ha sido asociado a su sobrevivencia en las células polimorfonucleares (Hazell y col., 2001).

Se estima que al menos el 50% de la población mundial padece de la presencia de *H. pylori*; un estudio nacional de seroprevalencia, reportado en 1998 (Torres, 2005), reporta que en 11,000 muestras de suero colectadas en México entre 1987 y 1988, 20% en niños de 1 año, y cerca del 50% con edad de 10 años presentaban anticuerpos anti-*H. pylori*. En los adolescentes, la prevalencia de la infección aumenta dramáticamente y para los 20 años, 70% de la población presenta estos anticuerpos. En el 2013, Porras y col., hace el comparativo de seis países latinoamericanos, encontrándose en todos ellos una elevada seropositividad.

Enfermedades Asociadas

Gastritis Aguda y Crónica

La colonización con *H. pylori* virtualmente conduce siempre a la infiltración de la mucosa gástrica tanto en antro como corpus con neutrófilos y células mononucleares. Esta gastritis crónica activa es la condición primaria relacionada con la colonización por *H. pylori*, y otros desórdenes asociados resultan en particular de este proceso inflamatorio crónico (Kusters y Arnoud, 2006).

Enfermedad Úlcero-Péptica

Las úlceras gástricas y duodenales se relacionan fuertemente con *H. pylori*, en reportes iniciales de todo el mundo en la primera década después del descubrimiento de *H.*

pylori, aproximadamente 95% de úlceras duodenales y el 85% de úlceras gástricas ocurrieron en presencia de infección por este patógeno (Kusters y Arnoud, 2006). La figura 1 enlista los factores que determinan que la infección por *H. pylori* derive en una de las enfermedades asociadas.

Las úlceras gástricas o duodenales (designadas comúnmente úlceras pépticas) se definen como defectos en la mucosa con un diámetro de por lo menos 0.5 centímetros, que penetran a través de la capa muscularis mucosa. Las úlceras gástricas ocurren sobre todo a lo largo de la curvatura menor del estómago, particularmente, en la transición de mucosa del corpus al antrum. Las úlceras duodenales ocurren generalmente en el bulbo duodenal, que es el área más expuesta al ácido gástrico.

Cáncer Gástrico

Los países con altas tasas de cáncer gástrico tienen típicamente una alta prevalencia de la infección de *H. pylori*, mientras que una baja prevalencia en países desarrollados es paralelo al decremento en la incidencia del cáncer gástrico. La infección por *H. pylori* se adquiere principalmente durante la niñez temprana, probablemente por ingestión oral directa, y la infección persiste a través de la vida. La prevalencia está estrechamente ligada a los factores socioeconómicos, tales como bajo ingreso y educación deficiente, y a condiciones de vida tales como pobre saneamiento y hacinamiento durante la niñez. La asociación entre la infección crónica por *H. pylori* y el desarrollo del cáncer gástrico está bien establecida. En 1994, la agencia internacional para la investigación del cáncer clasificó a *H. pylori* como un carcinógeno de Tipo I en los seres humanos (Crew y Neugut, 2006).

Mundialmente, la mayor tasa de mortalidad por cáncer gástrico es observada en Japón, la cual es 6 a 10 veces mayor que la de Estados Unidos (Tovar y col., 2001).

La mortalidad por cáncer de estómago ha ido en decremento en algunos países, mientras que en México se observa que se ha incrementado constantemente desde 1980, principalmente en el sexo masculino (Tovar y col., 2001).

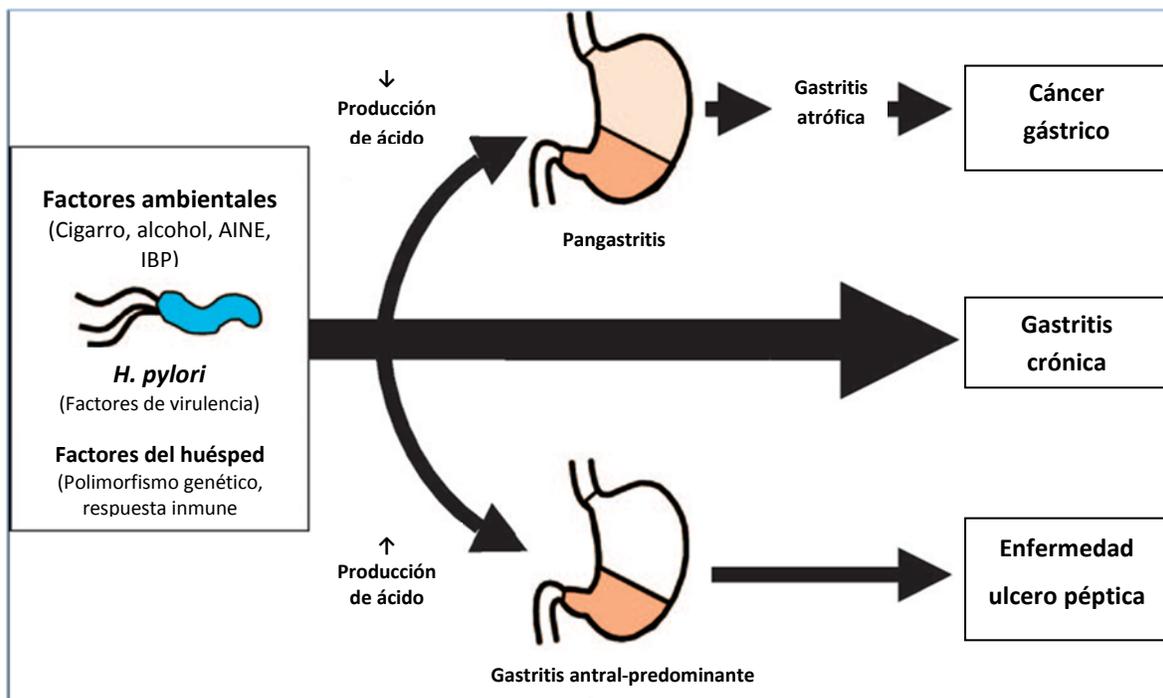


Figura 1. Representación esquemática de los factores contribuyentes a la patología gástrica y consecuente enfermedad asociada a *H. pylori* (Kusters, 2006).

Factores de Virulencia

La tabla I muestra los principales factores de virulencia empleados por *H. pylori*, siendo considerado uno de los más importantes, la Toxina vacuolizante (VacA), que causa vacuolización del citoplasma en las células epiteliales gástricas. Otro factor bien caracterizado es el antígeno asociado a citotoxina (CagA), que es codificado por uno de los genes situados en la isla de patogenicidad *cag* (PAI). Las cepas que expresando *vacAs1* y/o *cagA* están presentes en una frecuencia más alta en pacientes con úlceras duodenales, gastritis atrófica y carcinoma gástrico, se refieren como cepas tipo I. En cambio, las cepas tipo II, que carecen del gene *cagA*, presentan una forma no tóxica de VacA y se consideran menos virulentas. El antígeno del grupo sanguíneo de unión a adhesina (Bab A) codificado por el gen *babA2*, se ha demostrado que media la adherencia de *H. pylori* al antígeno de grupo sanguíneo de Lewis b en las células epiteliales gástricas humanas. El anclaje puede facilitar la colonización por *H. pylori* y la entrega eficiente de los factores de virulencia tales como VacA o CagA a las células huésped, dando como resultado la inflamación gástrica severa (Sicheng Wen y col., 2007).

Métodos de Detección

Aún y cuando existe discrepancia entre los autores en la clasificación de estos métodos, a continuación se muestran los más representativos agrupados en función del grado de invasividad del método clasificándolos en invasivos y no invasivos.

La tabla II muestra un comparativo de los distintos métodos de diagnóstico disponibles para la identificación de *H. pylori*, mostrando las características típicas de cada uno.

Tabla I. Factores de virulencia de *H. pylori* (Andersen y Wadström, 2001).

| FACTOR DE VIRULENCIA | EFEECTO |
|-------------------------------------|---|
| <i>Colonizante:</i> | |
| Flagelos | Movimientos activos a través de la mucina |
| Ureasa | Neutralización de ácido |
| Adhesinas | Anclaje de la bacteria al epitelio |
| <i>Daño a tejido:</i> | |
| Enzimas proteolíticas | Glucosulfatasa degrada mucina |
| Citotoxina 120Kd (Gac A) | Relacionada a úlcera y gastritis severa |
| Citotoxina vacuolizante (Vac A) | Daño al epitelio |
| Ureasa | Efecto tóxico en células epiteliales, rompiendo uniones estrechas |
| Fosfolipasa A | Digestión de fosfolípidos en las membranas celulares |
| Alcohol dehidrogenasa | Daño a la mucosa gástrica |
| <i>Sobrevivencia:</i> | |
| Vigilancia intracelular | Previene muerte en fagocitos |
| Superóxidodismutasa | Previene fagocitosis y muerte |
| Catalasa | Previene fagocitosis y muerte |
| Formas cocoides | Forma durmiente |
| <i>Proteínas de choque térmico:</i> | |
| Ureasa | Antígeno sheathing |
| <i>Otros:</i> | |
| Lipopolisacárido | Baja actividad biológica |
| Homología grupo sanguíneo Lewis X/Y | Autoinmunidad |

Tabla II. Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* (Kusters, 2006).

| Método diagnóstico | Sensibilidad y especificidad * | Aplicación típica | Características |
|---------------------------------|--------------------------------|--|--|
| <i>Métodos Invasivos</i> | | | |
| Histología | >95% | “Estándar de oro” de rutina en hospitales | Requiere un patólogo experto; también proporciona datos histológicos |
| Cultivo de biopsia | >95% | “Estándar de oro” alternativo | Requiere de un microbiólogo experto; permite probar la sensibilidad antimicrobiana |
| Prueba de ureasa rápida (CLO) | >90% | Prueba rápida de adecuado costo- beneficio | Requiere una prueba adicional de confirmación de <i>H. pylori</i> |
| <i>Métodos no Invasivos</i> | | | |
| Prueba de urea en aliento (UBT) | >95% | “Estándar de oro” alternativo | Prueba muy útil y sencilla; requiere de equipo altamente especializado |
| Prueba de antígeno fecal | >90% | Aún no se usa ampliamente | Prueba simple pero puede no ser confiable para la evaluación del tratamiento |
| Serología | 80–90% | Principalmente para estudios epidemiológicos | Confiabilidad escasa; no discrimina entre infección activa o pasada |

*Rango global, dependiendo de variaciones regionales y sujetos.

Tratamiento

La erradicación de la infección de *H. pylori* es el medio más eficaz para curar la enfermedad úlcero péptica y prevenir posibles episodios recurrentes. Los regímenes de tratamiento más comunes incluyen un inhibidor de la bomba del protones más dos de los agentes antimicrobianos siguientes: amoxicilina, claritromicina, metronidazol o tetraciclina (Torres y col., 2001). La tabla III muestra las principales terapias disponibles para el tratamiento de la infección siendo las combinadas las que mejores resultados han arrojado, sin embargo los costos y los severos efectos secundarios han sido las principales razones para la generación de cepas resistentes a estos fármacos.

Resistencia a Antibióticos

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento empleado para la erradicación de *H. pylori* tiene los inconvenientes de ser agresivo y prolongado, aunado a esto han sido descubiertas cepas multidroga- resistentes. La alta expresión del gen *hefA* que codifica para una bomba de flujo multidroga, desempeña un papel importante en la MDR (multidrogoresistencia) de *H. pylori*, por lo que dicho componente necesita ser considerado al determinar mecanismos de resistencia en *H. pylori* (Zhi-Qiang y col., 2008). Se han observado en estudios realizados en Estados Unidos tasas de resistencia a antibióticos más altas en las cepas pediátricas de *H. pylori* comparadas con las aisladas de adultos, particularmente resistencia a los macrólidos (Tolia, 2000; Kato y col., 2002).

La resistencia antimicrobiana de *H. pylori* en aislados clínicos es extensa, varía año con año, y los aislados resistentes son más comunes entre la raza negra (Duck y col., 2004).

Tabla III. Regímenes terapéuticos aprobados por FDA en tratamiento de *H. pylori* (Dunn, 1997).

| Régimen (Dosis*) | Duración de la terapia | % de Erradicación | Aprobada por FDA? |
|---|--|-------------------|---------------------------|
| <p>Triple terapia con Bismuto Tetraciclina HCl (500 mg qid) + Metronidazol (250 mg qid) + Subsalicilato de Bismuto (2 tabletas qid)</p> | 2 semanas | 85 | Si |
| <p>Terapia dual Claritromicina (500 mg tid) + Omeprazol (40 mg diario) ó Claritromicina (500 mg tid) + Citrato bismuto de ranitidina (400 mg bid)</p> | 2 semanas | 74 82 | Si |
| <p>Regímenes de terapia triple Metronidazol (500 mg bid) ó Amoxicilina (1 g bid) + Claritromicina (500 mg bid) + Omeprazol (20 mg bid) ó Lansoprazol (30 mg bid)</p> | 1 semana (dos semanas preferentemente) | 90 | No (aprobación pendiente) |
| <p>Citrato Bismuto de ranitidina (400 mg bid) + Claritromicina (500 mg bid) + Amoxicilina (1 g bid)</p> | 2 semanas | 90 | No |

* *bid*, dos veces al día; *tid*, tres veces al día; *qid*, cuatro veces al día.

Nuevas Estrategias: Perspectiva de Vacunas

Se está desarrollando en forma extensiva investigación para obtener una vacuna contra *H. pylori* que tendrá (a) uso profiláctico para prevenir la infección y (b) uso terapéutico para suprimir una infección en curso. Como la colonización de *H. pylori* ocurre durante la niñez, los infantes se pueden considerar como la población blanco para los programas profilácticos de vacunación, mientras que los adultos con infección de *H. pylori* son candidatos a recibir las vacunas para los propósitos terapéuticos (Kabir, 2007).

Recientemente la vacunación sistémica clásica usando tres antígenos clave de *H. pylori* (GacA, VacA y NAP) se ha desarrollado con algunos resultados alentadores (Del Giudice y col., 2001).

Algunos estudios de vacunación que implican a una pequeña cantidad de seres humanos infectados o no infectados con varias formulaciones de *H. pylori* tales como la ureasa recombinante, células enteras muertas y vectores vivos de *Salmonella* que presentaban la subunidad de los antígenos no han proporcionado resultados satisfactorios. Un ensayo que utilizó la ureasa recombinante de *H. pylori* coadministrada con la enterotoxina nativa de *Escherichia coli* (LT) demostró una reducción de la carga *H. pylori* en participantes infectados. Aunque estudios extensivos en modelo de ratón han demostrado la viabilidad de inmunizaciones terapéuticas y profilácticas, el mecanismo de la protección inducida por vacunas es mal entendido pues varios factores tales como inmunoglobulinas y varias citoquinas no contribuyen a la protección.

Los análisis de Transcriptoma en ratones han indicado el papel de factores inmunes no clásicos en la protección vacuna-inducida. Se ha sugerido el papel de las células de T reguladoras en la persistencia de la infección de *H. pylori* (Kabir, 2007).

HSBPs de *Helicobacter pylori* como Candidato de Vacuna

Diferentes estudios han demostrado que la heparina, sulfato de heparina (HS) y otros glicosaminoglicanos (GAGs) están involucrados en la unión de varios virus específicos y microorganismos patógenos a las células eucarióticas (Frevet y col., 1997).

En estudios realizados por Ascencio y col. (1993, 1995), encontraron que *H. pylori* se une con gran afinidad a glucosaminoglicanos tales como la heparina, sulfato de heparina y a factores de crecimiento dependientes de heparina. El proteoglicano sulfato de heparina participa como una molécula de adhesión uniendo las proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina y vitronectina) en interacciones que pueden afectar la adhesión celular (Love y col., 1993; Noel y col., 1994). La unión del glicosaminoglicano sulfato de heparina a las células de *H. pylori* ha sido propuesta como candidata para una terapia antiadhesión (Ljungh y col., 1996).

Guzmán y col. (2001) demostraron que proteínas fijadoras de sulfato de heparina (HSBP) están involucradas en la adherencia de *H. pylori* a células HeLa y Kato III, retando los cultivos celulares de éstas con *H. pylori* previamente incubado con IgG de conejo anti-HSBP, resultando una inhibición significativa de la adherencia bacteriana.

En 2000, Ruiz-Bustos y col. demostraron que la inmunización oral de ratones BALB/c con una vacuna compuesta de HSBP de *H. pylori* prevenía la colonización bacteriana de la mucosa intestinal por una cepa de *H. pylori* adaptada a ratón. Se encontró una reducción en la adhesión de la bacteria al tracto gastrointestinal de cerca del 100% en ratones no vacunados a un 6.6% en el grupo inmunizado por un complejo HSBP-CTB (subunidad β de la toxina colérica). De esta forma, se demostró la factibilidad de llevar estudios posteriores para la evaluación de este grupo de proteínas como parte de una estrategia para la prevención o incluso posible tratamiento de infecciones gastrointestinales asociadas a *H. pylori*. Altos niveles de IgG anti-HSBP de *H. pylori* fueron encontrados en suero de ratones inmunizados. La respuesta inmune de IgA en mucosa contra HSBP de *Helicobacter pylori* fue detectado en el suero de ratones inmunizados, así como en el moco intestinal y secreciones biliares. Estos descubrimientos sugirieron que el inmunógeno HSBP-CTB es capaz de prevenir la infección en ratones BALB/c, bloqueando las adhesinas HSBP de *H. pylori*, y en consecuencia previniendo la adhesión de la bacteria a las células gástricas (Ruiz-Bustos y col., 2001).

Ruiz-Bustos y col., en 2001 aislaron y caracterizaron las HSBP de *H. pylori* encontrando que la bacteria produce principalmente dos proteínas extracelulares (71,5

KDa, pl 5,0 y 66,2 KDa, pl 5,4) y una proteína de membrana externa OMP (47,2 KDa) que exhibió una fuerte afinidad por el proteoglicano.

La Clonación como Herramienta para Obtención de Proteína

La clonación del DNA permite seleccionar una copia de cualquier secuencia de RNA o DNA entre millones de otras secuencias de una célula, produciendo cantidades ilimitadas de ella en forma pura. Las secuencias de DNA son amplificadas después de cortar el DNA cromosómico con una nucleasa de restricción e insertar los fragmentos resultantes en el cromosoma de un elemento genético autorreplicante (plásmido o virus). Si se utiliza un plásmido como vector, la biblioteca genómica de DNA resultante se mantiene dentro de millones de células bacterianas cada una de las cuales porta un fragmento diferente de DNA clonado. La colonia portadora del fragmento de interés se identifica mediante hibridación con una sonda DNA o después de expresar el gen clonado en la célula huésped, mediante un sistema que detecte el producto génico deseado. Las células de la colonia identificada se dejan proliferar produciendo grandes cantidades de DNA deseado (Alberts y col., 2002). Existen diferentes métodos para lograr la transfección del constructo en la célula ya sea por medio de fagos, transformación balística, fusión de membranas, iontoforesis (por una micropipeta) o electroporación (abrir poros en la membrana) éste último ampliamente utilizado. Una vez obtenido el gen de interés, es posible acceder también al producto de su expresión en grandes cantidades.

A pesar de que han transcurrido más de 15 años desde el descubrimiento de *Helicobacter pylori*, no se ha desarrollado una monoterapia antimicrobiana o vacuna efectivas, (Ruiz-Bustos y col., 2001). Actualmente se utilizan antibióticos para erradicar el *H. pylori*. Sin embargo, el tratamiento tiene varias desventajas pues han emergido cepas antibiótico-resistentes. Además, los índices de reinfección siguen siendo altos en las regiones endémicas. La conformidad del paciente también puede ser problemática debido a la alta ingesta de gran cantidad de tabletas que puedan causar efectos secundarios tales como dolor abdominal, náusea, y diarrea (Kabir, 2007).

Se ha demostrado la factibilidad de llevar a cabo estudios para la evaluación del grupo de proteínas HSBP como parte de una estrategia para la prevención o incluso posible tratamiento de infecciones gastrointestinales asociadas a *H. pylori* (Ruiz-Bustos y col., 2000).

Hasta ahora se ha trabajado con HSBPs obtenidas de los sobrenadantes de cultivos bacterianos o de extractos generados de proteínas de superficie, sin embargo dado lo lento de su crecimiento y sus requerimientos nutricionales no se consideraría viable emplear esta estrategia para la generación de la materia prima para la elaboración de una vacuna, por lo que sería conveniente disponer por medio de la clonación del gen *hsbp*, de una fuente abundante y rápida de HSBPs para la elaboración de una vacuna eficaz que contribuya a establecer medidas inmunoprolácticas contra los padecimientos asociados a *H. pylori*. El éxito de esta propuesta, redundará además de lo señalado, en la reducción de costos para esta línea de investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Helicobacter pylori* ATCC 43504

Se realizó un control de calidad de la cepa previo al cultivo, para éste se sembró una asada de *Helicobacter pylori* ATCC 43504 en placas de Agar GAB-CAMP (GC, BBL) suplementado con 8.5% de sangre humana lisada (80°C, 20 min), 10% de suero inactivado de caballo (56°C, 30 min), 0.05% de hidrocloreuro de cisteína y los siguientes antibióticos: vancomicina 6 µg/mL, ácido nalidíxico 20 µg/mL y ketoconazol 3 µg/mL, a 37°C por tres días en condiciones de microaerofilia. Las colonias resultantes se sembraron en caldo *Brucella* con 10% de suero de caballo y suplemento antimicrobiano, se incubaron a las condiciones anteriormente descritas y se cosecharon y conservaron a -20°C hasta que se utilizaron para el aislamiento de proteínas.

Extracción de Proteínas de Superficie

Se recolectaron las células del cultivo y se sometieron a centrifugación a 2,500 xg por 15 minutos. El botón celular obtenido se resuspendió y agitó en 10 mL de agua destilada, y se mantuvo por 1 hora en un oscilador a temperatura ambiente. Pasado el tiempo la solución se centrifugó a 2,000 xg por 30 min, y se realizó el mismo procedimiento para la extracción con Urea 3 M. Después de transcurrido este tiempo los dos sobrenadantes obtenidos (tanto de agua como de urea) se sometieron a diálisis contra bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3 0.01M) a pH 5 por el transcurso de 1 semana, haciendo cambios de bicarbonato, aproximadamente cada 8 h.

Purificación y Caracterización Parcial de la HSBP47.2 de Superficie

Cromatografía de Afinidad

Las fracciones proteicas obtenidas a partir de los sobrenadantes de los cultivos líquidos, se sometieron a un procedimiento cromatográfico de afinidad a heparina. Se diluyeron las muestras 1:1 en acetato sódico 0.1 M (pH 5.0) y se filtraron a través de membranas de 0.45 µm. Se aplicaron muestras de 1 mL a una columna Hi-Trap de heparina de 5 mL previamente equilibrada con acetato sódico 0.1 M (pH 5.0) a un flujo

de 1 mL/min. Las proteínas adsorbidas se eluyeron con cloruro de sodio 2 M bajo el mismo flujo, para recolectarse fracciones de 1 mL. Finalmente se lavó la columna con hidróxido de sodio 0.01 M y se regeneró con agua destilada y acetato de sodio 0.1 M. Las fracciones recolectadas fueron extensivamente dializadas contra bicarbonato de amonio 0.1 M y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Se cuantificó la proteína obtenida en las distintas fracciones de los dializados mediante el método Bradford, utilizando un estándar de albúmina de suero bovina (BSA) con 1.42 mg/mL. Las fracciones se diluyeron 1:2 en PBS 1x y se leyeron en un espectrofotómetro a $\lambda = 570$ nm.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras se sometieron a electroforesis de acuerdo al método de Laemmli, empleando el sistema Mini-Protean II de Bio-Rad. Se desnaturalizaron las muestras por 7 min a 100°C en regulador (Tris-HCl 0.6 M, pH 6.8, 10% glicerol, 10% SDS, 5% β -mercaptoetanol y 0.05% azul de bromofenol). Los extractos conteniendo entre 5 y 10 g de proteína total, así como marcadores de masa molecular, se aplicaron a un gel discontinuo de poliacrilamida, separados a 80V por 2 horas y se tiñeron con azul de Coomassie R-250.

Ensayo DOT BLOT

Se realizaron ensayos Dot Blot con el fin de conocer las diluciones óptimas de anticuerpos anti HSBP de ratón a ser utilizadas en el ensayo Western Blot. Para ello se utilizaron concentraciones proteicas de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Como anticuerpo primario se utilizó el tercer sangrado de la inmunización en ratón con la cepa CD1 anti HSBP de *H. pylori* ATCC 43504. Como control negativo se usó suero preinmune de la cepa CD1. Para el anticuerpo secundario, se hicieron diluciones partiendo de una solución patrón 1:100 de anti IgG de cabra anti-ratón peroxidado. El revelado de las manchas fue por la técnica de quimioluminiscencia empleando una mezcla 1:1 de luminol- H_2O_2 y un tiempo de 30 segundos.

Transferencia Electroforética

Previo al ensayo Western blot se transfirieron las HSBP de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa. Las HSBP se utilizaron en concentraciones mínimas de 200 µg. Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para evidenciar la proteína. Para la transferencia se empleó el método semi seco utilizando el equipo HEP-1 semi-dry-blotter 20x20 cm a 120 mA, amperaje constante, por un período de 45 min.

Western Blot de HSBP

Primeramente las HSBP transferidas a la membrana de nitrocelulosa fueron bloqueadas con BSA 0.1% y leche descremada al 5% en PBS 1x por una hora. Los lavados se realizaron con PBS 1x. El siguiente paso fue la incubación por dos h de la membrana de nitrocelulosa con una dilución 1:4000 de suero anti HSBP de ratón, cepa CD1 (anticuerpo primario). Posteriormente se hicieron 5 lavados con PBS 1x-Tween 20, 0.05% (PBS-T) por 5 min cada uno. Como control negativo se utilizó suero preinmune de ratón, anti HSBP cepa CD1. Posterior a los lavados se procedió a la incubación por 2 h con el anticuerpo secundario consistente en una dilución 1:60 000 de anti Ig G de cabra anti- ratón peroxidada. Se realizaron 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T y finalmente se reveló la reacción por la técnica de quimioluminiscencia empleando una mezcla 1:1 de luminol-H₂O₂ y un tiempo de 30 segundos.

Determinación del Punto Isoeléctrico

Las muestras de proteína se ajustaron a una concentración de 5- 10 µg/mL en el buffer de muestra (urea 9,5 M, tritón X-100 2%, anfolina 5-10 2%, ditiotretitol 50 mM) antes del punto isoeléctrico (PI). Se preparó el gel con 5% de acrilamida y un rango de pH de 3-10 y se colocó en una cámara electroforética horizontal. Se cargaron las muestras y estándares del PI en el gel para correrse a 500V y 250 mA por 3h. Posteriormente se tiñó el gel con Azul Coomasie R-250 y las mediciones se calcularon de una curva estándar de acuerdo con la distancia de migración de los estándares del PI. Se corrió un segundo gel para punto isoeléctrico y se transfirió a membranas de Inmobilon

(Millipore) a las cuales se les agregó HS-POD (Sulfato de heparina marcado con peroxidasa).

Secuenciación de Aminoácidos

Las proteínas se corrieron en electroforesis con el equipo Protean (Biorad) siguiendo el protocolo descrito anteriormente y se transfirieron a membranas Immobilon para teñirse posteriormente con Azul Coomasie. Las bandas de las HSBP se cortaron y decoloraron con una mezcla de metanol-ácido acético-agua destilada (5:1:4) y se enjuagaron vigorosamente con agua destilada para posteriormente procesarse por el método descrito por Schevchenko (2006) que consiste en la digestión de los péptidos por tripsina. Los péptidos digeridos se almacenaron a -70°C y se enviaron a analizar para determinar la secuencia de aminoácidos por el método de espectrofotometría de masas-masas (LC-MS/MS), que se realizó en la Universidad de Arizona, Laboratorio de Proteómica del Instituto BIO5.

Identificación del gen *hsbp47*

Conjuntando la información obtenida referente a la masa molecular, pI y secuencia de aminoácidos, ésta se comparó con los bancos de datos de dos secuencias completas del genoma de *H. pylori* reportadas, para identificar el gen que codifica para la HSBP 47.2.

Comparación del Gen *hsbp47*

Se realizó un análisis *in silico* del gen *hsbp47.2* mediante el paquete Fast PCR en el que se incluyeron los genomas de diez cepas de *H. pylori* reportadas en el GenBank, las cuales son: 26695, 299, B8, B38, G27, HPAG1, P12, PeCan4, Shi470 y SJM180. Se diseñaron los primers para la amplificación del gen por medio del programa mencionado, proponiéndose aquellos que cumplieran con un reconocimiento de todas las cepas, que tuvieran una (Tm) temperatura de hibridación adecuada y que los productos de PCR generados tuvieran un tamaño adecuado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo y Purificación de HSBP

Primeramente se realizó una caracterización bioquímica y morfológica verificándose satisfactoriamente el estado axénico del cultivo de *H. pylori*. En la figura 2 se presentan los resultados de la verificación de la cepa de referencia empleada (ATCC 43504).

Posteriormente se inició la extracción de proteínas HSBP totales de *H. pylori* mediante cromatografía de afinidad a heparina con la obtención de un dializado, el cual fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para lograr la separación de las HSBP por masa molecular y obtener aquella de 47.2 KDa. La figura 3 corresponde al cromatograma donde se observa la obtención de dos fracciones de proteína entre los 10-15 min (no adheridas) y 40-45 min (HSBP), patrón que corresponde al reportado previamente, para la cepa 25 (Ruiz-Bustos y col., 2001).

Caracterización de HSBP47.2

Las fracciones obtenidas de la cromatografía se dializaron con NH_4HCO_3 0.1 M por 16 días, posteriormente se liofilizaron resuspendieron en agua deionizada. El cromatograma de la figura 3 presenta las proteínas HSBP eluidas en el pico comprendido entre las fracciones 21 y 29, después de la adición de NaCl 2 M, acorde a los resultados descritos previamente (Ruiz-Bustos y col., 2001).

Al cuantificarse la proteína por el método Bradford, se calculó una concentración promedio de proteína de 1.53 mg/mL en los cultivos realizados. La tabla 4 concentra las cantidades en mg de proteína obtenida de cada uno de cuatro cultivos bacterianos de *H. pylori* ATCC 43504, en dos fases de purificación: la extracción de proteínas de superficie y la cromatografía de afinidad a heparina. Puede observarse que el rendimiento de HSBP por cultivo, es menor al 1% lo que justifica la búsqueda de alternativas para la producción en masa de estas proteínas, como se logra mediante las técnicas de expresión heteróloga lograda mediante clonación.

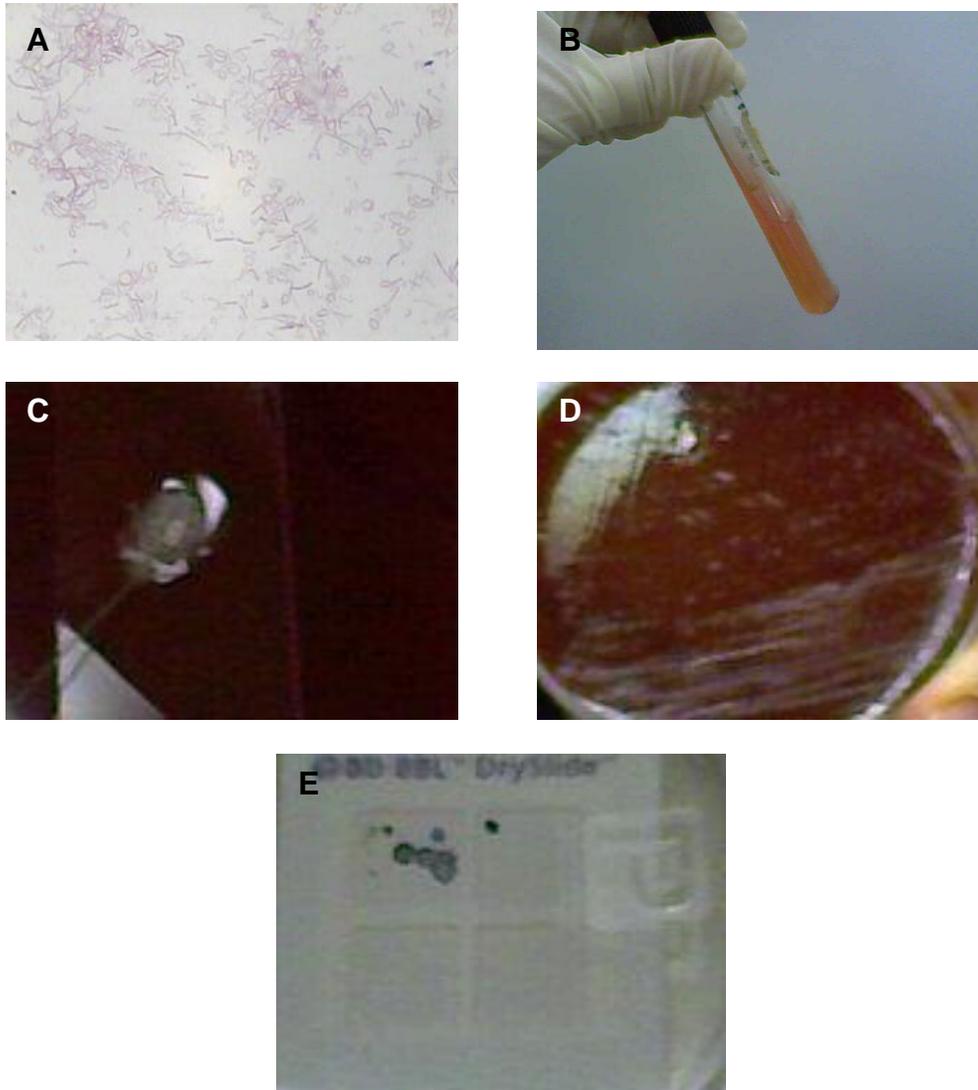


Figura 2. Resultados de la verificación de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*: A) Tinción Gram; B) Prueba de Ureasa; C) Prueba de Catalasa; D) Hemólisis en agar sangre; E) Prueba de Oxidasa.

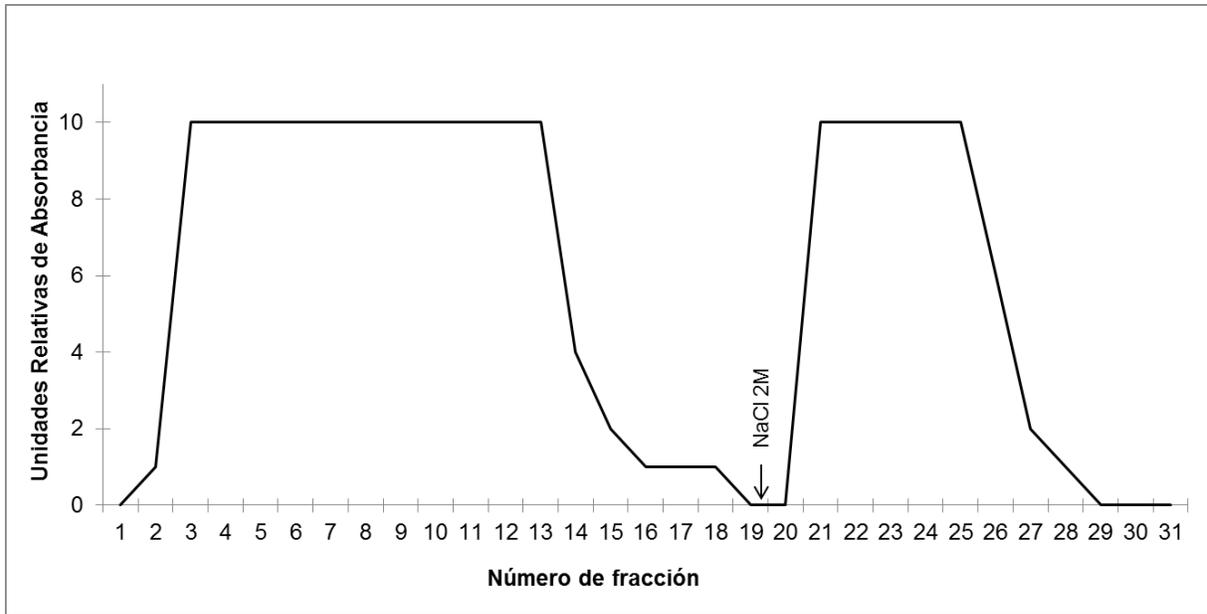


Figura 3. Cromatograma de afinidad. Obtención de HSBP observándose a partir de la elución con NaCl 2M en la fracción 20 el pico correspondiente a las fracciones de HSBPs. El pico denotado por las fracciones 2 a 19 corresponde a proteínas que no se unieron a la columna de Sulfato de Heparina HiTrap.

Tabla IV. Obtención de HSBP. Estimaciones del peso (mg) de cuatro muestras, tanto proteínas de superficie total, proteínas obtenidas de cromatografía y el porcentaje total de HSBP.

| Muestra | Proteínas de superficie (mg) | Cromatografía de afinidad a heparina (mg) | HSBP Totales (%) |
|----------------|-------------------------------------|--|-------------------------|
| I | 244.2 | 2.3 | 0.940 |
| II | 1,937.3 | 1.5 | 0.078 |
| III | 2,224.0 | 3.7 | 0.165 |
| IV | 1,986.0 | 5.1 | 0.257 |

Al realizar los ensayos de electroforesis según el método descrito por Laemmli (1970), con el fin de buscar la proteína de interés, se lograron visualizar bandas de 97.4, 66.2, 57.0, **47.2**, 45 y 31 KDa como se observa en la figura 4, correspondiendo todas ellas a HSBP de superficie, producidas por *H. pylori* cepa ATCC 43504 y siendo las previamente reportadas para la cepa 25 de este patógeno, aislada de un paciente sueco con cáncer gástrico (López-Bolaños y col., 2009; Ruiz-Bustos y col., 2001). Éstas también han sido reportadas por Campa-Viramontes y Rodríguez-Romero (2010) y Vega-Montoya (2010) al comparar HSBP extraídas de 4 cepas diferentes de *H. pylori* (ATCC 43503, 25, y en dos cepas aisladas de pacientes del Hospital General del Estado de Sonora).

Aquí también resulta evidente que la HSBP 47.2 es la de menor proporción en la cepa 43504 de *H. pylori*, sin embargo su papel en el mecanismo de adhesión ha sido demostrado en el 2009 por López-Bolaños y col. En éste trabajo, se demostró inhibición de la adhesión de *H. pylori* a células Kato III y HeLa S3, al preincubar al microorganismo con anticuerpos generados contra la HSBP de 47.2 KDa. Aún más, demostraron que la presencia de anticuerpos logra separar la unión entre *H. pylori* y las células HeLa S3 y Kato III; esto asimismo apoya los hallazgos realizados por Guzman-Murillo y col. (2001) y Camacho-Arellano (2012), quienes proponen que la generación de anticuerpos anti-HSBP no sólo induce una respuesta inmune preventiva, sino también correctiva para el tratamiento inmunológico de infecciones activas por *H. pylori*.

Inmunodetección de HSBP

Para definir las concentraciones adecuadas a utilizar en el Western blot, se realizaron previamente ensayos inmunoblot (figura 5), donde se determinó utilizar una dilución 1:4000 de anticuerpo primario y 1:8000 de anticuerpo secundario. Se utilizó como anticuerpo primario antisuero de ratón obtenido del tercer sangrado de la inmunización de ratones cepa CD1 (anti-HSBP) *H. pylori* ATCC 43504 (Campa-Viramontes y Rodríguez-Romero, 2010) y como anticuerpo secundario anti IgG de cabra anti-ratón ligado a peroxidasa de rábano.

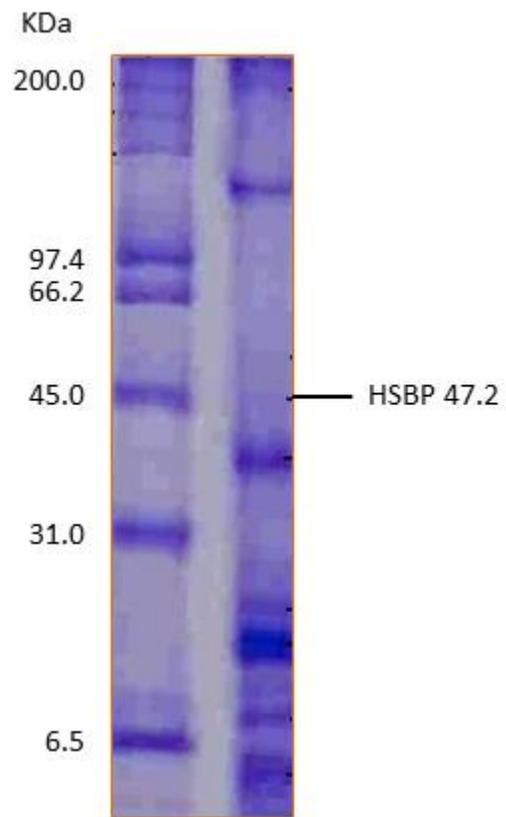


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida de HSBP purificadas de *H. pylori* ATCC 43504. 100 volt constante por aproximadamente 1.5 hr. Geles teñidos con Azul Coomasie.

Para control negativo se empleó el suero preinmune de ratón cepa CD1. El revelado de la reacción se realizó por quimioluminiscencia utilizando una mezcla 1:1 luminol-peróxido de hidrógeno en un tiempo de 30 segundos.

Previo al ensayo Western blot se realizó una electrotransferencia de muestras HSBP (por lo menos 200 µg de concentración) en geles al 15% de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa y para evidenciar la transferencia se tiñeron las membranas con rojo de Ponceau. La transferencia se llevó a cabo en un equipo HEP-1 semi-dry blotter de 20 x 20 cm a 120 mA, amperaje constante, por 45 min. Una vez evidenciada la transferencia de las HSBP, se realizó el Western blot bloqueando las proteínas en la membrana con leche semidescremada 5% en PBS 1x-Tween 20 0.05% por 5 min. El ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones que el ensayo de manchas (figura 6).

Ensayo de Doble Dimensión de HSBP de *H. pylori* ATCC 43504

Se realizó un ensayo de doble dimensión para conocer el punto isoeléctrico de la proteína de interés. Se utilizó el equipo BioRad Protean II gel system, con una concentración proteica mínima de 200 µg de HSBP en tiras de isoelectroenfoco de 7 cm y un rango de pH de 5-8. La corrida electroforética SDS-PAGE se realizó en gel de 15% acrilamida a 200 volts por un período de 2 h. Posteriormente, el gel fue teñido con tinción de plata.

Se observó una mancha correspondiente a la proteína de 44.7 KDa con un pI de 5.6 en concordancia con lo reportado por Ruiz-Bustos y col., 2001 (figura 7). Estas características coinciden con las reportadas previamente por Utt y Wadström (1997), en su estudio de caracterización bioquímica de adhesinas de *H. pylori*, donde demostraron que la adhesión al sulfato de heparina se lleva a cabo a pH entre 4 y 6, similar a las condiciones ambientales donde el microorganismo se desarrolla en su nicho natural (mucosa gástrica).

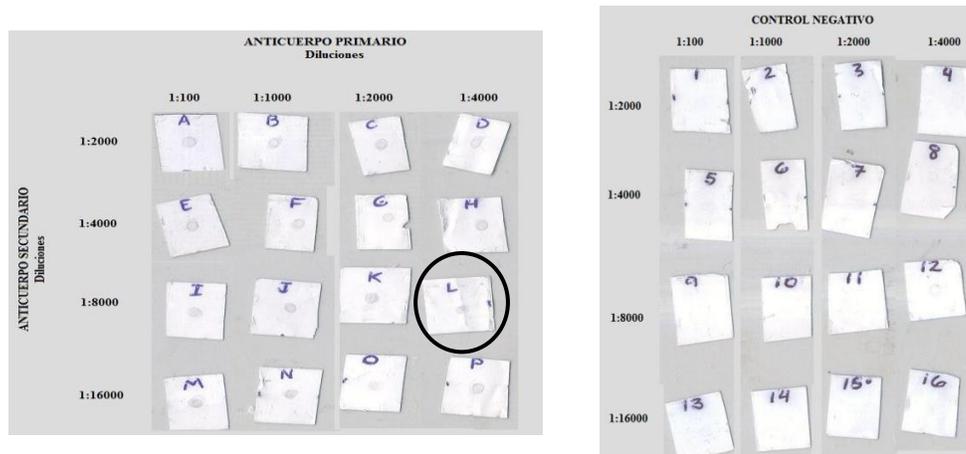


Figura 5. Ensayo para definir las concentraciones adecuadas a utilizar en el ensayo de inmunodetección. Se utilizó suero de ratón inmune contra cepa *H. pylori* ATCC 43504 como anticuerpo primario positivo y como control negativo el suero preinmune contra la misma cepa. Se indica en un círculo, las condiciones seleccionadas para las pruebas.

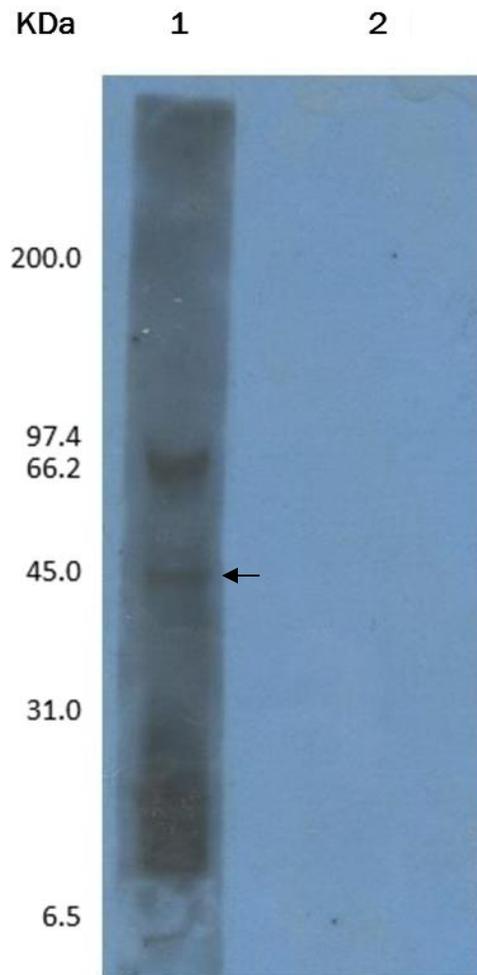


Figura 6. Western Blot de HSBP de *Helicobacter pylori* ATCC 43504. Carril 1 presenta bandas de HSBP que coinciden a las reportadas para la cepa 25 por Ruiz-Bustos y col. (2001). Carril 2, control negativo. La HSBP 47.2 es señalada por la flecha.

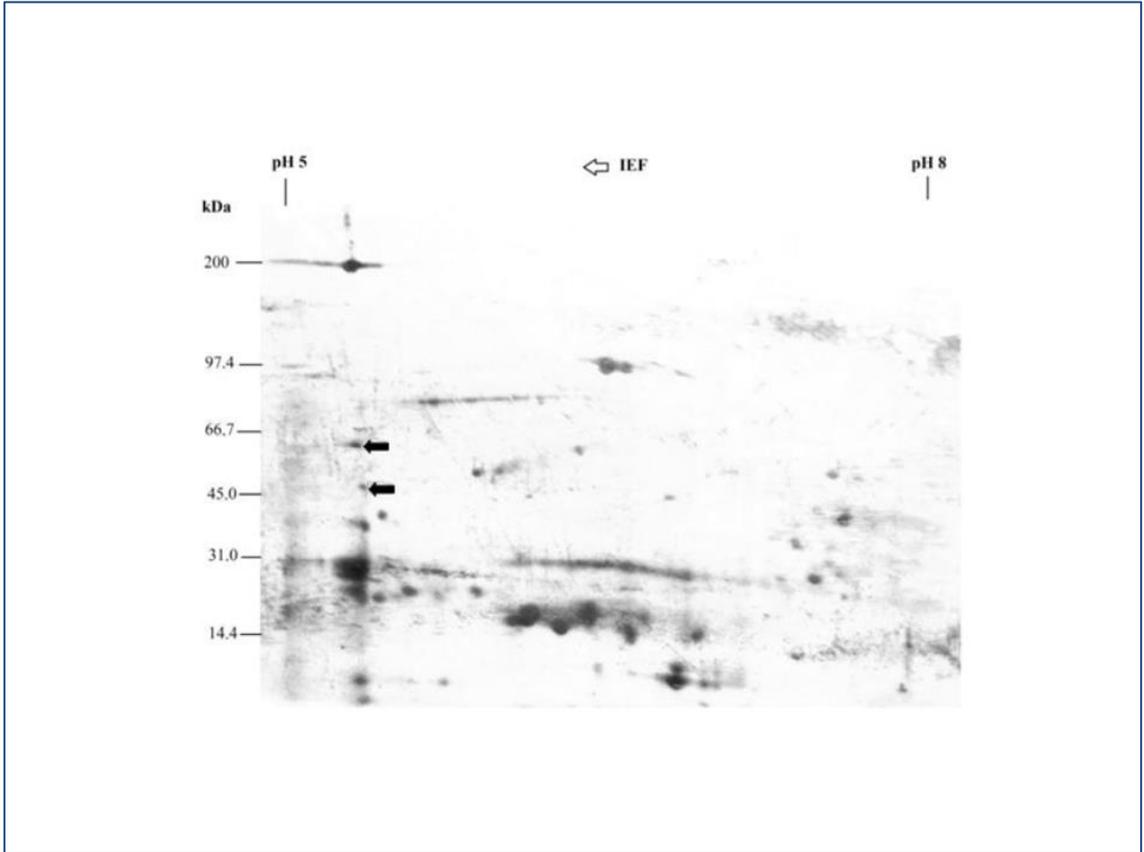


Figura 7. Punto Isoeléctrico de HSBPs aisladas de *H. pylori* 43504. Aplicación proteica de HSBP 200 µg. IEF, isoelectroenfoco pH 5 - 8. Electroforesis SDS-PAGE en gel al 15% de acrilamida teñido por tinción plata. Se indica con la flecha inferior, la proteína de interés, con una masa molecular de 47.2 KDa y un pI de 5.6.

Identificación de la Proteína HSBP47.2 de *Helicobacter pylori* ATCC 43504

Para identificar a la proteína HSBP de 47.2 KDa se empleó el péptido detectado mediante espectrometría de masas-masas (LC-MS/MS), determinándose dos secuencias de aminoácidos de péptidos internos: DFLREKGLSK y AAAMKPQVLD.

Posteriormente, se realizó una búsqueda en el GenBank, se encontró homología a la molécula con número de acceso P55975 en la base de datos Uniprot, y AAD08595.1 en GenBank y se obtuvo la secuencia de nucleótidos de la proteína HSBP de 47.2 reportada para la cepa 26695 (figura 8). La proteína de estudio se encuentra en GenBank con el nombre de Factor de Elongación en la Traducción Ef-Tu. Esta es una proteína de 355 aminoácidos reportada para esta cepa, lo que corresponde a una molécula de masa molecular calculada de 39.7 KDa.

Es probable que las diferencias encontradas entre la HSBP47 de *H. pylori* 43504 y el Ef-Tu de la cepa 63504, se relacione con la gran variabilidad genética en *H. pylori*, afectando no sólo los genes que distintas cepas poseen sino también las características de algunas proteínas codificadas, como ha sido reportado previamente (Israel y col., 2001).

Por otro lado, existen diversos reportes de la participación del factor de elongación Tu (Ef-Tu) en distintos microorganismos. Tal es el caso a lo reportado por Nishiyama y col., en el 2013, quienes demostraron que el Ef-Tu de *Lactobacillus reuteri*, presenta afinidad a carbohidratos sulfatados. Asimismo, se ha reportado la presencia de este factor en la envoltura celular de *Acinetobacter baumannii* y su afinidad a fibronectina (Dallo y col., 2012) así como su participación en las interacciones patógeno-mucosa de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Viale y col., 2014), lo que apoya la participación de esta molécula no sólo en el proceso de traducción, sino también como una adhesina en diversos microorganismos.

10 20 30 40 50 60
 MSGISAQLVK KLRDLTDAGM MDCKKALVEV AGDLQKAIDF LREKGLSKAA KKADRIA AEG

70 80 90 100 110 120
 VVALEVAPDF KSAMIVEINS ETDFVAKNEG FKELVKKTLE TIKAHNIHTT EELLKSPLDN

130 140 150 160 170 180
 KPFE EYLHSQ IAVIGENILV RKIAHLKAPS SHIINGYAHS NARVGVLLIGI KYDNEKNAPK

190 200 210 220 230 240
 VVELARNIAM HAAAMKPQVL DCKDFSLDFV KKETLALIAE IEKDNEEAKR LGKPLKNIPT

250 260 270 280 290 300
 FGSRIELSDE VLAHQKKA FE DELKAQ GKPE KIWDKIVPGK MERFIADNTL IDQRLTLLGQ

310 320 330 340 350
 FYVMDDK KTI AQVVADCSKE WNDDLKITEY VRFELGEGIE KKAENFAEEV ALQMK

Figura 8. Secuencia de aminoácidos obtenida de la HSBP 47.2 de *H. pylori* cepa 26695. Se resaltan las secuencias de los péptidos internos identificados en el presente trabajo.

Análisis in silico de Genes *hsbp47* de *H. pylori*

Con la finalidad de posteriormente clonar el gen que codifica a la proteína HSBP47.2 de *H. pylori* ATCC 43504, se utilizó la secuencia de nucleótidos obtenida del GenBank para el diseño de cebadores. Se realizaron estudios in silico de alineamiento del gen *hsbp47* con los genomas reportados en el GenBank para las cepas *H. pylori* 26695, J99, B8, B38, G27, HPAG1, P12, PeCan4, Shi470 y SJM180 mediante el software FastPCR versión 6.5.08 (Figura 9). Comparando las secuencias nucleotídicas de las 10 cepas, se observan 111 nucleótidos en los cuales no hay coincidencia entre ellas, siendo la mayoría correspondientes a mutaciones puntuales de 1 o 2 nucleótidos, incluyendo una delección del nucleótido 540 de la cepa HPAG1, lo que conlleva a un corrimiento en el marco de lectura y la modificación de aminoácidos codificados por este gen.

Como se mencionó antes, existen múltiples reportes de la variabilidad genética en *H. pylori* (Israel y col., 2001, Lara-Ramírez y col., 2011), en respuesta a la adaptabilidad e interacción del microorganismo con las células del hospedero.

Diseño de Iniciadores para la Amplificación del Gen *hsbp47*

De acuerdo con la amplificación realizada in silico con el programa FastPCR empleando distintos pares de cebadores, se eligió uno capaz de amplificar un producto PCR que incluye al marco de lectura completo del gen *hsbp47.2*, utilizando los genomas reportados.

Se determinó que los mejores iniciadores son: sentido 5'-CCCTTTATGGTAACTCTCTTTTTG (T_m de 54.4°C) y antisentido 5'-GGTAGCATTTAGGAATACTTAGG (T_m de 51.2°C). Éstos generan un fragmento de amplificación estimado de 1307pb.

La región donde se ubica el gen *hsbp47.2*, tiene un elevado contenido de %AT (~60%), lo que resultó en iniciadores con un contenido de %GC inferior al recomendado, sin embargo cumplen con el resto de los requisitos tales como longitud, similitud de temperaturas de fusión, extremo 3' terminal en guanina o citosina, ausencia de interacciones inter- e intra-iniciadores (Kalendar y col., 2014).

```

26695      TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
SJM180     TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACAGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
B8         TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
B38       TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
G27       TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
P12       TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
HPAG1     TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
PeCan4    TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
Shi470    TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCACCAACGGTCTACCGCCTTCACGAATCGC 60
J99       TTATTC AATAATATTGCTCACAACACCAGCGCCAACGGTCTCCCGCCTTCACGAATCGC 60
          *****1*****1**1**1**1*****

26695      AAATTTAGTTCCCAACTCTAACGCAACAGGGCTAATCAACTCTACAGTGATTTTCACATT 120
SJM180     AAATTTAGTTCCCAACTCTAACGCAACAGGGCTAATCAACTCTACAGTGATTTTCACATT 120
B8         AAATTTAGTTCCCAACTCTAACGCAACAGGGCTAATCAACTCTACAGTGATTTTCACATT 120
B38       AAATTTAGTTCCCAACTCTAACGCAACAGGGCTAATCAACTCTACAGTGATTTTCACATT 120
G27       AAATTTAGTTCCCAACTCTAACGCAACAGGGCTAATCAACTCTACAGTGATTTTCACATT 120
P12       AAATTTAGTTCCCAACTCTAACGCAACAGGGCTAATCAACTCTACAGTGATTTTCACATT 120
HPAG1     AAATTTAGTTCCCAACTCCATGCAACAGGGCTAATCAACTCTACGGTGATTTTAACATT 120
PeCan4    AAATTTAGTTCCCAATTCCAATGCAACAGGGCTAATCAACTCTACGGTGATTTTAACATT 120
Shi470    AAATTTAGTTCCCAATTCCAATGCAACAGGGCTAATCAACTCCACAGTGATTTTAACATT 120
J99       AAATTTAGTTCCCAACTCTAACGCAACAGGGCTAATCAACTCCACGGTGATTTTCACATT 120
          *****1*****1**1**1**1*****

26695      ATCGCCAGGCATAACCATTTCTACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
SJM180     ATCGCCAGGCATAACCATTTCTACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
B8         ATCGCCAGGCATAACCATTTCTACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
B38       ATCGCCAGGCATAACCATTTCTACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
G27       ATCGCCAGGCATAACCATTTCTACGCCTTCAGGAAGAGTGATAGATCCAGTCACATCAGT 180
P12       ATCGCCAGGCATAACCATTTCTACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
HPAG1     ATCGCCAGGCATAACCATTTCTACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
PeCan4    ATCGCCAGGCATAACCATTTCCACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
Shi470    ATCGCCAGGCATAACCATTTCCACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
J99       ATCGCCAGGCATAACCATCTCCACGCCTTCAGGAAGGGTGATAGAGCCAGTCACATCAGT 180
          *****1**1*****1*****1*****

26695      TGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
SJM180     TGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
B8         CGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
B38       CGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
G27       CGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
P12       TGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
HPAG1     CGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
PeCan4    GGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
Shi470    CGTGCGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
J99       CGTACGCACATAGAATTGCGGGCGGTAATTGGTGAAGAATGGAGTGTGTCTCCCGCCTTC 240
          2*1*****1**1*****1*****1**1*****

```

Figura 9. Alineamiento de los genes codificantes para EF-Tu, de 10 cepas de *H. pylori*. Se muestran en sombreado los nucleótidos distintos. La nomenclatura es: *, sin diferencias; 1, cambio en 1 base; 2, cambio de 2 bases; D, nucleótido faltante (delección).

Figura 9. Continuación.

```

26695      AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTCTGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
SJM180     AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTCCGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
B8         AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTCCGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
B38       AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTCTGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
G27       AACTGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTCTGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
P12       AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTTGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
HPAG1     A-CCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTCTGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 599
PeCan4    AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTATCCCTTTCTGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
Shi470    AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTATCCCTTTCTGGAGTAGGGATATAGGCATCCAC 600
J99       AACCGGCATCAAGAAAGTTTTTTCAGTGTCTCTTTCTGGAGTAGGGATATAGGAATCCAC 600
          *D*1*****1**1**1*****1**1*****11*****1*****
26695      TTCAGCCATAAGTTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTACCAGCCTTTGCTTC 660
SJM180     TTCAGCCATAAGTTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTACCAGCCTTTGCTTC 660
B8         TTCAGCCATAAGTTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTACCAGCCTTTGCTTC 660
B38       TTCAGCCATAAGTTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTACCAGCCTTTGCTTC 660
G27       TTCAGCCATAAGTTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTGCCAGCCTTTGCTTC 660
P12       TTCAGCCATGAGCTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTACCAGCCTTTGCTTT 660
HPAG1     TTCAGCCATGAGCTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTGCCAGCCTTTGCTTC 659
PeCan4    TTCAGCCATGAGCTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTGCCAGCCTTTGCTTC 660
Shi470    TTCAGCCATGAGCTTAAGCACTTTTTACCCCATTCACCCACATTGCCAGCCTTTGCTTC 660
J99       TTCAGCCATGAGTTTAAGCACTTTTTCGCCCCATTCACCCACATTGCCAGCCTTTGCTTC 660
          *****1**1**1*****1*****1*****1*****1*****
26695      TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTACGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
SJM180     TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTATGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
B8         TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTATGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
B38       TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTATAATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
G27       TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTATGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
P12       TTTTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTATAATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
HPAG1     TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTATGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 719
PeCan4    TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCTGCTACGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
Shi470    TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTACGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
J99       TTCTAAAGCTCTTAAAGCTGAACCCGCTACGATAGGAGTGCATCGCCAGGAAATTCATA 720
          **1*****1*****1*****1*****1*****1*****1*****
26695      CGCGCTCAACAATTCGCGCACTTCCATTTCTACAAGTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
SJM180     CGCACTCAACAATTCGCGCACTTCCATTTCCACAAGCTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
B8         CGCGCTCAACAATTCGCGCACTTCCATTTCCACAAGCTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
B38       CGCACTCAACAATTCGCGCACTTCCATTTCTACAAGTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
G27       CGCACTCAACAATTCGCGCACTTCCATTTCCACAAGTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
P12       CGCACTCAACAATTCACGCACTTCCATTTCCACAAGTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 779
HPAG1     CGCGCTCAACAATTCGCGTACTTCCATTTCTACAAGCTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
PeCan4    CGCGCTCAACAATTCGCGCACTTCCATTTCTACCAACTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
Shi470    CGCGCTCAACAATTCGCGCACTTCCATTTCTACCAACTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
J99       CGCGCTCAACAATTCGCGTACTTCCATTTCTACAAGTCTAACAATTCCTTGGTCACTAC 780
          ***1*****1**1**1*****1**1*11*****1*****
26695      CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
SJM180     CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
B8         CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
B38       CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
G27       CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
P12       CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
HPAG1     CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 839
PeCan4    CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGATAACAA 840
Shi470    CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACGATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
J99       CATGTCTTGTGTTGTTAAGAAAACAACAATGTGAGGCACGCCTACTTGACGAGACAATAA 840
          *****1*****1*****1*****1*****1*****1*****

```

Figura 9. Continuación.

| | | |
|--------|--|------|
| 26695 | GATATGCTCCCTAGTTTGGAGCATAGGGCCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| SJM180 | GATATGCTCCCTGGTTTGGAGCATAGGGCCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| B8 | GATATGCTCTCTGGTTTGGAGCATAGGGCCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| B38 | GATATGCTCTCTGGTTTGGAGCATAGGGCCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| G27 | GATATGCTCCCTGGTTTGGAGCATAGGGCCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| P12 | GATATGCTCTCTGGTTTGGAGCATAGGGCCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| HPAG1 | GATATGCTCTCTGGTTTGGAGCATAGGACCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 899 |
| PeCan4 | GATATGCTCCCTGGTTTGGAGCATAGGGCCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| Shi470 | GATATGCTCCCTAGTTTGGAGCATAGGACCATCAGCTGCAGAAACAACCAAAAATCGCTCC | 900 |
| J99 | GATATGCTCTCTGGTTTGGAGCATGGGGCCATCAGCCGCAGAAACAACCAAGATCGCTCC | 900 |
| | *****1**1*****1**1*****1*****1*****1*****1*****1***** | |
| 26695 | GTCCATTTGCGCCGACCCGGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| SJM180 | GTCCATCTGTGCCGACCCGGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCATGTCTGGGCAATC | 960 |
| B8 | GTCCATTTGCGCCGACCCGGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| B38 | GTCCATTTGCGCCGACCCGGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| G27 | GTCCATTTGCGCCGACCCGGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| P12 | GTCCATTTGCGCCGACCCGGTAATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| HPAG1 | GTCCATTTGCGCCGACCCGGTAATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 959 |
| PeCan4 | GTCCATTTGCGCCGACCCAGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| Shi470 | GTCCATTTGCGCCGACCCGGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| J99 | ATCCATTTGTGCCGACCCGGTGATCATGTTTTTACATAGTCAGCGTGTCTGGGCAATC | 960 |
| | 1*****1**1*****1**1*****1*****1*****1*****1*****1***** | |
| 26695 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| SJM180 | CACATGTGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| B8 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| B38 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| G27 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| P12 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| HPAG1 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1019 |
| PeCan4 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| Shi470 | CACATGCGCATAGTGCTGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| J99 | CACATGCGCATAGTGCTGGTTTTTCAGTCTCATATTTCAATGTGAGAAGTAGCGATAGTGAT | 1020 |
| | *****1*****1*****1*****1*****1*****1*****1*****1***** | |
| 26695 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| SJM180 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| B8 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| B38 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| G27 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| P12 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| HPAG1 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1079 |
| PeCan4 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| Shi470 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| J99 | CCCTCTTTCTTTTTCTTCAGGGGCGTTATCAATATTATCATAGTCTTTCATTTCTGCAAG | 1080 |
| | *****1*****1*****1*****1*****1*****1*****1*****1***** | |
| 26695 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| SJM180 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| B8 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| B38 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| G27 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| P12 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| HPAG1 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1139 |
| PeCan4 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| Shi470 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| J99 | ACCTTTCAAAGAAAGCACCGCTGAAATCGCTGCACTCAAAGTCGTTTTACCATGGTCTAC | 1140 |
| | *****1*****1*****1*****1*****1*****1*****1*****1***** | |

Figura 9. Continuación.

```
26695      ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTGTTAAACTTTTCTTTTGCCAT 1200
SJM180     ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1200
B8         ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1200
B38       ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTGTTAAACTTTTCTTTTGCCAT 1200
G27       ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1200
P12       ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1200
HPAG1     ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1199
PeCan4    ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1200
Shi470    ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1200
J99       ATGCCCAATGGTTCCAATATTAACATGCGGCTTAGTTCTATTAACCTTTTCTTTTGCCAT 1200
*****1*****1*****
```

CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia de la proteína de 47.2 KDa (HSBP47.2) en la cepa ATCC 43504, reportada en la cepa 25 de *H. pylori*.
- Se identificó la proteína HSBP47.2 en el GenBank, mediante las secuencias de aminoácidos de los péptidos internos (DFLREKGLSK y AAAMKPQVLD), obtenida de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*.
- Se identificó la secuencia de nucleótidos del gen *hsbp47.2* de *H. pylori* ATCC 43504.
- El gen *hsbp47.2* se encuentra en las 10 cepas de *H. pylori* reportadas en el GenBank, observándose polimorfismo en este gen.
- Se diseñaron cebadores sentido y antisentido degenerados para la amplificación del gen *hsbp47.2* de *H. pylori*.

PERSPECTIVAS

- El polimorfismo observado en los análisis in silico, corrobora la necesidad de efectuar estudios de clonación y expresión génica para evaluar el potencial de la proteína de superficie HSBP47.2 como posible candidato para la formulación de una vacuna contra este patógeno gastrointestinal humano.
- Determinar la efectividad de los iniciadores propuestos, en la amplificación experimental del segmento que contiene al gen *hsbp47*, en diversas cepas de *H. pylori*.
- Clonar y expresar la proteína recombinante, y evaluar su papel en el proceso de adhesión del microorganismo como posible alternativa en la formulación de una estrategia de inmunización para el tratamiento de infecciones gastrointestinales asociadas a *Helicobacter pylori*.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. 2002. Molecular Biology of the cell. Ediciones Omega. Barcelona.
- Ascencio F., Fransson L.-A., Wadström T. 1993 Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparin sulphate. *J. Med. Microbiol.* 38:240–244.
- Ascencio F., Hansson H.A., Larm O., Wadström T. 1995 *Helicobacter pylori* interacts with heparin and heparin-dependent growth factors. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12:265–272.
- Backert S., Clyne M., Tegtmeyer N. 2011. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Comm. Sign.* 9:28.
- Camacho-Arellano C.C. 2012. Evaluación del efecto de anticuerpos anti-HSBPpep sobre la adhesión de *Helicobacter pylori* a células HeLa. Tesis Profesional para la Obtención del Título Químico-Biólogo con Especialidad en Análisis Clínicos, Universidad de Sonora, México.
- Campa-Viramontes E.A., Rodríguez-Romero C.G. 2010. Determinación de la reactividad cruzada de anticuerpos generados en ratones contra HSBP, de diferentes cepas de *Helicobacter pylori*. Tesis Profesional para la Obtención del Título Químico-Biólogo con Especialidad en Análisis Clínicos, Universidad de Sonora, México.
- Crew K.D., Neugut A.I. 2006. Epidemiology of gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 12:354–362.
- Dallo S.F., Zhang B., Denno J., Hong S., Tsai A., Haskins W., Ye J.Y., Weitao T. 2012. Association of *Acinetobacter baumannii* EF-Tu with cell surface, Outer Membrane Vesicles, and Fibronectin. *Scientific World J.* 2012:128705. doi: 10.1100/2012/128705.
- Del Giudice G., Covacci A., Telford J.L., Montecucco C., Rappuoli R. 2001. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu. Rev. Immunol.* 19:523–563.

- Doidge C., Lee A., Buck F., Hazell S., Manne U., Gust I. 1994. Therapeutic immunisation against *Helicobacter* infection. *Am. J. Gastroenterol.* 89:A339.
- Duck W.M., Sobel J., Pruckler J.M., Song Q., Swerdlow D., Friedman C., y col. 2004. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. *Em. Infect. Dis.* 10:1088–1094.
- Dunne C., Dolan B., Clyne M. 2014. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World J. Gastroenterol.* 20(19): 5610–5624.
- Frevert U., Sinns P., Cerami C., Shreffler W., Takacs B., Nussenzweig V. 1993. Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J. Exp. Med.* 177:1287–1298.
- Goddard A.F., Logan R.P.H. 2003. Diagnostic methods for *Helicobacter pylori* detection and eradication. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56:273–283.
- Guzman-Murillo M.A., Ruiz-Bustos E., Ho B., Ascencio F. 2001. Involvement of the heparan sulphate-binding proteins of *Helicobacter pylori* in its adherence to HeLa S3 and Kato III cell lines. *J. Med. Microbiol.* 50:320–329.
- Israel D.A., Salama N., Krishna U., Rieger U.M., Atherton J.C., Falkow S., Peek R.P. 2001. *Helicobacter pylori* genetic diversity within the gastric niche of a single human host. *PNAS.* 98:14625–14630.
- Kabir S. 2007. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: A Review. *Helicobacter.* 12:89–102.
- Kalendar R., Lee D., Schulman A.H. 2014. FastPCR Software for PCR, In Silico PCR, and Oligonucleotide Assembly and Analysis. En: DNA Cloning and Assembly Methods, Methods in Molecular Biology, Svein Valla y Rahmi Lale Editores. 1116:271–302.
- Kato S., Fujimura S., Udagawa H., Shimizu T., Maisawa S., Ozawa K., Linuma K. 2002. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains in Japanese children. *J. Clin. Microbiol.* 40:649–653.

- Kozak K.C., Nickol L.A., Yi A. 1997. Detection of *H. pylori* antigen in stool specimens using a novel enzyme immunoassay, abstr.C-271, p. 161. Abstr. 97th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol.
- Kusters J.G., van Vliet A.H., Kuipers E.J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:449–490.
- Kwang H.R., Park J.S., Cho M.J. 2014. *Helicobacter pylori* bacterial strategy for incipient stage and persistent colonization in human gastric niches. *Yonsei Medical J.* 55(6):1453–1466.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680–685. doi:10.1038/227680a0.
- Lara-Ramírez E.E., Segura-Cabrera A., Guo X., Yu G., García-Pérez C.A., Rodríguez-Pérez M.A. 2011. New implications on genomic adaptation derived from the *Helicobacter pylori* genome comparison. *PLoS One.* 6:e17300.
- Ljungh A., Moran A.P., Wadström T. 1996. Interactions of bacterial adhesions with extracellular matrix and plasma proteins: pathogenesis implications and therapeutic possibilities. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 16:117–126.
- López-Bolaños C.C., Guzmán-Murillo M.A., Ruiz-Bustos E., Ascencio F. 2009. The role of heparan sulfate on adhesion of 47 and 51 kDa outer membrane proteins of *Helicobacter pylori* to gastric cancer cells. *Can. J. Microbiol.* 55:450–456.
- Love D.C., Esko J.D., Mosser D.M. 1993. A heparin binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. *J. Cell. Biol.* 123:759–766.
- Mégraud F., Lehours P. 2007 *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:280–322.
- Mobley H.L.T., Cortesia M.J., Rosenthal L.E., Jones B.D. 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 26:831–836.

- Nishiyama K., Ochiai A., Tsubokawa D., Ishihara K., Yamamoto Y., Mukai T. 2013. Identification and characterization of sulfated carbohydrate-binding protein from *Lactobacillus reuteri*. *PLoS One*. 8(12):e83703. doi: 10.1371/journal.pone.0083703.
- Noel G.J., Love D.C., Mosser D.M. 1994. High-molecular-weight proteins of nontypeable *Haemophilus influenzae* mediate bacterial adhesion to cellular proteoglycans. *Infect. Immun.* 62:4028–4033.
- Porras C., Nodora J., Sexton R., Ferreccio C., Jimenez S., Dominguez R.L., Cook P., Anderson G., Morgan D.R., Baker L.H., Greenberg E.R., Herrero R. 2013. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). *Cancer Causes Control*. 24(2):209–215. doi: 10.1007/s10552-012-0117-5.
- Ruiz-Bustos E., Ochoa J.L., Wadström T., Ascencio F. 2001. Isolation and characterization of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparin sulphate proteoglycan. *J. Med. Microbiol.* 50:215–222.
- Ruiz-Bustos E., Sierra-Beltrán A., Romero M.J., Rodríguez-Jaramillo C., Ascencio F. 2000. Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunisation with *H. pylori* heparan sulphate- binding proteins coupled to cholerae toxin β - subunit. *J. Med. Microbiol.* 49:535–541.
- Ryberg A., Borch K., Sun Y., Monstein H. 2008. Concurrent genotyping of *Helicobacter pylori* virulence genes and human cytokine SNP sites using whole genome amplified DNA derived from minute amounts of gastric biopsy specimen DNA. *BMC Microbiology*. 8:175. doi: 10.1186/1471-2180-8-175.
- Schevchenko A., Tomas H., Havlis J., Olsen J.V., Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* 1:2856–2860.
- Shao S.H., Wang H., Chai S.G., Liu L.M. 2005. Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. *World J. Gastroenterol.* 11:3011–3013.

- Tolia V.B., Brown W., El-Baba M., Lin C.H. 2000. *Helicobacter pylori* culture and antimicrobial susceptibility from pediatric patients in Michigan. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19:1167–1171.
- Torres J., Camorlinga-Ponce M., Pérez-Pérez G., Madrazo-De la Garza A., Dehesa M., González-Valencia G., Muñoz O. 2001. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 39:2677–2680.
- Torres J., Lopez L., Lazcano E., Camorlinga M., Flores L., Muñoz O. 2005. Trends in *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14:1874–1877.
- Tovar G.V., Hernandez G.C., Barquera S., Rodríguez S.N., López C.L. 2001. Epidemiologic panorama of stomach cancer mortality in Mexico. *Arch. Med. Res.* 32:312–317.
- Utt M., Wadström T. 1997. Identification of heparin sulfate binding surface proteins of *Helicobacter pylori*: inhibition of heparin sulfate binding with sulphated carbohydrate polymers. *J. Med. Microbiol.* 46:541–546.
- Vega-Montoya Y.V. 2010. Comparación electroforética de proteínas de superficie de *Helicobacter pylori*, con afinidad a sulfato de heparina (HSBP). Tesis Profesional para la Obtención del Título Químico-Biólogo con Especialidad en Análisis Clínicos, Universidad de Sonora, México.
- Viale M.N., Echeverria-Valencia G., Romasanta P., Mon M.L., Fernandez M., Malchiodi E., Romano M.I., Gioffré A.K., Santangelo M.L. 2014. Description of a novel adhesin of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Biomed. Res. Int.* 2014:729618. doi: 10.1155/2014/729618.
- Walz A., Odenbreit S., Mahdavi J., Borén T., Ruhl S. 2005. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology.* 15:700–708.

- Wen S., Velin D., Felley C.P., Du L., Michetti P., Pan-Hammarström Q. 2007. Expression of *Helicobacter pylori* virulence factors and associated expression profiles of inflammatory genes in the human gastric mucosa. *Infect. Immun.* 75:5118–5126.
- Wu W., Yang Y., Sun G. 2012. Recent insights into antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* eradication. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012:723183. doi: 10.1155/2012/723183.
- Yamaoka Y. 2012. Pathogenesis of *Helicobacter pylori*-related gastroduodenal diseases from molecular epidemiological studies. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012:371503. doi: 10.1155/2012/371503.