

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE UNA VACUNA ORAL CONTRA *Helicobacter pylori* BASADA  
EN LA EXPRESIÓN DE UN ANTÍGENO MULTI-EPÍTOPO  
EN *Lactococcus lactis* RECOMBINANTE.

Por

M.C. VÍCTOR HUGO URRUTIA BACA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

con Orientación en Inmunobiología.

Abril, 2019

DESARROLLO DE UNA VACUNA ORAL CONTRA *Helicobacter pylori* BASADA  
EN LA EXPRESIÓN DE UN ANTÍGENO MULTI-EPÍTOPO  
EN *Lactococcus lactis* RECOMBINANTE.

**Comité de Tesis**

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores  
Director de tesis

---

Dra. Patricia Tamez Guerra  
Secretario

---

Dr. Edgar Mendoza Gamboa  
Vocal

---

Dr. Moisés Franco Molina  
Vocal

---

Dr. Pablo Zapata Benavidez  
Vocal

---

Dra. Myriam Angélica De la Garza Ramos  
Director Externo

DESARROLLO DE UNA VACUNA ORAL CONTRA *Helicobacter pylori* BASADA  
EN LA EXPRESIÓN DE UN ANTÍGENO MULTI-EPÍTOPO  
EN *Lactococcus lactis* RECOMBINANTE.

Comité de Tesis

---

Dr. Ricardo Alberto Gómez Flores  
Director

---

Dra. Myriam Angélica De la Garza Ramos  
Director Externo

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Ciencias Biológicas, donde me he formado y donde he recibido apoyo.

A mi director de tesis Dr. Ricardo Gómez Flores, directora externa Dra. Myriam Angélica De la Garza Ramos, Dra. Cristiana Rodríguez Padilla y miembros del comité de tesis por permitirme concluir con una etapa de mi vida, gracias por su apoyo, paciencia, orientación y disponibilidad que nos brindaron para la realización de esta investigación.

A la Unidad de Odontología Integral y Especialidades del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, CIDICS-UANL por permitir el uso de equipos y materiales.

A la Bio. Daniela Guadalupe Lucio Saucedo quien me ayudó a realizar diferentes experimentos importantes, me apoyó de manera personal y me alentó para que concluyera esta investigación.

## DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con mi más sincero amor.

A Dios, al forjador de mi camino, mi padre celestial, el que me dio la vida, el que me acompaña, me protege y siempre me levanta de mi continuo tropiezo, al creador de mis padres y de las personas que más amo. Gracias por regalarme una hermosa familia, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que fueron mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio, por haberme permitido llegar hasta este punto brindándome salud y fuerzas para seguir adelante ante cualquier adversidad y lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Norma del Socorro Baca Aguilar por creer en mí, por haberme apoyado en todo momento. Gracias madre por tu esfuerzo porque sin importar si llegases cansada de tu trabajo siempre tenías una sonrisa que ofrecer a tu familia. Gracias por tus consejos, tus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por amarme sobre todas las cosas.

A mi padre Victorino Urrutia Aguirre que antes de nacer ya estaba buscando maneras de ofrecerme lo mejor. Gracias padre por tus ejemplos de perseverancia y constancia, has trabajado duro para darme siempre lo mejor. La ayuda y el soporte que me has brindado han formado bases de gran importancia, ahora soy consciente de eso. Gracias padre por su paciencia, porque he logrado concluir con éxito un proyecto que en un principio parecía una tarea interminable y todo lo logré gracias a ustedes, esta tesis les pertenece y es solo una parte de todo lo que han hecho por mí. Los amo con todo mi corazón.

A mis hermano Norvin Urrutia, hermana Nekis Urrutia, por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento, gracias, las amo. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mi novia Daniela Lucio, en el camino encuentras personas que iluminan tu vida, que con su apoyo alcanzas de mejor manera tus metas, a través de sus consejos, de su amor, y paciencia. Muchas gracias por extender tu mano en momentos difíciles, por el amor brindado cada día, por ser mi fuente de motivación e inspiración para poder superarme cada día más. Te amo.

*Víctor Hugo Urrutia Baca*

## ÍNDICE

<u>CONTENIDO</u>	<u>PÁGINA</u>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Características microbiológicas de <i>H. pylori</i> .....	3
2.2 Proteínas de virulencia de <i>H. pylori</i> .....	4
2.3 Tratamiento contra la infección por <i>H.pylori</i> .....	11
2.4 Infección por <i>H. pylori</i> y el papel de la respuesta inmune.....	12
2.5 Vacunas contra <i>H. pylori</i> .....	18
2.6 Inmunización en modelo animal.....	19
2.7 Bacterias ácido lácticas como sistemas de expresión de antígenos para el desarrollo de vacunas.....	23
2.8 Herramientas de ingeniería genética utilizadas para la clonación de genes heterólogos en <i>Lactobacillus</i> spp.....	25
2.9 BAL como acarreadores de antígenos heterólogos bacterianos, parasitarios y virales.....	26
2.10 Rutas de administración.....	27
2.11 Cepas acarreadoras.....	27
2.12 BAL en modulación de la actividad del sistema inmune.....	29
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b> .....	30
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	33
<b>VII.RESULTADOS</b> .....	44
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	61
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	67
<b>X. PERSPECTIVAS</b> .....	68
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	69
<b>XII. RESUMEN BIOGRÁFICO</b> .....	83

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<u>CONTENIDO</u>	<u>PÁGINA</u>
<b>Tabla 1.</b> Evaluación de las proteínas seleccionadas de <i>H. pylori</i> .....	45
<b>Tabla 2.</b> Epítomos predichos potencialmente antigénicos por diferentes servidores.....	48
<b>Figura 1.</b> Análisis de conservación de proteínas seleccionadas.....	46
<b>Figura 2.</b> Análisis de conservación de proteínas seleccionadas.....	47
<b>Figura 3.</b> Conservación de los epítomos seleccionados entre las cepas de <i>H. pylori</i> .....	48
<b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático de la construcción del antígeno multi-epítomo.....	49
<b>Figura 5.</b> Predicción de la estructura secundaria de la vacuna por PSIPRED.....	49
<b>Figure 6.</b> El z-score de la estructura 3D sin refinar y refinada de la vacuna por ProSA-web....	50
<b>Figure 7.</b> Comparación del modelo inicial y refinado de la vacuna por el programa MOE.....	51
<b>Figura 8.</b> Validación del modelo 3D de la vacuna usando el gráfico de Ramachandran.....	51
<b>Figura 9.</b> Comparación del uso de codones individuales entre el host y las secuencias optimizadas.....	53
<b>Figura 10.</b> Esquema de la construcción de pET-VIC_VACCINE.....	53
<b>Figura 11.</b> Análisis de secuenciación automatizada de la construcción pET-VIC_VACCINE.	54
<b>Figura 12.</b> Análisis de secuenciación automatizada de la construcción pET-VIC_VACCINE.	54
<b>Figura 13.</b> Digestión enzimática con NcoI y XhoI del pET-VIC_VACCINE.....	55
<b>Figura 14.</b> Digestión enzimática con NcoI y XhoI de las clonas <i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ .....	56
<b>Figura 15.</b> Expresión del antígeno multi-epítomo en <i>E. coli</i> BL-21.....	56
<b>Figura 16.</b> Expresión del antígeno multi-epítomo en <i>E. coli</i> BL-21 en cuerpos de inclusión con Urea al 10 M.....	57
<b>Figura 17.</b> Expresión del antígeno multi-epítomo en <i>E. coli</i> BL-21 por <i>western blot</i> .....	57
<b>Figura 18.</b> Caracterización del plásmido PNZ8048:GFP obtenidos de <i>L. lactis</i> .....	58
<b>Figura 19.</b> Construcción del plásmido pNZ8048-VIC_VACCINE.....	58
<b>Figura 20.</b> Construcción del plásmido PNZ8048-VIC_VACCINE obtenidos de <i>E. coli</i> TOP10.....	59
<b>Figura 21.</b> SDS-PAGE de lisado completo de células de <i>L. lactis</i> NZ9000 para la expresión de la vacuna.....	59
<b>Figura 22.</b> Expresión del antígeno en <i>L. lactis</i> NZ9000 pNZ8048-vic_vaccine por <i>western blot</i> .....	60
<b>Figura 23.</b> Inmunoreactividad de la vacuna recombinante mediante ELISA indirecto.....	60

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
AI	Auto-inductores.
AMC	Ciclo de metilo activado
BHI	Infusión Cerebro Corazón
<i>babA</i>	Antígenos de Lewis B
COX-2	Ciclooxigenasa 2.
<i>cagA</i>	Gen A asociado a la citotoxina
<sup>13</sup> C-UBT	Prueba de aliento con urea marcada con C <sup>13</sup>
Ct	Ciclo umbral.
cagPAI	Isla de patogenicidad asociadas a genes <i>cagA</i>
DC50	Dosis citotóxica al 50%
DEPC	Dietilpirocarbonato
DPD	4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona
HpaA	Adhesina A de <i>Helicobacter pylori</i> .
IBP	Inhibidor de la bomba de protones.
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MIC	Concentración mínima inhibitoria.
MBC	Concentración mínima bactericida.
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
NAP	Proteína activadora de neutrófilos
OD	Densidad óptica
OipA	Proteína inflamatoria de membrana externa.
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
RT-qPCR	Retrotranscripción-reacción en cadena de polimerasa cuantitativa.
RPTP	Receptores tioproteínas tirosina-fosfatasa.
SHP-2	Proteína tirosina fosfatasa.
SCFAs	Ácidos grasos de cadenas cortas.
SabA	Adhesina de unión al ácido siálico
TGI	Tracto gastrointestinal
TBE	Tampón Tris-Boro-EDTA.
<i>vacA</i>	Citotoxina vacuolizante
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular



## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es un agente infeccioso que coloniza la mucosa gástrica de la mitad de la población mundial. Esta bacteria ha sido reconocida como carcinógeno perteneciente al grupo 1 por la OMS por su papel en el desarrollo de gastritis, úlceras pépticas y cáncer. Debido al aumento de la resistencia a los antibióticos utilizados en la terapia convencional anti-*H. pylori*, el desarrollo de una vacuna eficaz es una alternativa de gran interés, que sigue siendo un desafío. Por lo tanto, es necesario un diseño de vacuna racional, estratégico y eficiente contra *H. pylori* donde el uso de las herramientas bioinformáticas más actuales pueda ayudar a lograrlo. En este estudio, se empleó un enfoque de inmunoinformático para diseñar una nueva vacuna oral multi-epítipo contra *H. pylori*. Nuestra vacuna multi-epítipo contiene un adyuvante de mucosa con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), que se usa para mejorar la inmunogenicidad oral. CTB se fusionó con once epítopos predichos de proteínas de *H. pylori* relacionados a los mecanismos de patogenicidad (UreB<sub>170-189</sub>, VacA<sub>459-478</sub>, CagA<sub>1103-1122</sub>, GGT<sub>106-126</sub>, NapA<sub>30-44</sub> y OipA<sub>211-230</sub>) y colonización (HpaA<sub>33-52</sub>, FlaA<sub>487-506</sub>, FecA<sub>437-456</sub>, BabA<sub>129-149</sub> y SabA<sub>540-559</sub>) y el péptido CKS9 (CKSTHPLSC), que dirige la vacuna hacia las células epiteliales de micropliegue para mejorar su absorción intestinal. La vacuna está compuesta por 373 aminoácidos y la predicción de la estructura secundaria mostró que contiene un 35% de hélices alfa, un 14% de láminas beta y un 49% de otras estructuras (bobina aleatoria y giro beta). Nuestros resultados indicaron que la calidad y la estabilidad del modelo 3D refinado final se mejoraron notablemente con base a las predicciones Ramachandran. Se obtuvo una puntuación de antigenicidad de 0.5547. La predicción de alergenicidad, demostró que la vacuna no es alergénica. El peso molecular y el pI teórico de la proteína fueron 40.7 kDa y 9.36, respectivamente. La solubilidad en la sobreexpresión en *E. coli* fue de 0.821589. La vida media se estimó en 30 h en los reticulocitos de mamíferos, >20 h en levadura y >10 h en *E. coli*. La vacuna fue catalogada como estable con un índice de inestabilidad (II) de 32.58. Los valores de GRAVY e índice alifático fueron -0.485 y 67.77, respectivamente. Por otro lado, se introdujeron los sitios de restricción NcoI y HindIII para su clonación en pNZ8084 para formar una construcción plasmática de 4,566 bp, lo que se confirmó por PCR y secuenciación. Se observó una banda de un peso aproximado de ~40 kDa en SDS-Page y Western blot tras la inducción con 10 ng/mL de nisina durante 5 h a 37°C en condiciones anaerobias. Observamos una inmunoreactividad del 100% en pacientes infectados por *H. pylori* mediante ensayos *in vitro* por ELISA. Nuestro nuevo diseño de vacuna oral podría ser un buen candidato contra *H. pylori*. Sin embargo, para validar los efectos profilácticos y terapéuticos de nuestro diseño de vacuna oral, se requieren estudios inmunológicos *in vivo*.

## ABSTRACT

*Helicobacter pylori* is an infectious agent that colonizes the gastric mucosa of half the world population. This bacterium has been recognized as a carcinogen belonging to group 1 by the WHO for its role in the development of gastritis, peptic ulcers, and cancer. Due to the increased resistance to antibiotics used in conventional anti-*H. pylori* therapy, the development of an effective vaccine is an alternative of great interest, which remains a challenge. Therefore, a rational, strategic and efficient vaccine design against *H. pylori* is necessary where the use of the most current bioinformatics tools can help achieve this. In this study, an immunoinformatic approach was used to design a new multi-epitope oral vaccine against *H. pylori*. Our multi-epitope vaccine is composed of the cholera toxin B subunit (CTB) from *Vibrio cholerae* that is used as a mucosal adjuvant to improve oral immunogenicity. CTB was fused with eleven predicted epitopes of *H. pylori* proteins related to pathogenicity (UreB<sub>170-189</sub>, VacA<sub>459-478</sub>, CagA<sub>1103-1122</sub>, GGT<sub>106-126</sub>, NapA<sub>30-44</sub> and OipA<sub>211-230</sub>) and colonization (HpaA<sub>33-52</sub>, FlaA<sub>487-506</sub>, FecA<sub>437-456</sub>, BabA<sub>129-149</sub> and SabA<sub>540-559</sub>) mechanisms, and a CKS9 peptide (CKSTHPLSC), which directs the vaccine towards the micropliegue epithelial cells to improve its intestinal absorption. The vaccine is composed of 373 amino acids and the prediction of the secondary structure showed that it contains 35% alpha helices, 14% beta sheets and 49% other structures (random coil and beta rotation). Our results indicated that the quality and stability of the final refined 3D model were remarkably improved based on the Ramachandran predictions. An antigenicity score of 0.5547 was obtained. The prediction of allergenicity, showed that the vaccine is not allergenic. The molecular weight and the theoretical pI of the protein were 40.7 kDa and 9.36, respectively. The solubility in overexpression in *E. coli* was 0.821589. The half-life was estimated at 30 h in mammalian reticulocytes, > 20 h in yeast and > 10 h in *E. coli*. The vaccine was classified as stable with an instability index (II) of 32.58. The values of GRAVY and aliphatic index were -0.485 and 67.77, respectively. On the other hand, NcoI and HindIII restriction sites were introduced for cloning into pNZ8084 to form a plasmatic construct of 4,566 bp, which was confirmed by PCR and sequencing. A band with an approximate weight of ~ 40 kDa was observed in SDS-Page and Western blot after induction with 10 ng/mL nisin for 5 h at 37°C under anaerobic conditions. We observed a 100% immunoreactivity in patients infected with *H. pylori* by *in vitro* tests by ELISA. Our new oral vaccine design could be a good candidate against *H. pylori*. However, to validate the prophylactic and therapeutic effects of our oral vaccine design, immunological studies *in vivo* are required.

## I. INTRODUCCIÓN

*H. pylori* es una bacteria Gram-negativa en forma de espiral asociada con la presencia de inflamación de la mucosa gástrica (gastritis crónica), el desarrollo de úlcera péptica y linfomas gástricos no-Hodgkin y con otros desórdenes linfoproliferativos de tejido linfoide asociados a mucosa (MALT) (Dunn y cols., 1997). En países desarrollados, aproximadamente el 70% de la población adquiere la infección antes de los 10 años de edad y sus vías de transmisión son oral-oral o fecal-oral, aunque también por iatrogenia al momento de realizar endoscopia con un tubo contaminado de persona a persona. La alta incidencia de infección por *H. pylori* contribuye probablemente al hecho de que la mortalidad por cáncer gástrico ocupe el segundo lugar entre las muertes por cáncer en todo el mundo. Debido a la relación de causalidad entre *H. pylori* y tumores gástricos, en 1994 la *International Agency for Research on Cancer* y la Organización Mundial de la Salud reconocieron a *H. pylori* como un carcinogénico de categoría I en humanos. En la actualidad, *H. pylori* es la única bacteria que ha logrado esta peligrosa distinción (Dye y cols., 2002; Kim y cols., 2009). Entre las diferentes terapias para el tratamiento del *H. pylori* está la terapia triple estándar, constituida por un inhibidor de bomba de protones (IBP) y 2 de 3 antibióticos (amoxicilina o claritromicina o metronidazol/tinidazol), la terapia cuádruple con bismuto, triple con levofloxacino, terapia secuencial, terapia cuádruple sin bismuto. En la actualidad, la terapia triple estándar alcanza niveles inaceptables (menores del 80%) de erradicación del *H. pylori*, debido principalmente, al aumento de la resistencia a claritromicina, metronidazol y amoxicilina (Malfertheiner y cols., 2007).

En respuesta a lo anterior se han utilizado diversos enfoques para el desarrollo de vacunas con la finalidad de controlar y prevenir la infección por *H. pylori*, uno de ellos es el uso de antígenos recombinantes. Muchas proteínas relacionadas a la virulencia en este patógeno han sido evaluadas, incluyendo citotoxina A vacuolizante (VacA), Adhesina A de *H. pylori* (HpaA), Proteínas de membrana externa (OMP), proteína A activadora de Neutrófilos (NapA), Gen A asociado a la citotoxina (CagA) y la subunidad B de la Ureasa (UreB), siendo esta última la más reportada por su alta capacidad antigénica y ser una proteína clave en la colonización (Czinn y Blanchard, 2011).

Numerosos estudios de vacunación en modelo animal han demostrado que la inmunización con diferentes antígenos o combinaciones confieren cierta inmunidad protectora contra esta bacteria, dando lugar a una reducción significativa de la carga bacteriana, sin embargo, el establecimiento de una respuesta inmunológica que permita la erradicación y protección de la infección en mucosa gástrica continúa siendo un reto, para esto, la identificación de nuevos antígenos que puedan inducir una respuesta inmunológica efectiva es un paso fundamental (Baele y cols., 2009; Nyström y Svennerholm, 2007). La vacunología inversa emplea herramientas bioinformáticas con modelos predictivos para la identificación *in silico* de secuencias peptídicas inmunogénicas en base a la afinidad que pudieran tener con los alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Shanmugham y Pan, 2013; Kanampalliar y cols., 2013). Este enfoque brinda otra alternativa en el diseño de vacunas, que pudiera ser empleado contra *H. pylori*.

Hasta la fecha, la mayoría de vacunas aprobadas se administran por vía parenteral y sólo producen una respuesta inmune sistémica. De hecho, la liberación antigénica a través de mucosas es la única ruta de vacunación que induce una respuesta inmune sistémica y en mucosas (Azizi y cols., 2010). La inmunización oral es un método conveniente, no invasivo, de fácil administración, en comparación con los métodos tradicionales. Sin embargo, para el desarrollo de una vacuna oral se requiere de un sistema que evite la degradación antigénica provocada por la acidez y enzimas proteolíticas presentes en el tracto gastrointestinal (TGI), además, que favorezca la captación y procesamiento por las células de micropliegues (células M) y/o células dendríticas intestinales (DCs). El uso de bacterias ácido lácticas (BAL) como sistema de liberación antigénica ha demostrado ser eficiente para la expresión de proteínas y/o péptidos de patógenos bacterianos en el desarrollo de vacunas profilácticas, además las BAL poseen propiedades fundamentales como supervivencia por su paso en el TGI, estimulación de un respuesta inmunológica específica y reducción de efectos adversos (Tarahomjoo y cols., 2012). En este trabajo se diseñó y se produjo un *Lactococcus lactis* recombinante que expresa un antígeno multi-epítipo de *H. pylori* como prototipo de vacuna.

## II. ANTECEDENTES

Después que *H. pylori* fue identificado por Marshall y Warren en Australia, este microorganismo se ha encontrado en diferentes partes del mundo en al menos 50% de la población mundial, predominantemente en América Latina. Es el más implicado en la patogénesis de un gran espectro de enfermedades tales como gastritis aguda y crónica, úlceras gástricas y duodenales, carcinoma gástrico y linfoma.

### 2.1 Características microbiológicas de *H. pylori*.

*H. pylori* es una bacteria Gram-negativa que mide de 2-4  $\mu\text{m}$  de largo y de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$  de ancho, aunque usualmente tiene forma espiral, también puede aparecer en forma bacilar o cocoide, tiene de 2-6 flagelos unipolares de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  de largo, estos le confieren movilidad permitiéndole desplazarse rápidamente en soluciones viscosas. Su envoltura celular es similar a la de otras bacterias Gram-negativas, consta de una membrana interna citoplasmática, periplasma, peptidoglicano y una membrana externa; esta última está constituida por fosfolípidos y por lipopolisacáridos (LPS). El LPS usualmente está compuesto por lípido A, un núcleo de oligosacáridos y una cadena de antígeno O; el lípido A de *H. pylori* tiene poca actividad biológica comparada con el de otras bacterias, por otra parte, el antígeno O puede ser fucosilado y mimetizarse con antígenos del grupo sanguíneo Lewis y así evadir la respuesta inmune del huésped, ya que usualmente este antígeno es reconocido por la proteína D surfactante y al fucosilarse, no habría reconocimiento del mismo. Además, es catalasa y oxidasa positiva, se caracteriza por su potente actividad ureasa, fermenta la glucosa y otros hidratos de carbono como el fumarato para generar ATP o energía metabólica (Hernández y cols., 1994; Mendz y cols., 1993).

Para el cultivo, las muestras se obtienen a partir de biopsias de mucosa del TGI; el tiempo que tarda en formar colonias es de 4 a 7 días en condiciones de 5-10%  $\text{O}_2$ , 5-10%  $\text{CO}_2$ , 80-90%  $\text{N}_2$ , humedad de 95% y temperatura de 35 a 37°C. Usualmente se cultiva en medios complejos con sangre, suero y antibióticos (Blanchard y Nedrud, 2012).

## **2.2 Proteínas de virulencia de *H. pylori*.**

*H. pylori* posee factores de virulencia que ayudan a la colonización del epitelio superficial, la profundidad de las criptas y el espacio entre las células epiteliales.

### **Ureasa.**

La ureasa es la enzima más abundante producida por *H. pylori* y su actividad depende del pH alrededor de la bacteria. El hábitat natural de *H. pylori* se encuentra por debajo de la capa mucosa, donde el pH se aproxima a la neutralidad (Bauerfeind, 1997). El mecanismo que utiliza para protegerse de ese pH ácido durante la colonización o de las bajadas de pH que pueden ocurrir por daños mecánicos en la mucosa, se basa en acumular una gran cantidad de ureasa en el citoplasma, en el espacio periplásmico y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido aumenta el pH, elevándolo hasta 6 o 7 en su entorno. De este modo puede alcanzar la superficie de las células de la mucosa, donde el pH es prácticamente neutro. La ureasa se regula puesto que un aumento excesivo de la alcalinidad debida al  $\text{NH}_4^+$  producido mataría a la bacteria. La regulación se produce mediante un transportador dependiente de pH. El transportador UreI permite la entrada de urea pero una vez que el pH alcanza el valor de 6-7, se inactiva. El  $\text{NH}_4^+$  liberado va a producir una serie de daños que afectan a la microcirculación y a las células epiteliales superficiales. Origina una necrotización del tejido profundo; colabora en el desarrollo de gastritis atrófica crónica humana y facilita el incremento de infecciones virales y la carcinogénesis.

### **Sistemas antioxidantes.**

*H. pylori* es una bacteria microaerófila vulnerable a la toxicidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Durante el proceso de colonización *H. pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, que generan una cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno. *H. pylori* cuenta con mecanismos para la detoxificación de estos metabolitos, así como para la reparación de los daños sufridos que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado. Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los metabolitos reactivos del oxígeno están la enzima superóxido dismutasa, que cataliza la transformación del superóxido en peróxido de hidrógeno; la catalasa o peroxidasa, que

cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno; las peroxirredoxinas, que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, peroxinitrito y otros hidroperóxidos orgánicos a sus correspondientes alcoholes y la flavoproteína MdaB, una NADPH quinona reductasa, que *H. pylori* expresa cuando debe compensar la pérdida de los principales componentes antioxidantes. Además, el sistema tiorredoxina cataliza los procesos de oxidación-reducción, tiol dependientes, de un gran número de enzimas detoxificadoras. La actividad enzimática de la catalasa, superóxido dismutasa y las peroxirredoxinas está incrementada en las cepas *cagA* positivas. La proteína NAP (Proteína activadora de neutrófilos), codificada por el gen *napA*, fue identificada primeramente como una proteína que participa en la activación de los neutrófilos. Tiene función de bacterioferritina para captar los iones ferrosos libres intracelulares que pueden dañar el DNA de *H. pylori* y lo protege del estrés oxidativo. Puede actuar como adhesina cuando se secreta o se expresa en la superficie bacteriana pues tiene afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares y por el grupo antigénico sanguíneo de Lewis (Long, 2009).

### **Flagelos.**

La gran movilidad de estas bacterias es fundamental para colonizar la mucosa gástrica, según se ha deducido de la infección experimental de animales con variantes de *H. pylori* aflageladas y por tanto no móviles. *H. pylori* posee alrededor de 2 a 6 flagelos monopolares, característica inusual que es distinta del resto de proteínas flagelares, las cuales son homo poliméricas. Cada flagelo está compuesto por dos flagelinas, FlaA y FlaB. FlaB se localiza en la base del flagelo, mientras que la más abundante FlaA, se encuentra en el exterior. La eliminación de ambas flagelinas da como resultado la pérdida de la movilidad, que sin embargo conservan una capacidad de adherencia similar a la de tipo silvestre. Además la morfología espiral o helicoidal facilita la movilidad en la viscosidad del moco gástrico, y la bacteria produce una proteasa que digiere el moco facilitando su avance.

### **Adhesinas.**

*H. pylori* se une a las células receptoras del huésped, estas son células epiteliales gástricas, a las que se une de una forma específica mediante un elevado número de

adhesinas utilizando múltiples receptores. Entre ellos hay glicerofosfolípidos, sulfátidos, componentes de la matriz extracelular y secuencias repetidas de N-acetil-lactosamina o de glicoconjugados. Una sola clase de anticuerpos no inhibe por completo la adhesión de la bacteria a las células, por lo que se considera que la adherencia de *H. pylori* se realiza a través de múltiples adhesinas y receptores al mismo tiempo (Beswick, 2006).

### **HpaA (Adhesina A de *Helicobacter pylori*).**

La proteína HpaA es una de las principales proteínas de la membrana externa de *H. pylori* y, al igual que muchas de ellas actúa como adhesina. HpaA media la unión a glicoconjugados con ácido siálico (N-acetil-neuraminil-lactosa) presentes en la superficie de las células epiteliales gástricas y en la de los neutrófilos. Está codificada por el gen *hpaA*. Es un antígeno de membrana que es reconocido por los anticuerpos humanos por lo que puede ser usado en los ensayos serológicos y para las vacunas. Se ha visto que es reconocida por las células presentadoras de antígeno humanas estimulando la proliferación de los linfocitos T y B (Nvström, 2007).

### **BabA (antígeno de Lewis B).**

Los antígenos de Lewis son antígenos fucosilados de grupo sanguíneo (Wirth, 1999). Son expresados, además de por los eritrocitos, por células epiteliales humanas. *H. pylori* se une con la adhesina BabA a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis (Wirth y cols., 2006). Esta codificada por los genes *babA1* y *babA2*, aunque solo el gen *babA2* es funcionalmente activo. La síntesis de BabA puede ser regulada para adaptarse a las condiciones medioambientales. Se ha comprobado cómo la unión de *H. pylori* al receptor gástrico de Lewis promueve una respuesta inmune no específica y el desarrollo de autoanticuerpos frente a las células productoras de ácido, lo que contribuye a la gastritis crónica y a la pérdida de células parietales. Además, la adherencia mediada por BabA participa en la distribución de los factores de virulencia que dañan al tejido del hospedador, pudiendo llevar al desarrollo de úlcera y cáncer gástrico (Olfat, 2005).



### **SabA (Adhesina de unión a ácido siálico).**

Se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y origina la activación de su respuesta oxidativa (Unemo, 2005).

### **OipA (proteína inflamatoria de la membrana externa).**

Todas las cepas poseen el gen que codifica para esta adhesina, pero sólo algunas la expresan. Su expresión está asociada a una mayor producción de IL-8, aunque no se sabe cuál es su contribución real a la inflamación gástrica puesto que suele estar asociada a las cepas *cagA* + (Yamaoka, 2008).

### **VacA (Citotoxina vacuolizante).**

La proteína VacA es una toxina codificada por el gen *vacA*, que induce vacuolización en las células epiteliales, la muerte celular y la destrucción de la integridad epitelial. Posee una estructura hexamérica y se ensambla en la bicapa lipídica celular del hospedador formando un canal selectivo de aniones. Produce un gradiente de pH que atrae sustancias alcalinas al interior haciendo que se capte agua por ósmosis, lo que origina una vacuolización alrededor del núcleo y más tarde el estallido y muerte celular. En el citosol interfiere con el tráfico vesicular de los lisosomas. Es producida por aproximadamente el 50% de las cepas de *H. pylori*. La infección por cepas que producen la toxina es más frecuente en pacientes con úlcera peptídica y cáncer gástrico que en pacientes que sólo padecen gastritis (Yamazadi, 2005). Otros estudios no encuentran esta relación, y una posible explicación es que el gen *vacA* tiene una estructura mosaico con varias formas posibles de presentación. Cuatro en la secuencia señal, que son *s1a*, *s1b*, *s1c* y *s2* y tres en la región media, *m1*, *m2a* y *m2b*. De la combinación de éstos podrían generarse distintos genotipos que podrían tener comportamientos más o menos agresivos (Yang, 1998). Así las cepas *s1/m1* son más citotóxicas que las *s1/m2*. VacA se une a receptores tioproteínas tirosin-fosfatasa (RPTP) y la glicosidación post-traducciona de los dominios RPTP pueden implicar diferentes respuestas celulares a las cepas *m1* o *m2*. Recientemente ha sido descrita una nueva región en el gen *vacA* que es la región intermedia (Rhead, 2007). Tiene varias posibles formas de presentación, *i1* e *i2*. Las cepas con la presentación *i1* son más citotóxicas y se encuentran más asociadas

con la estructura alélica s1m1. Mientras que las cepas i2 se encuentran más relacionadas con las cepas con la combinación alélica s2 m2 y que suelen presentar un mejor pronóstico.

VacA puede llevar a la muerte programada, de forma independiente a la vacuolización, pues induce la liberación de citocromo C de las mitocondrias a través de la activación de proteínas proapoptóticas Bax y Bak. También puede participar en el proceso de la apoptosis a través de la activación del receptor Fas/CD95, a través de diversas caspasas y de la ruptura de la membrana mitocondrial que, al afectar a la concentración de ATP celular, altera el ciclo celular.

La presencia de VacA puede inducir la expresión de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos. El VEGF está implicado en la neoangiogénesis vía el sistema TLR2/TLR9 y se encuentra sobre expresado en distinto grado en carcinomas humanos dependiendo del tipo de cepa bacteriana, lo que podría explicar en parte el distinto potencial patogénico. Además, VacA amplifica la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica aumentando la expresión de ciclooxygenasa 2, en las células T, neutrófilos y macrófagos, que a su vez pueden activar la producción del factor de crecimiento vascular endotelial y provocar el desarrollo de procesos tumorigénicos. Aunque no están perfectamente definidos los mecanismos por los que la respuesta inmune inducida por *H. pylori* contribuye a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de COX-2 y VEGF, la activación de NF-κB y el aumento de citocinas proinflamatorias originan alteraciones morfológicas que llevan al desarrollo de gastritis atróficas y metaplasia gastrointestinal (Rudnicka, 2004). También está implicada en la alteración de las funciones mediadas por integrinas al interactuar con la fibronectina y la modulación de la respuesta inmunitaria de granulocitos, monocitos y células B y T, ya que inhibe la presentación de antígenos y la proliferación de células T. Por otro lado interrumpe la maduración de los fagosomas en los macrófagos, por lo que la bacteria sobrevive dentro de los mismos (Atherton, 1997).

### **CagA (Gen A asociado a la citotoxina).**

La presencia del gen *cagA* se asocia más con síntomas graves, como la gastritis severa, la atrofia de la mucosa, alto riesgo de úlcera y cáncer gástrico (Chromvarin, 2008). De

hecho las cepas procedentes de pacientes con úlcera, son *cagA* positivas en un porcentaje mayor que las cepas procedentes de pacientes con gastritis (Erzin, 2006; Chiarini, 2009). Pero, igual que ocurre con el resto de factores de virulencia, en muchas ocasiones no hay asociación entre el genotipo de *cagA* y el estado clínico. Forma parte de la isla de patogenicidad Cag (*cagPAI*). Las islas de patogenicidad son segmentos de DNA que contienen más de un gen de virulencia con la peculiaridad de que una simple delección lleva a la pérdida de al menos dos genes de virulencia con segmentos de DNA de más de 30 Kb. Tienen un papel fundamental en la contribución a la virulencia de las bacterias patógenas que los contienen y en el desarrollo de la enfermedad. En el caso de la isla de patogenicidad de *H. pylori* (*CagPAI*), tiene un tamaño de 37 a 40 Kb y está flanqueada por secuencias repetidas directas (*direct repeats*) de 31 pb. Su contenido G + C es del 35% en contraste con el 39% del cuerpo del genoma. Como muchos genes de virulencia los genes de la *cagPAI* no se expresan constitutivamente, sino que responden a señales ambientales. Están reguladas por complejos mecanismos que pueden activarse o no dependiendo de condiciones microambientales como el nivel de oxígeno, la osmolaridad, la fase de crecimiento bacteriano, el pH, presencia o no de ácidos grasos volátiles de cadena corta, etc (Blaser, 1995).

La *cagPAI H. pylori* codifica un sistema de secreción de proteínas tipo IV que inyecta *CagA* y peptidoglicanos en las células epiteliales del hospedador. La translocación de *cagA* depende de la presencia de un canal de urea protón dependiente *UreI*. Ante un descenso de pH, *cagA* se mueve del centro a la porción periférica del citoplasma. La proteína inyectada interactúa con un número elevado de moléculas de la célula hospedadora. La diana molecular de *CagA* más estudiada es una fosfatasa SHP-2 (Tirosofosfatasa). En el gen que codifica esta proteína se han encontrado mutaciones y polimorfismos que están relacionadas con la carcinogénesis gástrica. La propia activación de SHP-2 por *CagA* puede contribuir a la proliferación celular excesiva. Además, los cambios que se producen en la expresión génica en las células epiteliales tras la infección por *H. pylori* suelen ser dependientes de este sistema de secreción codificado por la *cagPAI*.

CagA puede variar de tamaño entre las distintas cepas de *H. pylori*. Esta variación proviene de la presencia de un número de repeticiones de una secuencia aminoacídica del extremo carboxilo-terminal y puede influir en la patogenicidad de las distintas cepas *cagA*<sup>+</sup> debido a que la variación en el número de sitios de fosforilación implica una distinta efectividad en su unión a SHP-2, y por tanto una distinta activación. La secuencia aminoacídica que se repite es GLU-PRO-ILE-TYRALA denominada “EPIYA motif”. De acuerdo con la secuencia de aminoácidos que flanquea esta secuencia de GLU-PRO-ILE-TYR-ALA, los EPIYA reciben diferente nomenclatura: EPIYA-A, EPIYA-B, EPIYA-C y EPIYA-D. Hay estudios en los que se encuentra que la proteína CagA que contiene EPIYA-A y EPIYA-B, seguidas por repeticiones de EPIYA-C es más frecuente en cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes occidentales, mientras que el EPIYA-D lo es en cepas aisladas en pacientes asiáticos (Panayotopoulou, 2006).

Hay una correlación entre la integridad de *cagPAI* y la gravedad de la enfermedad, ya que mutaciones puntuales llevan a la pérdida del sistema de secreción tipo IV por lo que no se puede translocar la proteína CagA. La proteína CagA translocada aumenta la producción de IL-8. Así mismo, los productos de la *cagPAI* están asociados con un aumento de la producción de otras citocinas como la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y del factor nuclear de transcripción NF- $\kappa$ B. Varios estudios han revelado que el *cagPAI* puede presentarse como una única unidad no interrumpida, separándose en dos regiones por una secuencia o un fragmento cromosómico o bien presentarse parcialmente deletado. También se ha visto que la variabilidad de los motivos EPIYA juega un papel importante en la patogénesis producida por *H. pylori*. Las cepas *cagA* positivas y con número elevado de motivos EPIYA han sido relacionadas con un aumento de gastritis crónica y atrofia (Doyle, 2001).

La detección del estado *cagA* se puede realizar de forma directa mediante la realización de una PCR al DNA de la cepa a estudiar o de forma indirecta, mediante serología. Mediante la PCR se puede detectar el gen *cagA*, que es un marcador de la isla de patogenicidad (Cerezo, 2006). La mayoría de estudios moleculares han determinado el estatus *cagA* mediante la presencia o ausencia con primers específicos o sondas para este gen. Así pues, en realidad, la identificación de cepas *cagA* negativas se ha realizado de

forma indirecta (la ausencia de amplificación) (Sicinschi, 2003). Esto tiene el riesgo de que se produzcan falsos negativos. Además las cepas *cagA* negativas no se detectarían en caso de que existan infecciones mixtas. Por esto se han desarrollado detecciones directas para identificar las cepas de *H.pylori* que poseen la *cagPAI*. En las cepas *cagA* positivas, la *cagPAI* está flanqueada por dos secuencias de 31 bp. Sin embargo en las cepas *cagA* negativas esta misma secuencia sólo se encuentra presente en una copia. Usando primers de los sitios de inserción que flanquean la *cagPAI* se amplificará un fragmento de las cepas que no poseen la isla de patogenicidad.

### **2.3 Tratamiento contra la infección por *H. pylori*.**

En cualquier tratamiento contra un microorganismo debe tenerse en cuenta que el éxito debe alcanzar una tasa de eliminación de por lo menos 90% en un análisis por protocolo y 80% en uno de intento de tratamiento. En el caso del *H. pylori* no debe ser la excepción si bien, algunos factores como la dificultad para cultivar la bacteria, los pocos antibióticos que han demostrado efectividad contra ella, la aparición de resistencia y el apego al esquema de tratamiento lo vuelven un escenario particular.

El tratamiento con un solo antibiótico no ha mostrado eficacia clínica por lo que no debe tenerse como una opción de tratamiento. Actualmente todos los esquemas utilizan la combinación de dos antibióticos asociados a un IBP a doble dosis durante periodos variables dependiendo de la región geográfica y la prevalencia. Los esquemas de primera línea pueden ser triples o cuádruples (cuando se agrega una sal de bismuto). Basado en las tasas de éxito alcanzadas en prácticamente todas las regiones del mundo se recomienda el uso de 1 g de amoxicilina dos veces al día, 500 mg de claritromicina dos veces al día y dosis doble de un IBP durante 14 días. Se han propuesto esquemas cortos de 7 ó 10 días. Sin embargo, su utilidad no ha sido confirmada en México y su eficacia sólo ha sido demostrada en países europeos (Abdo-Francis, 2007).

En el caso de alergia a la amoxicilina, se puede emplear como alternativa tetraciclina (500 mg cuatro veces/día) o metronidazol (250 mg cuatro veces/día). Debido a la alta tasa de resistencia al metronidazol demostrada *in vitro*, en nuestro medio no se recomienda su uso de manera rutinaria. Las sales de bismuto, en forma de subsalicilato o subcitrato, deben administrarse en cuatro tomas al día y en dosis promedio de 525 mg.

La utilización de estos últimos medicamentos disminuye sustancialmente los costos, aunque favorecen la falta de apego por el tiempo de administración y el mayor número de efectos adversos.

En caso de falla terapéutica se recomienda emplear un esquema alternativo. Una de las principales causas de falla es la resistencia bacteriana, especialmente a la claritromicina. El aumentar la dosis de este antibiótico no ha demostrado mejores resultados. Pueden emplearse otros antibióticos como tetraciclina y metronidazol sin olvidar las particularidades ya descritas. En países donde la resistencia al metronidazol es elevada se recomienda como alternativa el tinidazol (1 g dos veces/día). Moayyedi y cols., informaron tener un 61% de éxito para erradicar al *H. pylori* utilizando tinidazol, claritromicina y omeprazol, aunque con un 45% de efectos adversos (Moayyedi y cols., 2000).

**Tratamiento de primera elección.** Se recomienda utilizar un triple esquema combinando un IBP a doble dosis con dos antibióticos por un periodo de 14 días. La combinación de antibióticos más eficaz sigue siendo claritromicina 500 mg dos veces al día y amoxicilina 1 g dos veces al día.

**Tratamientos de segunda elección.** Esquema cuádruple con un IBP a doble dosis, tinidazol 1 g dos veces al día, tetraciclina 500 mg cuatro veces al día y bismuto 525 mg cuatro veces al día por 14 días.

**Tratamiento secuencial.** Se inicia con IBP a doble dosis y amoxicilina 1 g dos veces al día durante 5 días, seguido por IBP a doble dosis más claritromicina y tinidazol a las dosis previamente descritas por 5 días más.

#### **2.4 Infección por *H. pylori* y el papel de la respuesta inmune.**

A pesar del reconocimiento y la investigación de *H. pylori* en las últimas tres décadas, el conocimiento de la respuesta inmune a esta bacteria es incompleto todavía. Las infecciones por *H. pylori* pueden ocurrir como resultado de la habilidad de las bacterias a persistir en ambientes agresivos, tales como el estómago humano. El proceso de invasión por lo general se facilitado por el daño a tejidos gástricos y la presencia de factores de virulencia bacterianos tales como flagelos y ureasa, que ayudan poco a poco

en el progreso y supervivencia en un nicho secreto recién descubierto (Vannella y cols., 2012).

La infección por *H. pylori* inicia una fuerte respuesta inmune, incluyendo respuestas innatas y adquiridas.

### **Respuesta innata.**

La colonización de la mucosa gástrica estimula los mecanismo de defensa innatos; Receptores tipo Tolls (TLR) discriminan entre los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), estimulando la expresión de factores pro-inflamatorios por las células epiteliales gástricas. Esta respuesta innata puede no solo resultar en gastritis sino también puede ser un mediador importante en la carcinogénesis gástrica.

TLR2, TLR4 y TLR5 han sido involucrado en el reconocimiento de *H. pylori* en el estómago, con factores bacterianos como CagA y NapA modulando la interacción de la bacteria con TLR y eventualmente conduciendo la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y secreción de citocinas inflamatorias. TLR2 es el principal receptor innato para el reconocimiento de la infección por *H. pylori* e inflamación resultante. TLR2 también es activado por la proteína choque térmico 60 de *H. pylori*. TLR4 (receptor para lipopolisacárido) y TLR5 (receptor para flagelina) también han sido implicados en la respuesta inmune innata contra *H. pylori*. Por otra parte, se ha informado de la asociación de la carcinogénesis gástrica con disminución en los niveles de inhibidores de TLR y el aumento de los niveles de TLR2 y TLR4, y la activación crónica de TLR se ha asociado con procesos tumorigénicos. Es interesante notar que los polimorfismos de esos TLRs han sido asociados con el desarrollo de carcinoma gástrico. Sin embargo, estos polimorfismos no influyen el riesgo a cáncer en la población caucásica (Dharmani y cols., 2008; Algood y Cover., 2006).

Además, *H. pylori* activa las respuestas de NOD1, los cuales son dependientes de la isla de patogenicidad *cag* y su habilidad para liberar el peptidoglicano bacteriano a través del sistema de secreción tipo IV (T4SS). La activación de estos receptores innatos conduce a la activación de NF- $\kappa$ B, caspasas, y las vías de interferón que resultan en la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), y IFN- $\beta$ . Estas citocinas atraen mediadores inflamatorios agudos tales como neutrófilos, así como los linfocitos, lo que lleva a la

activación de la respuesta inmune adaptativa, a nivel tanto en células B como en células T después de la infección (Boughan y cols., 2006; Smith y cols., 2003).

### **Respuesta adaptativa.**

Aunque hay una robusta respuesta humoral tanto local como sistémica; y una respuesta celular a la infección por *H. pylori*, estas respuestas inmunes adquiridas pueden ser inadecuadas para eliminar la bacteria, resultando en una infección de por vida cuando no es tratada. Estas respuestas en realidad pudieran contribuir a los procesos patológicos gastrointestinales, creando un microambiente que puede facilitar la transformación celular. *H. pylori* persiste a pesar de la activación inmune, ya que reduce el reconocimiento por el sistema inmune mediante la generación de diversidad a través de mutaciones puntuales y recombinación. La infección por *H. pylori* induce efectores innatos y una mezcla compleja de respuestas inmune adaptativas Th1, Th17 y T reguladoras. La respuesta Th1 conduce una inflamación que si se prolonga, se traduce en secuelas patológica. Por otro lado, los datos experimentales muestran que la respuesta Th2 por sí solo no garantiza la protección, y para una respuesta protectora equilibrada, la coordinación entre dos tipos de células es necesaria (Chmiela y Michetti., 2006).

En la respuesta humoral, los individuos infectados con *H. pylori* tienen altos títulos de anticuerpos específicos IgA, IgG e IgM, son considerados importantes marcadores de infección. Sin embargo, el rol de esta respuesta humoral en la colonización bacteriana es controversial. Primeros estudios mostraron que los anticuerpos IgA en mucosas y en cierto grado en suero tienen un importante protagonismo en la inmunidad. El papel de los anticuerpos IgG en la protección fue también sugerido por varios estudios, que mostraron un incremento en los anticuerpos IgG después de la inmunización. Muestras de secreciones gástricas de individuos infectados revela una respuesta humoral activa, principalmente de isotipos IgA, Esta respuesta es consistente con el predominio de IgA secretora (sIgA) en las secreciones gástricas de individuos sanos. Los anticuerpos sIgA anti-*H.pylori* son también encontrados en la saliva y la leche materna. En esta situación, la madre pudiera estar expuesta a la infección por *H. pylori* y anticuerpos específicos pudieran ser transferidos de la madre a hijo durante la lactancia, esto le brindaría protección, sin embargo, la mayoría de los niños se infectan a los 12 meses de edad.



Otros estudios han cuestionado el papel de la lactancia materna como factor protector en la adquisición de *H. pylori*. La relación entre la infección y el entorno familiar de la niñez ha sido evaluada en alemanes, japoneses e italianos. No se ha encontrado asociación entre la infección por *H. pylori* y una historia de la lactancia materna en cualquiera de los tres estudios. Los estudios han demostrado que la sIgA puede interferir con la capacidad de algunos patógenos entéricos para establecer la infección. Otros han demostrado que sIgA puede inhibir la adherencia bacteriana (Magalhaes y cols., 2006).

Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que la respuesta de anticuerpos sistémica y la respuesta de sIgA contra *H. pylori* no inhiben el organismo a partir de la adhesión a las células gástricas *in vitro* (Clyne y cols., 1997). Esto puede explicar por qué la infección crónica se desarrolla en los sujetos infectados a pesar de una vigorosa respuesta inmune.

Se ha informado de que la unión de IgG a *H. pylori* aumenta la fagocitosis y destrucción *in vitro* por los leucocitos polimorfonucleares. Cepas de *H. pylori* son susceptibles al complemento, incluso en ausencia de anticuerpos específicos, son capaces de activar el sistema del complemento, ya sea a través de la vía clásica o la vía alterna. Muchos estudios en modelo animal indican que la respuesta de las células T es más importante que los anticuerpos sIgA en mucosa gástrica (Allen, 2007).

Las células presentadoras de antígenos pueden desencadenar y estimular la respuesta inmune adaptativa a través de su habilidad para capturar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, presentando los péptidos antigénicos conectados a moléculas de superficie de MHC clase I y II. Los antígenos intracelulares (como proteínas virales) son presentados por moléculas MHC I que activan los linfocitos T CD8+ (CTLs) y antígenos extracelulares son endocitados y presentados por moléculas de MHC II que activa los linfocitos T cooperadores CD4+ (Th) (Kindt y cols., 2006).

Los macrófagos son una de esas APCs y también son involucrados en la amplificación de la respuesta inmune inflamatoria produciendo citocinas como, IL-1, TNF y IL-6 y junto con las DCs son activadores de la respuesta inmune adaptativa produciendo IL-12 que estimula la diferenciación de linfocitos Th (Kawai y Akira, 2011). Otras APCs involucradas en la activación de la inmunidad adaptativa son las DCs. Esas células,

capturan y procesan antígenos, que son ligados para ser enlazados a las moléculas de MHC, migran a órganos linfoides secundarios, conduciendo a la activación de linfocitos y diferenciación de linfocito B iniciando de esta manera la respuesta inmune específica contra los antígenos de los patógenos (Wilson y Crabtree, 2007).

El sistema inmune adaptativo es la segunda línea de defensa y es capaz de dar respuestas muy específicas contra los patógenos. Después de la presentación de antígenos a los receptores de superficie específicos relacionados con MHC de clase II, tanto las respuestas inmunes humorales y celulares en el huésped infectado se activan.

Los linfocitos T se dividen en dos linajes: los linfocitos T cooperadores (Th) que expresan CD4+, estimulada por MHC II, y los linfocitos T citotóxicos (CTL) que expresan CD8 + a la superficie, estimulado por MHC I (Kindt y cols., 2006).

Las citocinas producidas por las APC, como la IL-12, estimula la activación y reclutamiento de linfocitos y el desarrollo de la respuesta T cooperadores (Th). Dos tipos de linfocitos T CD4 + son estimulados: linfocitos Th1 y linfocitos Th2. Las células Th1 son inducidas en presencia de patógenos intracelulares y median la respuesta inmune celular mediante la producción de un conjunto de citocinas que incluyen el interferón (IFN) - $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF) - $\alpha$  y la interleucina (IL) -2. Estas citocinas se activan a los CTL y aumentan la fagocitosis. De este modo CTLs eliminan las células infectadas por un mecanismo mediado por anticuerpos. En el otro lado, Th2 son estimuladas en presencia de patógenos extracelulares, la mediación de la respuesta inmune humoral, que se caracteriza por la producción de citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Wilson y Crabtree, 2007). Después de la activación, las células Th pueden estimular a los linfocitos B para producir inmunoglobulinas. La respuesta Th1 induce la producción de IgG2a (e IgA) y la respuesta Th2 a IgG1.

Las células T CD4 + activadas por antígenos ligados a las moléculas MHC II son cruciales para la protección contra las infecciones por *H. pylori*. Se sabe que *H. pylori* induce una respuesta Th1 y se esperaba un microorganismo no invasivo que induce una respuesta Th2 mediata, pero esto no se observa (Suerbaum y Michetti, 2002). Los estudios han demostrado que los pacientes con infección por *H. pylori* tienen un mayor producción de IFN- $\gamma$ , consistente con las respuesta de citocinas Th1 y células T de la

mucosa producen niveles elevados de citoquinas Th1, tales como IFN- $\gamma$  e IL-2, a diferencia de citocinas Th2, tales como IL-4 e IL-5 que no han sido detectadas en la mucosa gástrica de los individuos infectados (Peek y cols., 2010; Velin y Michetti, 2010). Las infecciones persistentes por *H. pylori* típicamente resultan en respuestas polarizadas Th1, mientras que una inmunización exitosa podría resultar en respuesta equilibrada de Th1 / Th2 (Algood, 2006). Entonces se podría concluir que el sistema inmunológico es incapaz de despejar la infección por *H. pylori*. Los estudios han mostrado que *H. pylori* es capaz de comprometer la respuesta inmune del huésped a través de factores de virulencia que interfieren con la proliferación de células T (Velin y Michetti, 2010).

Por lo tanto, la producción de la respuesta inmune en presencia de *H. pylori* es ineficaz para eliminar la infección y puede contribuir al daño tisular como apoptosis y daño al DNA, dúo con la respuesta inmune ineficiente por las células Th2 que conduce a los neutrófilos y la activación continua de macrófagos, consecuente persistencia de inflamación y la producción constante de citocinas tales como IFN- $\gamma$  (Wilson y Crabtree, 2007).

Las células M son las principales células efectoras en los tejidos linfoides de la mucosa, que ocupan los antígenos o microorganismos por fago-, endo-, o pinocitosis y entregan a las CPA. Los tejidos linfoides de la mucosa se pueden dividir en los sitios efectoras y sitios inductores. Los antígenos se presentan en los sitios de inductores que conducen a una activación de células del sistema inmune. Los sitios efectoras están localizados donde los anticuerpos y las células inmunes actúan. Los principales sitios de inducción del sistema inmune de la mucosa son los componentes de MALT, que incluyen el tejido linfoide asociado a intestino (GALT), tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT), el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT) y tejido linfoide asociado a la mucosa genital (GALT). En el MALT, algunos PPRs interactúan con PAMPs de los microorganismos para la translocación de las bacterias a través de la barrera epitelial (Azizi y cols., 2010).

Las principales células efectoras en las superficies mucosas están constituidas por linfocitos T CD8 + y T CD4 +. El APC como los macrófagos, DCs y los linfocitos B.

Por lo tanto, la conexión de las APCs a los linfocitos T y B en los sitios de la inducción de la mucosa son esenciales para el éxito de una respuesta inmune eficaz (Wilson-Welder y cols., 2009).

### **2.5 Vacunas contra *H. pylori*.**

Tras el reconocimiento del papel de *H. pylori* en la enfermedad de úlcera péptica y cáncer gástrico, los esfuerzos para diseñar una vacuna para la prevención de esta bacteria se inició a principios de 1990. A pesar de los esfuerzos por desarrollar una vacuna, no existe un consenso sobre la selección de antígenos, adyuvantes o ruta de entrega, y también hay ensayos clínicos exitosos y modelos. Sin embargo, la identificación de nuevos antígenos y el aumento de la comprensión de los mecanismos de protección han llevado a algunos progresos, que se centran cada vez más en el papel de la inmunidad celular, tal como Th1, Th17 y Treg.

Varias proteínas de *H. pylori* ya han sido reportadas como antígenos de vacunas eficaces: VacA, proteínas de choque térmico, *H. pylori* adhesina A, NAP y CagA (Rupnow y cols., 2009). En modelos de ratón, una combinación de los antígenos mencionados con un adyuvante adecuado es capaz de reducir la colonización por *H. pylori*, demostrando que es posible inducir un efecto protector mediante la vacunación. Además, las otras dos enzimas antioxidantes catalasa y superóxido dismutasa se han utilizado en una vacuna de combinación con tiorredoxina peroxidasa. Es probable que esta vacuna combinada puede estar actuando de manera sinérgica, dañando varias ramas del sistema antioxidante (Svennerholm y cols., 2007). Parece que una combinación de ureasa con otros antígenos puede producir mejor resultados. Por ejemplo, la recombinación de UreB con una adhesina A de *H. pylori*, como una vacuna, parece dar una mejor protección que cualquiera de las proteínas por sí sola (Flach y cols., 2011).

La creación de una vacuna multivalente por fusión genética de dos o más proteínas recombinantes puede resolver algunos de los problemas de logística y de fabricación que se asocia con una vacuna compuesta de múltiples antígenos. A este respecto, se han completado los estudios primarios en otros antígenos novedosos, incluyendo Omp18, TonB, y proteína conjugada a lipopolisacárido (Monteiro y cols., 2011).

Uno de los nuevos avances en la búsqueda de nuevos antígenos ha sido el uso de un método o bioinformática computacional para predecir epítomos de células T mediante la secuenciación de todo el genoma (Moss y cols., 2011). Una vacuna multi-epítopo se administró por vía intranasal o intramuscular en ratones infectados, seguido por un pulso con los péptidos formulados en liposomas con los oligonucleótidos CpG y la enterotoxina lábil al calor. La vacuna desarrolló una amplia respuesta inmune, tal como se determina por la producción de IFN- $\gamma$ , y dio lugar a una inmunidad esterilizante a 32 semanas después de la exposición en cinco de los 19 ratones (Ihan y cols., 2012).

Recientemente, se han utilizado otros sistemas de suministro, tales como un virus del sarampión atenuados para expresar la proteína NAP como una estrategia alternativa para el suministro de epítomos de células T (Iankov y cols., 2011). Recientemente, se estableció que las células T CD4+ y la expresión de moléculas MHC clase II son esenciales para la protección inducida en esa vacuna. La colaboración entre las células T CD4 + y mastocitos también se ha sugerido como protectora (Yang y cols., 2013).

## **2.6 Inmunización en modelo animal.**

Varios modelos animales de infección con *H. pylori* se han descrito; entre ellos, el modelo murino es el más estudiado. Estos modelos animales permite la producción de una gran cantidad de datos que demuestran la viabilidad y la eficacia de la vacunación contra *H. pylori* (Del Giudice y cols., 2009).

La colonización de *H. pylori* se produce a nivel de la mucosa, por eso se ha dado particular énfasis a la inmunización oral, aunque otras vías, como la ruta parenteral han sido consideradas (Vajdy y cols., 2003). La inmunización de la mucosa requiere el uso de fuertes adyuvantes. Algunos de los adyuvantes de la mucosa más fuertes conocidos en la actualidad son las toxinas bacterianas, como la toxina del cólera (CT) y la enterotoxina de *E. coli* lábil al calor (LT), que, sin embargo, induce diarrea grave en los seres humanos, lo que limita seriamente su uso; Por lo tanto, se han desarrollado mutantes no tóxicos de estas moléculas para ser utilizado como adyuvantes en la mucosa (Pizza y cols., 2001).

La viabilidad de la inmunización de la mucosa se demostró primero en ratones inmunizados por vía oral con lisados bacterianos o bacterias enteras inactivadas junto con CT, LT o sus mutantes no tóxicos, la obtención de una alta tasa de protección frente

a *H. pylori*. Actualmente, el uso en seres humanos de vacunas basadas en células enteras podría ser obstaculizado por la presencia de componentes bacterianos que pueden inducir respuestas no deseadas, como, por ejemplo, antígenos que tienen homología con los humanos. En particular, *H. pylori* expresa antígenos de Lewis idénticos a los de la superficie de las células gástricas epiteliales y los péptidos de reacción cruzada con H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPasa. Por lo tanto, la investigación actual en una vacuna contra *H. pylori* se centra en los antígenos de proteínas recombinantes (Bergman y cols., 2011).

La eficacia de la inmunización profiláctica y terapéutica contra *H. pylori* se ha demostrado para una variedad de antígenos nativos o recombinantes, tales como la ureasa, las proteínas de choque térmico, VacA, CagA, HP-NAP, catalasa, HpaA y SOD (superóxido dismutasa). Además, las vacunas de DNA y diferentes sistemas de entrega, como *Salmonella* o poliovirus vectores vivos, se han utilizado en animales (Kabir y cols., 2007). En la mayoría de los casos se observó una protección parcial, es decir, se redujo la colonización gástrica, pero no suprimió, lo que sugiere que el aumento de la eficacia se puede lograr mediante la combinación de más de un antígeno.

Estudios recientes intentaron identificar otros antígenos protectores en ratones, como Hp0410 (unión neuraminyllactose-hemaglutinina HPAA homólogo), Tpx (peroxidasa de tiol), proteínas de membrana externa y el hidropéroxido de alquilo reductasa (Hongying, y cols., 2014).

Otros estudios intentaron usar antígenos protectores conocidos previamente en nuevas formas (por ejemplo, proteínas de fusión, que comprenden porciones de epítomos definidos, las construcciones de vacunas basadas en epítomos), demostrando ya sea la eficacia terapéutica o profiláctica en ratones (Guo y cols., 2012).

Todos estos estudios confirmaron que la protección contra *H. pylori* se puede lograr por la vacunación en modelos animales; sin embargo, rara vez se logra una protección completa, lo que sugiere que todavía se requiere la optimización de la combinación de antígeno, adyuvante, la vía y el régimen de inmunización. Por otra parte, la eficacia en animales no es necesariamente predictivo de la eficacia en seres humanos; por desgracia, esto parece haber ocurrido hasta ahora con *H. pylori*.

Se han efectuado diversos estudios para el diseño de una vacuna contra *H. pylori* con distintos modelos animales (ratones, gerbos, monos Rhesus), así como ensayos fase I en humanos. Estos estudios pueden clasificarse en cuatro categorías: 1) ensayos con vacunas de bacteria muerta, 2) con bacterias atenuadas o virus como transportadores de antígenos, 3) con DNA y finalmente, 4) vacunas con antígenos de *H. pylori* (Jagusztyn-Krynicka y Godlewska, 2008).

Dentro de la primera categoría, existen varios estudios que emplean células de *H. pylori* muertas para la elaboración de una vacuna. Se ha administrado oralmente bacteria muerta con formalina usando toxina termolábil (LT) de *E. coli* mutante como adyuvante en 23 voluntarios no infectados, habiendo una respuesta inmune sistémica y en mucosas. Sin embargo, no hubo erradicación total de *H. pylori*, aunado a efectos secundarios como diarrea, fiebre y vómito (Kotloff y cols., 2001). También se ha utilizado *H. pylori* fantasma en modelos murinos con fines profilácticos, confiriendo únicamente una protección parcial contra la infección.

En la segunda categoría, se han empleado cepas atenuadas de *Salmonella* como transportadores de antígenos de *H. pylori*. Como ejemplo de ello, en un modelo murino se empleó *Salmonella* como transportador de las subunidades A y B de ureasa de *H. pylori*, observándose una reducción de la colonización gástrica por este microorganismo (Jagusztyn-Krynicka y Godlewska, 2008). En un estudio fase I con voluntarios no infectados, se obtuvo profilaxis parcial utilizando *Salmonella enterica* sp. enterica, sv. typhi y sv. typhimurium recombinante con antígenos de *H. pylori*. Otro ensayo fase I utilizó *Salmonella* Ty21a expresando ureasa A y B de *H. pylori* en personas no infectadas, confiriendo una protección parcial (Agarwal y Agarwal, 2008). En cuanto a virus atenuados, se han utilizado virus de polio genéticamente modificados para acarrear UreB de *H. pylori* (Jagusztyn-Krynicka y Godlewska, 2008).

Las vacunas de la tercera categoría utilizan con frecuencia plásmidos que contienen genes de ureasa, catalasa o Hsp de *H. pylori* (Jagusztyn-Krynicka y Godlewska, 2008). Un ensayo en modelo murino utilizó pcDNA 3.1, que codifica la catalasa de *H. pylori*, para la inmunización vía intranasal e intracutánea, induciendo una respuesta inmune humoral y suprimiendo la colonización e inflamación de la mucosa gástrica. Otro estudio evaluó la inmunogenicidad de una vacuna oral de DNA con la proteína HP-NAP

recombinante de *H. pylori* en ratones, obteniéndose una respuesta inmune específica contra este bacilo (Sun y cols., 2006).

Con respecto a la última categoría de vacunas, destacan los ensayos realizados con ureasa de *H. pylori*. Se ha suministrado *S. entérica* sp. *enterica* sv. *typhi* Ty800 con ureasa A y B de *H. pylori* oralmente a 8 individuos no infectados, no produciéndose respuesta inmune humoral ni en mucosa. También se ha empleado *S. typhimurium* con ureasa de *H. pylori* en 6 voluntarios no infectados, obteniéndose una respuesta con anticuerpos IgA (Agarwal y Agarwal, 2008).

En un modelo con monos *Rhesus*, se administró oralmente ureasa recombinante (rUre) con *E. coli* LT, mostrando una reducción modesta en la colonización gástrica por *H. pylori* (Lee, 2001).

Otros antígenos utilizados comúnmente para la elaboración de vacunas son las proteínas CagA y VacA de *H. pylori*. La proteína CagA ha sido incluida en varios prototipos de vacunas, aunque su uso práctico ha sido cuestionado debido al alto polimorfismo que presenta. En cuanto a la proteína VacA, los prototipos que la incluyen presentan la desventaja de la variación en los niveles de expresión del gen que la codifica.

Por ello, para la elaboración de una vacuna experimental se ha propuesto incluir proteínas abundantes de *H. pylori* que se encuentren conservadas, que sean altamente inmunogénicas y cuya ubicación sea en la superficie bacteriana (Jagusztyn-Krynicka y Godlewska, 2008).

De acuerdo a lo anterior, se han incluido distintas proteínas de superficie de *H. pylori* en el diseño de prototipos de vacunas. Un ejemplo de ello es Tip  $\alpha$ , una proteína de 19 kDa ubicada en la membrana bacteriana de las cepas ATCC 26695, ATCC 43504 y SS1 que induce la producción de TNF- $\alpha$  por células epiteliales gástricas *in vitro*. En un ensayo profiláctico con un modelo murino C57BL/6 se administró vía intranasal Tip  $\alpha$  con CpG contra la infección por *H. pylori*, obteniéndose una respuesta inmune efectiva Th1 (Inoue y cols., 2009).

Otro enfoque novedoso para el diseño de una vacuna contra *H. pylori* consiste en el empleo de adhesinas con afinidad a heparán sulfato (HSBP). En estudios previos, se ha demostrado la inhibición de la adherencia bacteriana *in vitro* en células HeLa y Kato III



mediante la inducción de anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína extracelular HSBP de 71.5 kDa (Guzmán-Murillo y cols., 2001) y que en animales oralmente inmunizados con HSBP, la infectividad del patógeno se reduce significativamente (Ruiz Bustos y cols., 2001). Se observó también que los anticuerpos monoclonales generados contra Lea y Leb no inhiben la adherencia de *H. pylori*, por lo cual se sugiere la elaboración de una vacuna basada en proteínas HSBP para la protección y erradicación de las patologías provocadas por este bacilo (Ruiz-Bustos y cols., 2001).

En concordancia con los estudios anteriormente descritos, el desarrollo de una vacuna sigue siendo una opción deseable para controlar la infección por *H. pylori*. Una vacuna profiláctica y terapéutica efectiva contra este bacilo podría reducir la incidencia de complicaciones tardías relacionadas con la infección, incluyendo el desarrollo de cáncer gástrico. No obstante, actualmente es difícil alcanzar respuestas inmunes protectoras eficaces contra *H. pylori* en mucosas. Es por ello que el diseño exitoso de una vacuna necesita de una mayor comprensión de los mecanismos de protección y de la inducción de post-inmunización en la gastritis observada en el modelo murino (Jagusztyn-Krynicka y Godlewska, 2008).

## **2.7 Bacterias ácido lácticas como sistemas de expresión de antígenos para el desarrollo de vacunas.**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son Gram-positivas, bacterias no esporuladas, con genomas bajo contenido de GC. Este grupo se caracteriza por la capacidad de llevar a cabo la fermentación de hidratos de carbono para formar ácido láctico. Este grupo de microorganismos incluye cocos y bacilos, los representantes de las especies pertenecientes a los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, y otros. Muchos BAL han sido considerados como seguros (GRAS) por la *Food and Drug Administration* (FDA), pero vale la pena mencionar que las bacterias patógenas tales como *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae* también pertenecen a este grupo (Daniel y cols., 2011). Las bacterias del grupo de BAL se caracterizan por la ausencia de genes que codifican para las proteínas que participan en diversas rutas de biosíntesis. De acuerdo con ello, estos

organismos auxótrofos proliferan en ambientes ricos en aminoácidos, purinas, pirimidinas, y donde se pueden cumplir sus altos requerimientos nutricionales.

Hasta hace poco, las bacterias del grupo de BAL se han utilizado principalmente en la producción y conservación de los alimentos. Algunas especies son reconocidas como probióticos, que, de acuerdo con la definición propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) confieren un beneficio para la salud en el huésped cuando se administran en cantidades adecuadas (de Vos 2011; FAO / OMS, 2001). Sin embargo, las cepas de BAL reconocidas como probióticos difieren en sus actividades. Algunas bacterias de este grupo modulan la composición de la flora bacteriana del intestino y por lo tanto mantener la homeostasis de la microbiota intestinal. Además, varias de las cepas de probióticos estimulan el sistema inmunológico y reducen el riesgo de reacciones alérgicas. Otras especies bacterianas proporcionan protección contra las bacterias patógenas por competir con ellos para la superficie colonizada, mediante la producción de compuestos que inhiben el crecimiento de patógenos, o mediante la inducción de la producción de moco y péptidos antimicrobianos (AMP) por las células epiteliales de la mucosa (Isolauri y cols. 2004). Cepas probióticas son de suma importancia en el apoyo del tratamiento de enfermedades del sistema digestivo (principalmente la diarrea de etiología viral o la diarrea asociada con el uso de antibióticos), enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), y trastornos autoinmunes (Fontana y cols., 2013; Isolauri y cols., 2004).

Durante más de 20 años, BAL han sido intensamente estudiadas como posibles vectores bacterianos de compuestos con efectos terapéuticos o profilácticos (Bermúdez-Humaran y cols., 2011). BAL permiten la inmunización por vía mucosa, que no sólo es más sencillo que las inyecciones estándar, pero también aumenta la eficacia contra los patógenos que utilizan la mucosa como su principal vía de entrada en el cuerpo humano. La entrega de antígenos usando cepas de BAL puede inducir tanto la mucosa (SIGA) y las respuestas inmunes sistémicas (Bermúdez-Humaran y cols., 2011). El atractivo de BAL en la inmunoprofilaxis y la terapia también está determinada por su resistencia al bajo pH del jugo gástrico y por la capacidad de adherirse a la superficie del epitelio intestinal. Además, algunas cepas de laboratorio han demostrado poseer propiedades como adyuvantes, lo que significa que pueden mejorar la respuesta inmune inducida por

el antígeno transportado. Gracias a la posibilidad de la liofilización, BAL no requieren almacenamiento a baja temperatura, y la administración de la preparación no requiere personal especializado.

Todas estas características, en particular, las propiedades promotoras de la salud y un alto grado de seguridad de BAL, ellos hacen una alternativa atractiva a otros vectores utilizados para la construcción de vacunas, incluyendo cepas atenuadas de varias especies de microorganismos patógenos, liposomas, y micropartículas.

## **2.8 Herramientas de ingeniería genética utilizadas para la clonación de genes heterólogos en *Lactobacillus spp.***

En los últimos años, el interés en las bacterias del género *Lactobacillus* también ha aumentado. Más de 180 especies se incluyen en este género (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1578>, accesado en agosto de 2015). Sin embargo, la atención se centra en las cepas con propiedades probióticas probadas; entre ellas se encuentran las siguientes especies bacterianas: *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* y *L. gasseri* (Fontana y cols., 2013).

La preparación de vectores de expresión para la clonación de genes en las células del género *Lactobacillus* es un reto, debido principalmente al alto nivel de diversidad genética. Algunos de los sistemas de replicación de plásmidos descritos se activa sólo en cepas específicas, y los promotores de lactobacilos conocidos tienen diferentes niveles de actividad, dependiendo de la cepa que se encuentran. Los vectores de clonación más comúnmente utilizados para *L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. gasseri* son los que tienen el sistema de replicación de pWV01, pSH71 o pAMBeta-1 (Stoecker y cols., 2011; Duong y cols., 2011; Kajikawa y cols., 2012).

En los vectores de expresión para *Lactobacillus*, promotores constitutivos tales como P<sub>pgm</sub> (promotor fosfoglicerato mutasa), P<sub>ldh</sub> (promotor de la lactato deshidrogenasa), o P<sub>slpA</sub> (promotor del gen que codifica la S-capa de la proteína SlpA), además se han utilizado promotores inducibles. Uno de ellos es el promotor de un gen que codifica una

proteína de choque térmico de *Enterococcus faecium*; su actividad se ha analizado en las células de *L. plantarum* (Maidin y cols., 2014). Reciente análisis global de transcriptomas lactobacilos, o la investigación de bibliotecas genómicas utilizando diversos genes reporteros, ha dado como resultado la identificación de promotores inducidos por las condiciones ambientales específicas. En un análisis del transcriptoma de *L. acidophilus* identificaron promotores que son inducidos por la presencia de hidratos de carbono, es decir, el P<sub>FOS</sub> (fructooligosacárido), P<sub>lac</sub> (lactosa), y P<sub>tre</sub> (trehalosa), pero se reprimen en presencia de glucosa. P<sub>fos</sub> puede demostrar ser particularmente útil en la terapia o la inmunoprofilaxis, como fructo-oligosacáridos son prebióticos que estimulan el desarrollo de la microflora intestinal (Duong y cols., 2011). El uso de un gen codificante a alanina racemasa como una sonda de promotor para la identificación en todo el genoma de los genes inducibles de *L. plantarum* resultó en la identificación de muchos genes cuya expresión es inducida por la alta concentración de sal o por las sales biliares.

## **2.9 BAL como acarreadores de antígenos heterólogos bacterianos, parasitarios y virales**

BAL se caracterizan por su alta diversidad genética y fisiológica. Por lo tanto, la capacidad de diferentes cepas de subsistir y multiplicarse en un organismo inmunizado difiere sustancialmente. Por otra parte, las similitudes en la composición de sus paredes de las células resultan en diferencias significativas en la respuesta inmune estimulada. Algunos componentes de la pared celular tales como peptidoglicano, lipoproteínas, o ácidos lipoteicóicos son reconocidos por *Toll-like* eucariota (TLR) o dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD) receptores implicados en la respuesta inmune anti-inflamatoria (Macho Fernández y cols., 2011). Los datos obtenidos por diferentes grupos de investigación no son consistentes, y las dificultades que resultan de la comparación de la utilización de diferentes antígenos, vectores y los calendarios de vacunación.

## **2.10 Rutas de administración**

El primer uso de BAL como un vector de vacuna es un informe de 1990 del uso de células de *Streptococcus lactis* muertas con formalina que produjeron proteína PAc (antígeno I / II) en la superficie celular para inmunizar contra *Streptococcus mutans*. La inmunización intragástrica de ratones dio como resultado la producción de anticuerpos IgG e IgA específicos; por lo tanto, se demostró, por primera vez, que BAL podría ser una alternativa atractiva a los acarreadores convencionales de antígenos foráneos (Iwaki y cols., 1990).

La mayoría de los prototipos de vacunas que utilizan cepas de BAL como acarreadores contra enfermedades infecciosas penetran a través de las membranas mucosas de los tractos gastrointestinal, respiratorio y urogenital. Por esta razón, se examinaron diferentes vías de administración. Debido a que el sistema inmune del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) constituye una red que cubre todo el cuerpo, y porque los linfocitos son capaces de migrar, la inmunización oral también proporciona inmunidad sistémica expresada por las membranas mucosas de otros órganos. Cepas de BAL, en calidad de vehículos de antígenos *S. pneumoniae*, ya han demostrado ser eficaces en la inmunización intranasal. Así, con base en los conocimientos actuales sobre el funcionamiento MALT, una cepa de *L. lactis*, que comprende el gen de la pppA de *S. pneumoniae* expresado a partir de un promotor inducible por la nisina, también se empleó para la inmunización oral de ratones adultos, así como jóvenes. En ambos se observó la inducción de anticuerpos específicos en el intestino y la estimulación de una respuesta inmune sistémica (IgG en el suero). Esta inmunización elevó la resistencia de los ratones a la infección, aunque el efecto fue dependiente de la serotipo de la cepa utilizada en el ensayo de protección (Villena y cols., 2010).

## **2.11 Cepas acarreadoras.**

Se llevaron a cabo muchos estudios sobre la eficacia de varios representantes del grupo de BAL como acarreadores de antígenos heterólogos para la vacunación con el fragmento de la toxina tetánica altamente inmunogénica C-terminal (TTFC). Este fragmento de proteína ha sido intensamente estudiado como un reemplazo para la toxina inactivada en la difteria, el tétanos y la tos ferina vacuna combinada (DTP). El antígeno

se produce en las células de varias especies de bacterias del grupo de BAL (*L. lactis*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus gordonii*) que difieren en su capacidad de sobrevivir en nichos ecológicos colonizados. Los estudios con *L. lactis* y *L. plantarum* como portadores TTFC indicaron que la inmunogenicidad de *L. lactis* fue significativamente menor que el de *L. plantarum*, en particular cuando las cepas tenían una mutación en el gen que codifica la racemasa ALR alanina, una enzima implicada en la síntesis de pared celular. Inmunoglobulina específica Intestinal TTFC-A fue inducida sólo después de la inmunización con el *L. plantarum* cepa mutante recombinante. Esta conclusión, sin embargo, no fue inequívoca debido a que el gen que codifica TTFC se expresó en los portadores a partir de promotores que son difíciles de comparar (un promotor nisina inducible y un promotor constitutivo) (Grangette y cols., 2004).

El efecto de acarreadoras en el nivel de la respuesta inmune también se analizó con respecto a la eficacia de una vacuna potencial contra la malaria. Las cepas que producen el antígeno bien caracterizado superficie de merozoito (MSA2), una proteína de superficie de *Plasmodium falciparum*, se pusieron a prueba, utilizando una serie de variantes. El antígeno se produjo en *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. salivarius* y se asoció con peptidoglicano de las células vivas, ya sea por unión covalente o no covalente, o en la superficie de las células tratadas con ácido tricloroacético (TCA). Además, se utilizaron genéticamente diferentes líneas de ratones en los estudios. La inmunización nasal y bucal combinada se emplea en ese trabajo. Se observaron diferencias significativas en los niveles de inducción y los tipos de respuesta inmune inducida, dependiendo del tipo de animal inmunizado, el género de la acarreadora, y la ubicación del antígeno (Moorthy y Ramasamy 2007). *L. lactis* y *L. plantarum* (alr-) cepas que expresan la subunidad B de la ureasa (UreB) de *H. pylori* también se analizaron para la inmunización anti-*Helicobacter*. Un efecto positivo (inducción de los anticuerpos y la reducción del nivel de colonización de ratones por *H. felis* específicos) sólo se observó después de la vacunación con una cepa de *Lactobacillus* (Corthesy y cols., 2005). Se postula que algunas cepas de *L. lactis* que revelan una alta afinidad para el moco son candidatos prometedores para el desarrollo de una vacuna contra la gripe aviar (Radziwill-Bienkowska y cols., 2014).

## **2.12 BAL en modulación de la actividad del sistema inmune**

Las citocinas juegan un papel importante en la señalización celular, la transmisión de estímulos y dirigir las respuestas inmunes. Se han hecho intentos de utilizar cepas de BAL para llevar partículas que pueden controlar el tipo de respuesta inmune inducida, con el objetivo principal de su uso como terapia para enfermedades inflamatorias del tracto gastrointestinal (Wells y Mercenier 2008). Vectores de laboratorio que expresan antígenos de microorganismos patógenos o secretan citocinas en el medio ambiente deben evocar una respuesta inmune más efectiva. Los primeros estudios sobre el uso de las citocinas en la inmunización con *L. lactis* por administración intranasal involucrados en ratones de una cepa de *L. lactis*, produciendo tanto el TTFC y citocinas murinas biológicamente activas de IL-2 o IL-6. La coproducción indujo niveles significativamente más altos de anticuerpos IgG específicos que cuando *L. lactis* produce sólo TTFC. El uso de *L. lactis* que expresan interleucina 2 (chIL-2) de pollo junto con hemaglutinina de la gripe aviar (H5) también reveló propiedades adyuvantes de chIL-2, y el estudio sugiere que *L. lactis* podría ser un candidato prometedor como portador de antígenos en las vacunas contra la gripe aviar (Szatraj y cols., 2014). En los últimos años, la influencia de la IL-12 en el sistema inmune ha sido ampliamente estudiada. Uno de los ejemplos prometedores de IL-12 en la inmunoprolifaxis es el desarrollo de una vacuna contra la leishmaniasis, Se desarrolló dos cepas de *L. lactis*, una producción de un antígeno de *L. major*, LACK, anclado a la pared celular bacteriana, y la segunda un secretor de IL-12 murino. La administración subcutánea de las dos cepas a ratones dio lugar a una respuesta Th1 específica (Hugentobler y cols., 2012b). Una cepa capaz de expresión simultánea del antígeno LACK y IL-12 evocó una respuesta inmune que protegió a los ratones de una posterior infección por *L. major* (Hugentobler y cols., 2012).

### III. JUSTIFICACIÓN.

*H. pylori* afecta a cerca de dos tercios de la población mundial y su prevalencia está fuertemente relacionada con las condiciones socioeconómicas (Malaty, 2007). En países en vías de desarrollo afecta a más de 80% de los adultos, en contraste con un 20 a 50% en países desarrollados (Suebaum, 2002). En todos los infectados produce gastritis crónica, pero solo el 20% de ellos tendrá alguna enfermedad clínica. Del 10 a 20% de los infectados durante su vida tendrán riesgo de desarrollar úlceras pépticas y 1-2% de tener carcinoma gástrico (Otero y cols., 2007). A pesar de la disminución en la incidencia del cáncer gástrico, actualmente ocupa el cuarto lugar y el segundo en mortalidad entre todos los cánceres en todo el mundo (Jemal y cols., 2011). Las tasas de incidencia más altas se encuentran en el este de Asia, Europa Oriental, y en algunos países de América Latina, principalmente en Centroamérica y la región Andina, con tasas de entre 20 a 30 por cada 100.000 habitantes. Se ha estimado que la infección por *H. pylori* es responsable del 77% de los casos de cáncer gástrico distal y se asocia con ambos tipos, intestinales y difusos, pero no con carcinomas originados en las cardias gástricas. A nivel mundial, existe un incremento en la resistencia a los antibióticos comunes contra *H. pylori*, particularmente en América latina encontrándose altas tasas de 12 % para claritromicina, 53 % para metronidazol, 4 % para amoxicilina, 6 % para tetraciclina, 3 % para furazolidona y 15 % para fluoroquinolonas (Camargo y cols., 2014). Debido a todo lo anterior, es necesario la prevención de la infección a través del desarrollo de vacunas que puedan generar una respuesta inmunológica protectora. Hasta la fecha no se ha logrado disponer de una vacuna que brinde inmunidad completa. El desarrollo de una vacuna multi-epítopo que permita la estimulación un respuesta inmune específica de los linfocitos Th y B permitiría el desarrollo de una inmunidad protectora contra la infección por *H. pylori*. El uso de las bacterias ácido lácticas recombinantes como sistema de expresión y secreción de antígeno en el tracto gastrointestinal TGI brindaría una manera fácil, segura y sin efectos adversos para el huésped.



#### **IV. HIPÓTESIS**

El uso de herramientas inmunoinformáticas es capaz desarrollar un prototipo de vacuna oral basada en la expresión de un antígeno multi-epítipo contra *H. pylori* en *Lactococcus lactis* recombinante.

## V. OBJETIVOS

### General.

Producir una vacuna oral basada en la expresión de un antígeno multi-epítipo contra *H. pylori* en *Lactococcus lactis* utilizando un enfoque inmunoinformático.

### Específicos.

1. Identificar epítomos inmunogénicos de células T y -B a partir de proteínas relacionadas a los mecanismo de virulencia en *H. pylori* mediante herramientas bioinformáticas.
2. Diseño y evaluación *in silico* del prototipo de vacuna oral basada en la expresión de un antígeno multi-epítipo contra *H. pylori* en *L. lactis*.
3. Construir la recombinante *L. lactis* con el vector de expresión pNZ8048-vic\_vaccine.
4. Identificar la expresión proteica de la vacuna oral en la recombinante *L. lactis* pNZ8048-vic\_vaccine
5. Evaluación de la inmunoreactividad de la vacuna oral recombinante purificada en presencia de suero de pacientes infectados por *H. pylori* mediante ELISA.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Bacterias y condiciones de cultivo.

*L. lactis* NZ900 sin vector se cultivaron a 30°C, sin agitación, en un medio M17 suplementado con 0.5% glucosa en condiciones de anaerobiosis. *L. lactis* pNZ8048:GFP en placas de agar M17 (Oxoid Ltd., Hampshire RG24 8PW, UK) enriquecido con 0.5% glucosa y suplementado con 10 µg/mL de Cloranfenicol. *Escherichia coli* se cultivó a 37°C en medio Luria-Bertani (Oxoid Ltd., Hampshire RG24 8PW, UK) con 100 µg/mL de ampicilina. La cepa de *H. pylori* J99 se cultivó durante 3 a 5 días a 37 °C, en una atmósfera microaerofílica (85 % N<sub>2</sub>, 10 % de CO<sub>2</sub> y 5 % de O<sub>2</sub>), en agar tripticaseína soya (Becton–Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) suplementado con 5 % (v/v) de sangre de carnero desfibrinada (Oxoid Ltd., Hampshire RG24 8PW, UK).

### 6.2 Selección y evaluación antigénica de proteínas.

Las proteínas de *H. pylori* se seleccionaron según los siguientes criterios: 1) capacidad antigénica documentada, 2) inductores de daño y patología gástrica, y 3) proteínas involucradas en la adhesión y colonización de las células epiteliales. La capacidad virulenta, el análisis de genes esenciales, la localización subcelular, la homología no humana, la predicción de las regiones que abarcan la membrana y el peso molecular se evaluaron en las proteínas seleccionadas. Las secuencias de proteínas completas se recuperaron de la base de datos de secuencias de referencia del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) en formato FASTA. Estas proteínas se encuentran en la matriz extracelular o membrana externa del organismo. La localización subcelular y la secreción de proteínas patógenas es una de las consideraciones importantes para los posibles candidatos de vacuna. Para la predicción de la localización subcelular de la proteína bacteriana, se empleó CELLO v2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>). Utiliza la composición de aminoácidos, la composición de dipéptidos, la composición de aminoácidos particionados y la composición de secuencias en función de las propiedades físico-químicas de los aminoácidos, combina los votos de estos clasificadores y utiliza los votos del jurado para determinar la asignación final (Yu y cols., 2004; Yu y cols., 2006). La base de datos de OGEE

(<http://ogee.medgenius.info>) se utilizó para mejorar nuestra comprensión de la esencialidad de los genes en proteínas seleccionadas (Chen y cols., 2017). La virulencia es el requisito más importante en la evaluación y el estudio del papel patógeno de las proteínas seleccionadas, para esto se utilizó la base de datos PATRIC 3.5.16 (<https://www.patricbrc.org/>) (Wattam y cols., 2017).

Las proteínas se seleccionaron por BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) para detectar secuencias homólogas a *Homo sapiens*. Los objetivos de las vacunas no deben ser homólogos humanos para evitar la autoinmunidad.

Las proteínas que tienen 2 o más hélices transmembrana no se consideraron buenas dianas. Para predecir las hélices transmembrana, se utilizó TMHMM v2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>). Esto se basa en un modelo oculto de Markov y puede predecir hélices transmembrana con especificidad y sensibilidad entre el 97% y el 98% (Krogh y cols., 2001).

Las proteínas que tienen un peso molecular más bajo pueden purificarse fácilmente y someterse de manera eficiente al desarrollo de vacunas. Se utilizó la herramienta pI / Mw ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/)) para calcular el punto isoeléctrico estimado y el peso molecular de todas las secuencias de aminoácidos (Wilkins y cols., 1999).

### **6.3 Conservación, secuencia consenso y alineación.**

La conservación de las proteínas seleccionadas se analizó utilizando la cepa 26695 de *H. pylori* como referencia. Para proteínas con alta variabilidad, se generó una secuencia de consenso utilizando secuencias de cepas representativas de *H. pylori* mundiales (85 secuencias genómicas completas de cepas de *H. pylori*). La alineación de la secuencia se realizó con CLC Main Workbench v7.8 (QIAGEN Bioinformatics), Emboss Cons (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons>) y el software T-Coffee (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>).

## 6.4 Predicción de epítomos de células T

Al predecir los epítomos de enlace de MHC-I, los algoritmos del servidor NetMHC 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>), en los que las predicciones se basan en redes neuronales artificiales (ANN) entrenadas en datos de 55 alelos MHC. Se utilizaron alelos MHC (43 humanos y 12 no humanos), y matrices de puntuación específica de la posición (PSSM) para 67 alelos HLA adicionales (Andreatta y Nielsen 2016). Se evaluaron ochenta y un alelos MHC humanos, incluidos los alelos HLA-A, -B, -C y -E, y 6 alérgicos H-2. Las predicciones se calcularon para epítomos de 9 mers con un umbral para ligantes fuertes de 0.5% y un umbral para ligantes débiles de 2%. El segundo fue ProPred-I (<http://crdd.osdd.net/raghava/propred1/index.html>) que implementa matrices para modelos de alelos de 47 MHC Clase I, proteasomal e inmunoproteasomal. Los péptidos de puntuación umbral fueron del 4% (Singh y Raghava 2003). El tercero fue IEDB MHC-I Binding Predictions (<http://tools.iedb.org/mhci/>), que utiliza el método de consenso que consiste en ANN, SMM y CombLib si hay algún predictor correspondiente disponible para la molécula, de lo contrario, Se utiliza NetMHCpan (Lundegaard y cols., 2008). Los aglutinantes mejor predichos para los alelos 27 HLA y 6 H-2 se seleccionaron en base a un rango percentil de  $\leq 1\%$  para cada combinación (alelo MHC, longitud), que incluye la mayoría de las respuestas inmunitarias.

Para identificar los péptidos de unión a MHC-II, se emplearon los siguientes tres servidores: Propred (<http://crdd.osdd.net/raghava/propred/>) que utiliza tablas de coeficientes de posición / aminoácidos en un modelo de predicción lineal (es decir, basado en matriz cuantitativa método de predicción). Para las predicciones, se evaluaron 51 alelos HLA-DR utilizando un umbral predeterminado del 3% (Singh y Raghava 2001). El segundo servidor fue IEDB MHC-II Binding Predictions (<http://tools.iedb.org/mhcii/>), que utiliza diferentes métodos para predecir epítomos de MHC de clase II, incluido un enfoque por consenso, que combina NN-align, SMM-align, , CombLib y Sturniolo si hay algún predictor correspondiente disponible para la molécula, de lo contrario, se usa NetMHCIIpan (Wang y cols., 2010). Se probó un panel de referencia de 27 alelos HLA y 3 alelos H-2-I. La selección de los aglutinantes predichos se basó en un rango de percentil de consenso del 10% superior. El tercer

servidor fue el servidor NetMHCII 2.3 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>), utilizando ANNs (Jensen y cols., 2018). Se obtuvieron predicciones para 25 alelos HLA-DR, 20 HLA-DQ, 9 HLA-DP y 7 alelos H2 de clase II de ratón para epítomos de 20 mers usando un umbral de -99.9, umbral para el aglutinante fuerte del 2% y umbral para el aglutinante débil del 10%.

## 6.5 Predicción de epítomos de células B

Para identificar epítomos de células B, se utilizaron los siguientes seis servidores.

Se predijeron epítomos de células B lineales de 20 mers utilizando ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), con un umbral de 0.75, que se basa en la red neuronal recurrente (Saha y Raghava). 2006). El segundo fue Bcepred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>), que puede predecir epítomos con 58.7% de precisión utilizando propiedades físicoquímicas (flexibilidad / movilidad, hidrofilia, polaridad, accesibilidad, superficie expuesta y giros) o combinación de propiedades en un umbral de 2.38 (Saha y Raghava 2004). Para el servidor de BCPREDS (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>), se aplicó el método BCPred con un umbral de especificidad del 75% para epítomos de 20 mer (El-Manzalawy y cols., 2008). El servidor BepiPred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) asigna una puntuación a cada aminoácido individual en una secuencia, por lo tanto, solo se consideraron aminoácidos con predicción Bepipred puntuación  $\geq 1.3$  para el análisis posterior (Jespersen y cols., 2017). Los epítomos de células B discontinuos se designaron a partir de la estructura de la proteína 3D. Las estructuras existentes se obtuvieron de *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>) y las estructuras de proteínas desconocidas se modelaron utilizando el servidor Phyre v2.0 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) en modo intensivo. El servidor DiscoTope 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DiscoTope/>) emplea el cálculo de la accesibilidad de la superficie y una nueva puntuación de aminoácidos de propensión al epítomo. Las puntuaciones finales se calcularon combinando las puntuaciones de propensión de los residuos en la proximidad espacial y los números de contacto (Kringelum y cols., 2012). El umbral predeterminado (-3.7) se usó para la identificación de epítomos; La sensibilidad y especificidad fueron de 0,47 y 0,75, respectivamente. El servidor ElliPro (<http://tools.iedb.org/ellipro/>) predice epítomos

de anticuerpos lineales y discontinuos basados en la estructura 3D. El servidor asocia cada epítipo predicho con una puntuación, definida como un valor de PI (Índice de protrusión) promediado sobre los residuos del epítipo. Los epítipos discontinuos se definieron en función de los valores de PI y se agrupan en función de la distancia R (en Å entre los centros de masa de cada residuo) (Ponomarenko y cols., 2008). Para las predicciones, se utilizó la distancia máxima (Å) de 6 y una puntuación mínima de 0,5.

## **6.6 Selección de epítipos**

Los epítipos se seleccionaron según los siguientes criterios: 1) epítipos de 20 mer, 2) emparejamiento de epítipos en todos los algoritmos, si es posible, y 3) potencial para unirse con el número máximo de alelos MHC-I y MHC-II.

Con el fin de identificar los epítipos T y B predichos con todos los algoritmos coincidentes, las secuencias se alinearon y se superponen utilizando el servidor Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

## **6.7 Diseño de vacuna.**

La construcción antigénica de *H. pylori* se diseñó mediante la fusión de epítipos seleccionados con enlazadores. Se utilizaron los algoritmos VaccineCAD (EpiVax Inc., RI, EE. UU.) Y EpiToolKit 2.0 (<https://www.epitoolkit.de/>) para optimizar el orden de los epítipos. Enlazan los epítipos candidatos en un diseño de cadena de cuentas, minimizando los epítipos de unión no específicos que pueden producirse en el proceso de enlace (Schubert y cols., 2015). Además, las secuencias espaciadoras Gly-Pro-Gly-Pro-Gly (GPGPG) y Lys-Lys (KK) se diseñaron en la posición interepítipo. Las secuencias de la subunidad B de toxina del cólera (CTB) y CKS9 (péptido de localización de células M) se agregaron al modelo de vacuna final en el terminal n y el terminal c, respectivamente.

## **6.8 Predicción de proteínas y validación de estructuras secundarias y terciarias.**

La estructura secundaria del antígeno multi-epítipo se predijo usando PSIPRED v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). PSIPRED es un método de predicción de estructura

secundaria simple, que integra dos redes neuronales de avance, que realizan un análisis de salida obtenido de PSI-BLAST (posición específica iterada - BLAST). La precisión de tres estados (Q3) del servidor alcanza aproximadamente el 81.6% (McGuffin y cols., 2000). El modelado de estructuras en 3D se realizó utilizando el servidor I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>). Primero recupera proteínas de plantilla de pliegues similares de la biblioteca PDB de LOMETS; a continuación, los fragmentos continuos extirpados se vuelven a ensamblar en modelos de longitud completa mediante simulaciones de Monte Carlo de intercambio de réplicas con las regiones no alineadas de subprocesamiento (principalmente bucles) construidas por el modelo ab initio. Los estados de baja energía libre se identifican mediante SPICKER agrupando los señuelos de simulación. En el tercer paso, la simulación de ensamblaje de fragmentos se realiza adicionalmente a partir de los centroides del grupo SPICKER, donde las restricciones espaciales obtenidas de las plantillas LOMETS y las estructuras de PDB por TM-align se utilizan para guiar las simulaciones. Los modelos finales atómicos completos son obtenidos por REMO, que construye los detalles atómicos de los señuelos I-TASSER seleccionados a través de la optimización de la red de enlaces de hidrógeno (Yang y Zhang 2015). El entorno operativo molecular v2014.0901 (MOE) y Jmol se utilizaron para visualizar estructuras 3D de proteínas. Para el refinamiento de la estructura del modelo 3D, se aplicaron GalaxyRefine y GalaxyLoop (<http://galaxy.seoklab.org/>). El algoritmo GalaxyRefine realiza una perturbación repetida de la estructura y la subsiguiente relajación estructural general mediante simulación de dinámica molecular. GalaxyLoop se utilizó para realizar modelado de bucle y / o modelado de término para regiones específicas (Park y cols., 2011).

El mejor modelo fue validado por ProSA-web (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), que calcula el puntaje de calidad general mediante el análisis de las coordenadas atómicas del modelo. Su puntaje se representa gráficamente y contiene el puntaje z de estructuras determinadas experimentalmente depositadas en PDB (Wiederstein y Sippl, 2007). ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) evalúa las estadísticas de las interacciones entre átomos no unidos en comparación con una base de datos de estructuras de cristalografía confiables de alta resolución (Colovos y Yeates, 1993). Las cualidades estereoquímicas



de los modelos de residuos por residuos se validaron mediante un gráfico de Ramachandran obtenido del servidor PROCHECK (<http://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) (Laskowski y cols., 2012). Se seleccionó el modelo mejor refinado.

## **6.9 Antigenicidad, alergenicidad, solubilidad y predicciones fisicoquímicas de la vacuna.**

Para predecir la antigenicidad de la vacuna, se empleó el servidor VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>). El servidor utiliza un método novedoso independiente de la alineación, que se basa en la transformación automática de la covarianza cruzada (ACC) de las secuencias de proteínas en vectores uniformes de las propiedades principales de los aminoácidos; la precisión del servidor varía de 70% a 89% (Doytchinova y Flower, 2007). Para la evaluación de alergenicidad, se utilizaron los servidores AllerTOP v. 2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/AllerTOP/index.html>) y AlgPred (<http://crdd.osdd.net/raghava/algpred/>). El servidor AlgPred permite predecir el alérgeno utilizando un enfoque combinado (el epítipo SVMc + IgE + ARPs BLAST + MAST) con una precisión de predicción del servidor de alrededor del 85% en un umbral de -0.4 (Saha y Raghava, 2006). El servidor AllerTOP se basa en la transformación de covarianza cruzada automática (ACC) de secuencias de proteínas en vectores uniformes de igual longitud (Dimitrov y cols., 2014). Para la predicción de solubilidad, se empleó el servidor SOLpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>). SOLpro predice la propensión de una proteína a ser soluble tras la sobreexpresión en *E. coli* utilizando una arquitectura SVM de dos etapas basada en representaciones múltiples de la secuencia primaria. Cada clasificador de la primera capa toma como entrada un conjunto distinto de características que describen la secuencia. Un clasificador SVM final resume las predicciones resultantes y predice si la proteína es soluble o no, así como la probabilidad correspondiente (Magnan y cols., 2009). Por último, ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) es una herramienta que permite el cálculo de varios parámetros físicos y químicos que incluyen el peso molecular, pI teórico, composición de aminoácidos, composición atómica,

coeficiente de extinción, mitad estimada -Vida, índice de inestabilidad, índice alifático y gran promedio de hidropatía (GRAVY) (Wilkins y cols., 1999).

### **6.10 Optimización del codón.**

La secuencia de codificación de DNA de la vacuna oral se optimizó para la expresión de proteínas de alto nivel en *Lactococcus lactis* utilizando el servidor On-Line de optimización de codones (<http://cool.syncti.org/index.php>). El servidor COOL se ha utilizado ampliamente para diseñar genes nativos o sintéticos para mejorar su expresión en organismos hospedadores heterólogos. La herramienta se basa en varios parámetros de diseño, como el uso de codones individuales, el emparejamiento de codones, el índice de adaptación de codones y otros (Chin y cols., 2014).

### **6.11 Construcción del vector de expresión.**

El DNA codificante fue sintetizado dentro del vector de expresión pET22-b(+) en los sitios de restricción NcoI y HindIII en los extremos 5' y 3' respectivamente. La síntesis fue llevada a cabo con GenScript. Se utilizaron 100 ng del vector pET22-b(+)-vic\_vaccine para la transformación bacteriana en *E. coli* DH5- $\alpha$  mediante choque térmico. Las clonas positivas fueron confirmadas por PCR y digestión enzimática usando las enzimas NcoI y HindIII. Una de las clonas positivas fue seleccionada para realizar un cultivo en 100 mL de Caldo LB más 100  $\mu$ g/mL de ampicilina hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm  $\leq$  1.0 que permitió realizar una extracción de DNA plasmídico a escala Maxiprep. 100 ng del plásmido fueron utilizados para la transformación en *E. coli* BL-21 mediante choque térmico. Las clonas fueron seleccionadas. Por otro lado, 1  $\mu$ g del plásmido obtenido fue utilizado para digestión enzimática con NcoI y HindIII a 37°C durante 1 h. Los productos de la digestión enzimática fueron cargados a un gel de agarosa al 0.8%. El inserto fue purificado utilizando el kit comercial Gel DNA recovery (Zymo research) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se realizó la linealización del vector final de expresión pNZ8048:GFP usando enzimas de digestión NcoI y HindII para liberar el inserto de 750 bp correspondiente a la proteína verde fluorescente. El producto de la digestión enzimática fue cargado a un gel de agarosa al 0.8% para la purificación del fragmento

correspondiente al vector linearizado usando el Kit anteriormente mencionado. El inserto fue ligado dentro del vector de expresión pNZ8048 utilizando DNA Ligasa T4 (Promega) y transformadas dentro de células de *L. lactis* pNZ8048 (Stratagene, USA) electrocompetentes por electroporación a 2000 volts con un pulso de 4.5 a 5.5 mseg. Las clonas positivas fueron seleccionadas en agar M17 conteniendo cloranfenicol. Las células fueron expandidas y fueron preservadas en glicerol al 20% a -80°C. El crecimiento del cultivo de *L. lactis* con el vector recombinante fué cuantificado por absorbancia a 600 nm por 30 h después de la inoculación en 1 L de caldo de M17 conteniendo 10 µg/mL de cloranfenicol a 30°C, sin agitación.

### **6.12 Expresión de antígenos recombinantes.**

Células de *L. lactis* transformadas con el plásmido recombinante pNZ8048-antígeno fueron cultivadas a 30°C, luego de 3 h de inducción con 10 ng/mL de nisina, en 2 L de medio de cultivo, hasta alcanzar la fase log media ( $DO_{610\text{ nm}}=0.600$ ). Las células fueron centrifugadas, lavadas con tampón fosfato 10 mM en frío a pH 7.4 y congeladas hasta su uso. Para cada ensayo, 1g (peso seco) de células fueron resuspendidas en 10 mL de solución de lisis (Urea al 8M, fosfato de sodio al 50 mM, NaCl al 500 mM, Triton X-100 al 1%, imidazol al 30 mM. pH 8.0) y homogenizada por 3 ciclos de sonicación por 5 min cada uno. El material insoluble fue separado por centrifugación a 30,000 x g por 30 min a 4°C (Beckman 64R, USA) el sobrenadante fue purificado en columnas HisTrap FF de 1mL (GE healthcare) como se describe a continuación.

### **6.13 Purificación del antígeno recombinante.**

El antígeno recombinante fue purificado usando su etiqueta 6xHis a través de cromatografía de afinidad catiónica con resina de Sefarosa Ni (GE healthcare, USA) usando un sistema de purificación AKTA (GE healthcare, USA), las proteína fueron eluidas con un gradiente de Imidazol (hasta 500 mM) en tampón conteniendo 20 mM de Tris-HCL (pH=7.4), 300 mM NaCL. La concentración de proteína fue determinada con el ensayo de reactivo de Bradford (Bio-Rad, USA) usando BSA como un estándar, medición a 280 nm en un nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA)

## **6.14 SDS-PAGE**

Para confirmar la presencia e integridad del antígeno extraído y purificado, las muestras fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (NuPAGE, Invitrogen, UK) y la corrida se realizó a 200 volts durante 35 min. Después de la migración el gel fue teñido con azul de Coomassie para la visualización. Se utilizó el ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) para el análisis de imagen.

## **6.15 Western Blot.**

Las muestras fueron transferidas del gel de poliacrilamida a membranas de polivinil difluoruro PVDF (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) usando un sistema de transferencia por 1 h a 0.8 mA/cm<sup>2</sup> membrana. La membrana fue lavada y bloqueada por incubación con 10% de leche desnatada en polvo (Merck, Alemania) disuelta en PBS 10 mM pH.7.4 conteniendo 0.05% (v/v) de Tween 20 (PBST; Sigma-Aldrich, Alemania) por 1 h bajo agitación constante a 100 rpm. Las membranas fueron incubadas por 2 h a temperatura ambiente con anti-6XHis tag de ratón diluida en tampón de bloqueo (1:1700), bajo agitación constante. Después del lavado, la membrana fue incubada con un segundo anticuerpo Anti-ratón IgG conjugado peróxidasa de rábano HRP (Sigma-Aldrich, Alemania), diluido 1:2000 en tampón de bloqueo por 2 h a temperatura ambiente.

La capacidad de anti-ratón 6XHis de reconocer el antígeno recombinante fue revelado mediante sistema de detección de quimioluminiscencia (Pierce, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante.

## **6.16 Inmunoreactividad de la vacuna recombinante mediante ELISA.**

Se evaluaron 35 sueros de pacientes infectados naturalmente. Brevemente, se colocaron 100 µL del antígeno recombinante purificado por pocillo a una concentración de 20 µg/mL de proteína, un blanco (PBS), un control negativo (lisado completo de *E. coli* en PBS) y como control positivo (lisado completo de *H. pylori* J99), seguido de una incubación de 2 hrs a 37° C. Inmediatamente se lavó por 5 minutos cada pocillo con PBST 3 veces.

Posteriormente se procedió a bloquear con 200  $\mu$ L de leche descremada al 5% en PBST e incubar por 2 hrs a la temperatura ambiente. Se lavó 3 veces con PBST e inmediatamente se agregaron 100  $\mu$ L del anticuerpo primario en PBST. Se incubó la placa durante 60 min a 37° C. Una vez terminada la incubación se lavó 3 veces con PBST. Se agregaron 100  $\mu$ L de IgG anti-humana conjugada a HRP producido en cabra (Sigma CAT #A8667) a una dilución de 1:30,000 a 37°C en PBST y se incubó la placa durante 90 min a 37°C. Se lavó la placa 3 veces con PBST. Se desarrolló la reacción mediante la adición de 200  $\mu$ L del sustrato o-fenildiamina (Sigma CAT #P8287) y se incubó durante 30 minutos en oscuridad. Se leyeron las absorbancias a 405, 450 y 490 nm.

### **6.17 Análisis estadístico.**

Se utilizó el paquete estadístico SPSS v.22 para obtener los valores promedios, desviaciones típicas, posteriormente se empleó la prueba ANOVA de una vía para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que constó el experimento (control y tratamientos). En los casos que se encontró diferencia entre los grupos, se empleó la prueba de *t* de Student para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media entre los tratamientos y del grupo control.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Selección y evaluación de proteínas.

Nuestra búsqueda de literatura combinada llevó a la identificación de un total de once proteínas *H. pylori*. UreB se ha informado en muchos estudios para la capacidad antigénica; VacA, CagA, GGT, NapA y OipA son las principales proteínas involucradas en los mecanismos patógenos. HpaA, FlaA, FecA, BabA y SabA fueron seleccionados por su participación en los procesos de adhesión y colonización.

Las proteínas seleccionadas se seleccionaron más a fondo en el siguiente paso para obtener parámetros adicionales que incluyan la localización subcelular, la esencialidad, la virulencia, la homología no humana, las hélices TM y el peso molecular. Nuestras predicciones de la localización subcelular por CELLO mostraron que UreB y NapA poseían una localización citoplasmática; CagA, FlaA, VacA y BabA fueron extracelulares, mientras que OipA, SabA, HpaA y FecA se predijeron como proteínas de la membrana externa. Además, GGT se clasificó como una proteína periplásmica, como se muestra en la Tabla 1. En el análisis de genes esenciales por OGEE, se identificaron los genes HP1118 (GGT) y HP0807 (FecA). Además, 9 de las 11 proteínas se encontraron en la base de datos de factores de virulencia de PATRIC, FecA y GGT no se identificaron en esta categoría. El análisis de homología de las once proteínas priorizadas utilizando BLASTp reveló una identidad de  $\leq 30\%$ , lo que fue significativo para declarar las secuencias como homólogos no humanos. La predicción de la topología de proteínas por TMHMM mostró que VacA y GGT tenían una hélice TM, mientras que otras proteínas no revelan la presencia de ninguna de estas topologías. VacA y GGT mostraron la presencia de una hélice TM ubicada en 35-57 y en 5-27 posiciones de aminoácidos, respectivamente. Finalmente, los pesos moleculares calculados por la herramienta Compute pI / Mw de nueve proteínas tuvieron un peso inferior a 110 kDa, mientras que VacA y CagA tienen pesos moleculares de 139.3 kDa y 132.4 kDa, respectivamente (Tabla 1).

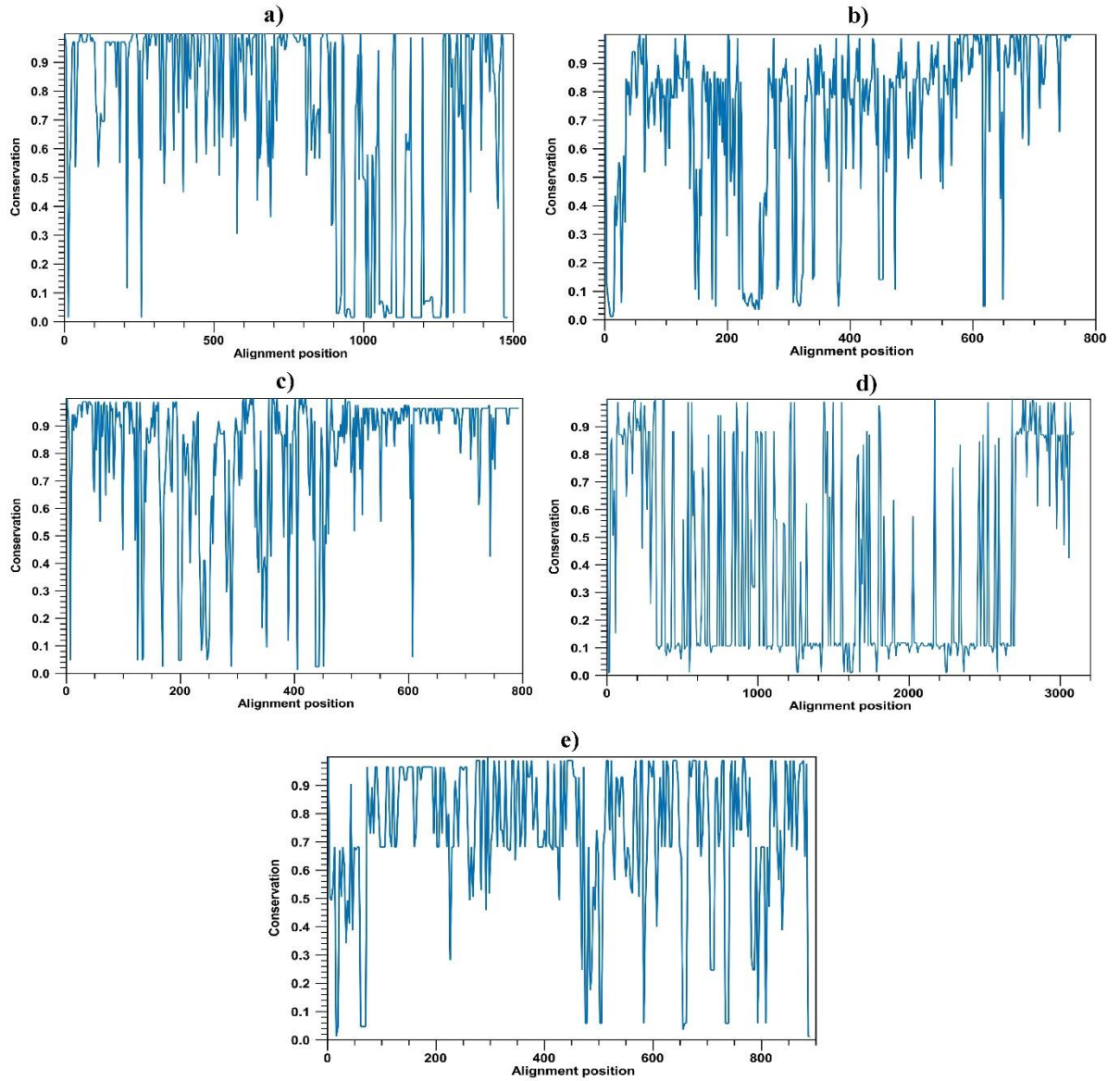
**Tabla 1. Evaluación de las proteínas seleccionadas de *H. pylori*.**

Protein	Accession No	Locus tag	Subcellular localization	Gene Essentiality	Virulent protein	Human homology	TM helix	pI/MW
UreB	NP_206872.1	HP0072	C	N-E	V	N-H	0	5.64/61.68 kDa
NapA	NP_207041.1	HP0243	C	N-E	V	N-H	0	5.59/16.93 kDa
CagA	NP_207343.1	HP0547	E	N-E	V	N-H	0	8.82/132.4 kDa
FlaA	NP_207396.1	HP0601	E	N-E	V	N-H	0	6.03/53.3 kDa
OipA	NP_207432.1	HP0638	OM	N-E	V	N-H	0	9.78/34.2 kDa
SabA	NP_207519.1	HP0725	OM	N-E	V	N-H	0	9.12/69.4 kDa
HpaA	NP_207590.1	HP0797	OM	N-E	V	N-H	0	8.60/29.0 kDa
FecA	NP_207600.1	HP0807	OM	E	N-V	N-H	0	9.66/88.9 kDa
VacA	NP_207680.1	HP0887	E	N-E	V	N-H	1 (35-57 aa)	9.02/139.3 kDa
GGT	NP_207909.1	HP1118	P	E	V	N-H	1 (5-27 aa)	9.27/61.2 kDa
BabA	NP_208035.1	HP1243	E	N-E	V	N-H	0	8.95/79.1 kDa

C: citoplasmática, E: extracelular, OM: membrana externa, P: periplasmática, N-E: no esencial, E: esencial, V: virulenta, N-V: no virulenta, N-H: no homóloga.

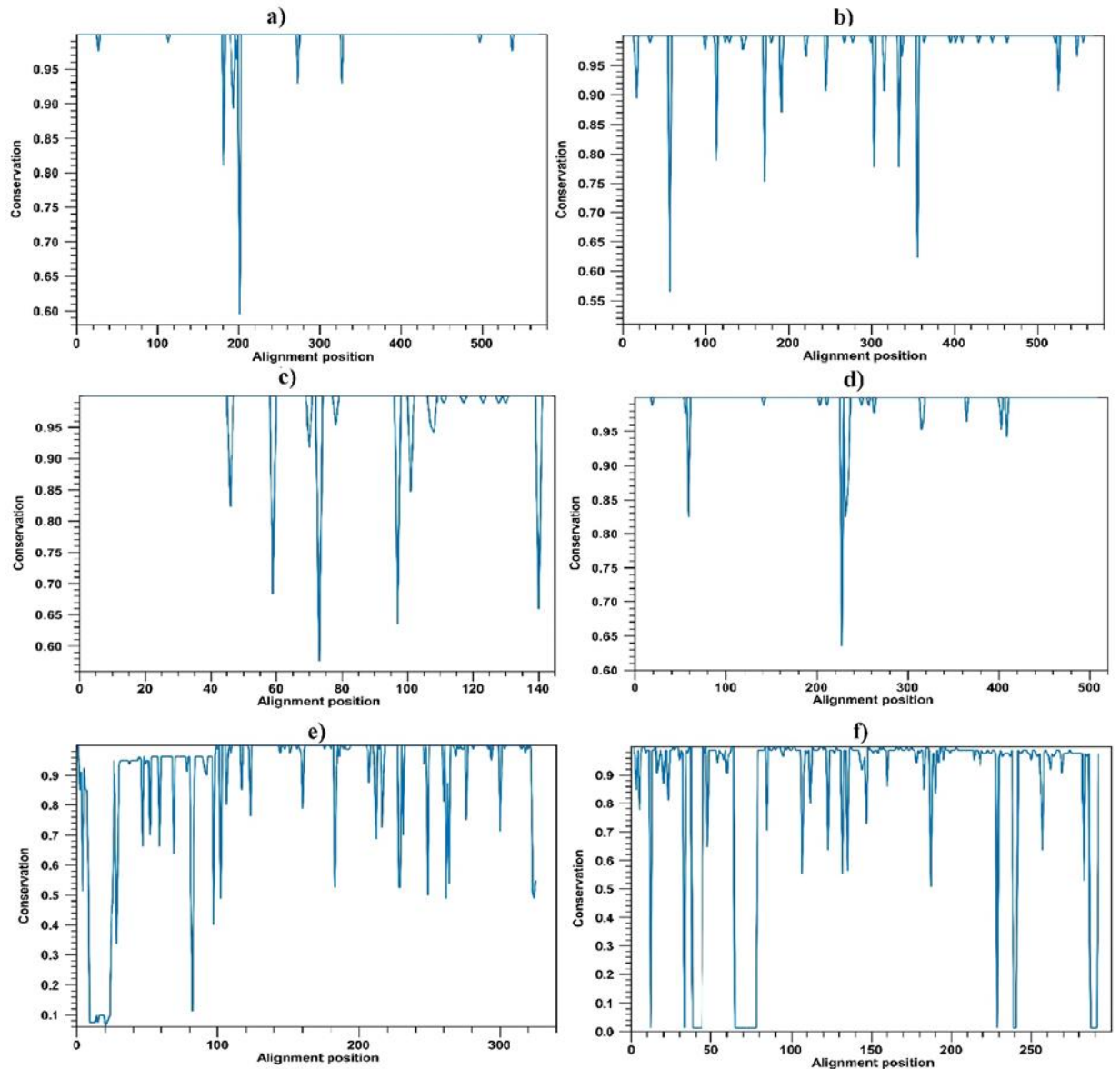
## 7.2 Antígeno de consenso

Con el fin de desarrollar una vacuna contra *H. pylori* de amplio espectro, se realizó un análisis de conservación de los antígenos seleccionados. Las secuencias de aminoácidos de cada proteína se compararon y alinearon con ochenta y cinco secuencias correspondientes a genomas completamente anotados de *H. pylori* en el momento del estudio. Se observó una alta variabilidad en las proteínas CagA, VacA, FecA, BabA y SabA, como se muestra en la Fig. 1. Por lo tanto, se obtuvo una secuencia de consenso de cada proteína para los análisis de predicción de los epítomos T y B. Por otro lado, las proteínas con el mayor porcentaje ( $\geq 95\%$ ) de conservación fueron UreB, NapA, GGT, FlaA, HpaA y OipA (Fig. 2).



**Figura 1. Análisis de conservación de proteínas seleccionadas.** Secuencias de proteínas completas entre los 85 genomas anotados de *H. pylori* se alinearon utilizando CLC Main workbench y las puntuaciones de conservación se representaron en un gráfico de líneas 2D. (a) CagA, (b) SabA, (c) BabA, (d) VacA y (e) FecA.





**Figura 2. Análisis de conservación de proteínas seleccionadas.** Secuencias de proteínas completas entre los 85 genomas anotados de *H. pylori* se alinearon utilizando CLC Main workbench. (a) UreB, (b) GGT, (c) NapA, (d) FlaA, (e) OipA y (f) HpaA.

### 7.3 Epítomos de células T y B

El análisis de predicción realizado por diferentes servidores de bioinformática para células T y B (utilizando alelos MHC-I / -II para BALB / c humano y de ratón) permitió la selección de once epítomos según su puntuación, número de alelos y acuerdo entre los servidores utilizados. Los epítomos obtenidos fueron NapA (residuo 30-49), CagA (residuo 1103-1122), FlaA (residuo 487-506), OipA (residuo 211-230), GGT (residuo

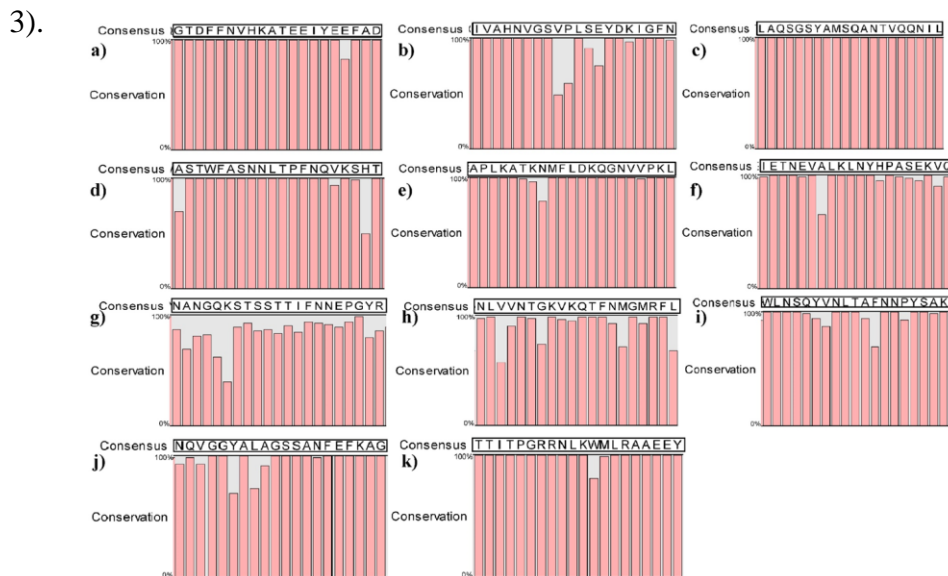
106-126), HpaA (residuo 33-52), BabA (residuo 129-149), FecA (residuo 437-456), SabA (residuo 540-559), VacA (residuo 459-478) y UreB (residuos 170-189) (Tabla 2).

**Tabla 2. Epítomos predichos potencialmente antigénicos por diferentes servidores.**

Order	Protein	Position	Sequence	B-cell epitopes						T-cell epitopes					
				BepiPred	BCPRE D	ABCpred	DiscoTope	EliPro	BcePred	IEDB		ProPred		NetMHC	
										I	II	I	II	I	II
1	NapA	30-49	GTDFFNVHKATEEIIYEEFAD	0.520	0.573	0.31	-7.806	0.511	0.826	6H	5H	17H	10H	31H	12F
2	CagA	1103-1122	IVAHNVGVSPLSEYDKIGIFN	0.087	0.45	0.86	-0.852	0.928	0.953	2M	0M	3M	16H	1M	0M
3	FlaA	487-506	LAQSGSYAMSQANTVQQNIL	0.136	0.363	0.82	-4.984	0.916	0.935	8H	6H	24H	16H	34H	7H
4	OipA	211-230	ASTWFASNNLTPFNQVKSH	0.557	0.892	0.35	-2.603	0.564	0.714	3M	0M	6M	10H	1M	0M
5	GGT	106-126	APLKATKNMFLDKGGNVVVKL	0.553	0.697	0.42	-5.047	0.705	0.925	10H	5H	19H	10H	46H	13F
6	HpaA	33-52	IETNEVALKLNYPASEKVVQ	0.627	0.21	0.8	-5.593	0.401	0.812	3M	1M	5M	3H	2M	1M
7	BabA	129-149	NANGQKSTSSTTIFNNPEGYR	1.243	0.969	0.67	-11.203	0.678	0.812	10H	2H	27H	3H	46H	11F
8	FecA	437-456	NLVVNTGKVKQTFNMGMRFL	-0.398	0.617	0.85	-3.091	0.681	0.842	2M	0M	3M	2M	0M	0M
9	SabA	540-559	WLNSQYVNLTAFNPNPYSKAV	0.546	0.621	0.76	-4.667	0.907	0.885	2M	1M	6M	11H	43H	14F
10	VacA	459-478	NQVGGYALAGSSANFEFKAG	0.563	0.558	0.85	-13.843	0.261	0.893	8H	4H	29H	11H	2M	0M
11	UreB	170-189	TTITPGRRLKRWMLRAAEEY	0.649	0.845	0.87	-3.764	0.584	0.790	2M	1M	6M	2M	2M	0M

H: human, M: mouse, I: MHC class I, II: MHC class II

Se evaluó la conservación de residuo a residuo de los epítomos seleccionados; Se utilizó la cepa de *H. pylori* 26695 como referencia. CagA 1103-1122, BabA 129-149 y FecA 437-456 mostraron un cambio de aminoácido, OipA 211-230 mostró dos cambios (Fig. 3).



**Figura 3. Conservación de los epítomos seleccionados entre las cepas de *H. pylori*.** El porcentaje de conservación de cada residuo se muestra en una gráfica de barras. (a)NapA 30-49, (b)CagA 1103-1122, (c)FlaA 487-506, (d)OipA 211-230, (e)GGT 106-126, (f)HpaA 33-52, (g)BabA 129-149, (h)FecA 437-456, (i) SabA 540-559, (j)VacA 459-478 y (k)UreB 170-189.

## 7.4 Diseño de antígeno multi-epítipo.

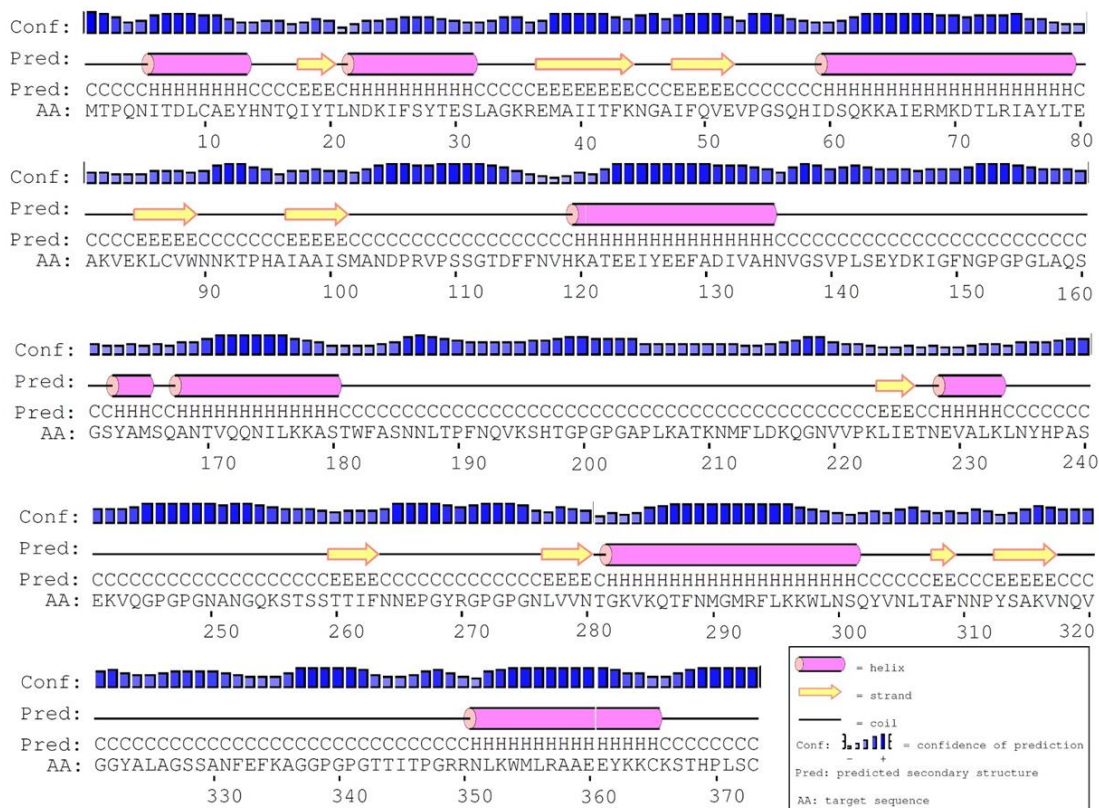
La vacuna final consiste en la subunidad adyuvante B de la toxina del cólera (CTB, CAA53976.1) en el terminal N fusionado con once epítomos de *H. pylori* separados por enlazadores (DPRVPSS, GPGPG y KK) y fusionados con una célula M péptido de direccionamiento (CKS9) en el C-terminal. El diagrama esquemático de la vacuna se muestra en la Fig. 4.



**Figura 4. Diagrama esquemático de la construcción del antígeno multi-epítipo.** La vacuna consiste de un adyuvante N-terminal unido a 11 epítomos fusionados por secuencias de enlace (GPGPG o KK) y CKS9 en el extremo C-terminal.

## 7.5 Predicción y validación de la estructura proteica.

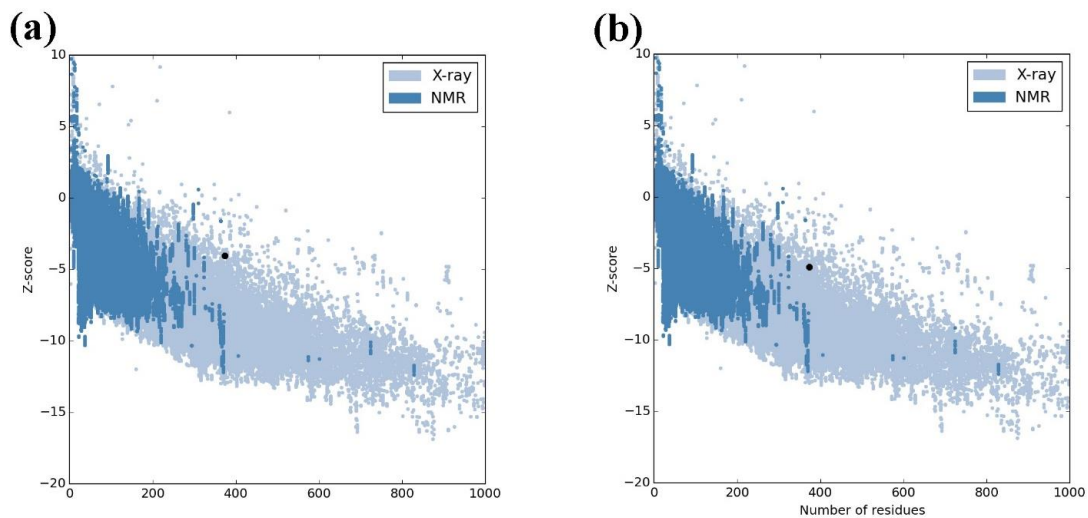
La vacuna está compuesta por 373 aminoácidos y la predicción de la estructura secundaria por PSIPRED mostró que contiene 35% de hélices alfa, 14.0% de hojas beta y 49.0% de otras (bobina aleatoria y giro beta), como se muestra en la Fig. 5.



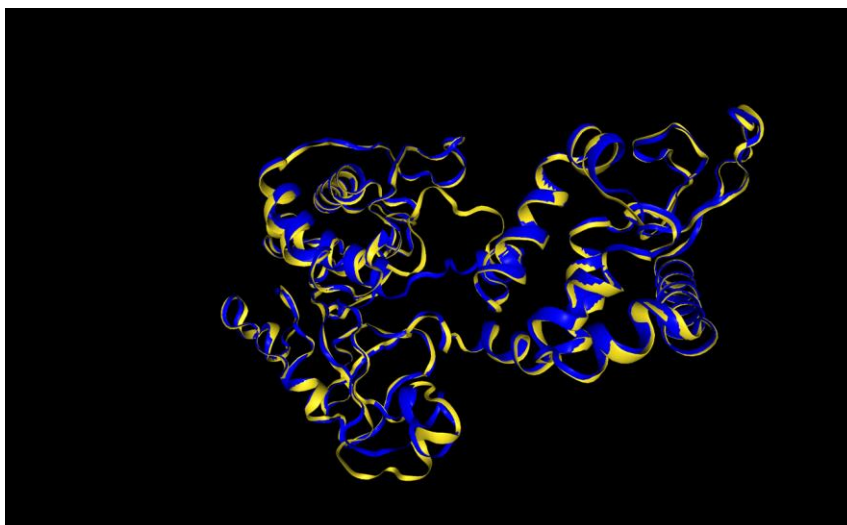
**Figura 5. Predicción de la estructura secundaria de la vacuna por PSIPRED.** La vacuna consiste de 35% de hélices alfa (H, cilindro púrpura), 14% láminas beta (E, flechas amarillas) y 49% *random coil* (C, línea negra). Las barras de color azul representan el porcentaje de confianza.

El modelo 3D de la vacuna fue predicho por el programa I-TASSER. Se generaron cinco modelos 3D de la vacuna proteica, de los cuales se seleccionó el modelo con la puntuación C más alta = -0.62 para un mayor refinamiento; el rango de puntuación C suele ser de -5 a 2, cuanto mayor sea el valor, mayor será la confianza.

La calidad y los posibles errores en el mejor modelo fueron analizados por el servidor ProSA-web, ERRAT y RAMPAGE. El puntaje Z inicial del modelo de entrada fue -4.03, que se encuentra dentro de los observados comúnmente en proteínas nativas de tamaño similar (Fig. 6a). El resultado obtenido de ProSA-web indicó que el modelo preliminar requiere procesos de refinamiento. Por lo tanto, el modelo bruto se sometió a refinamiento de bucle y minimización de energía para lograr un modelo 3D de alta calidad. Después de todos los procedimientos de refinamiento, el factor ERRAT mejoró de 68.8 a 83.3. La puntuación z del modelo final alcanzó un valor de -4.9 (Fig. 6b). Los modelos de arranque y refinado se superponen en la Fig. 7.

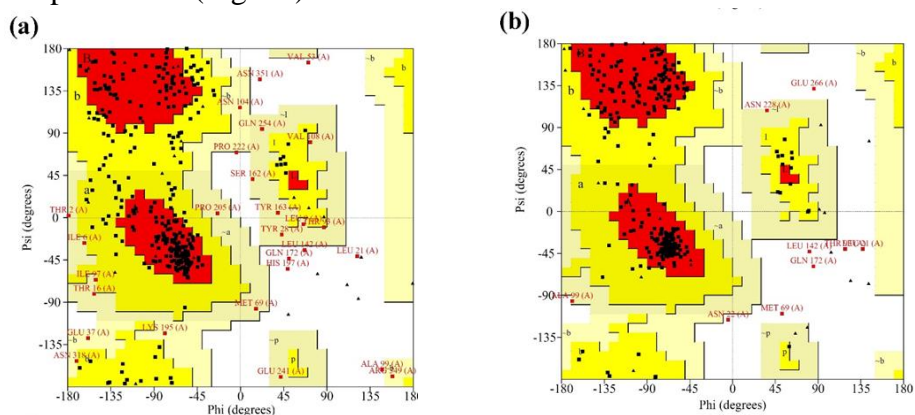


**Figure 6. El z-score de la estructura 3D sin refinar y refinada de la vacuna por ProSA-web.** (a) El z-score del modelo inicial fue -4.03, (b) El z-score del modelo después de refinado fue -4.9. El z-score indica la calidad del modelo y es mostrado como un punto negro. El grafico de z-score contiene el z-scores de todas las cadenas de las proteínas determinadas experimentalmente en PDB de espectroscopia NMR (azul oscuro) y cristalografía de rayos X (celeste).



**Figure 7. Comparación del modelo inicial y refinado de la vacuna por el programa MOE.** Los modelos inicial y final son coloreados en amarillo y azul, respectivamente.

Para validar los modelos 3D de proteínas, se realizó un análisis de parcelas de Ramachandran antes y después de los procesos de refinamiento. Las parcelas de Ramachandran del modelo sin refinar indicaron que el 63,5% de los residuos estaban ubicados en las regiones más favorecidas, el 28,6% en la región adicional permitida, el 5,7% en las regiones generosamente permitidas y el 2,2% en las regiones prohibidas de la parcela (Fig. 8a). El modelo refinado mostró que el 85,1% de los residuos estaban ubicados en las regiones más favorecidas, el 12,1% en las regiones adicionales permitidas, el 0,6% en las regiones generosamente permitidas y solo el 2,2% en las regiones prohibidas (Fig. 8b).



**Figura 8. Validación del modelo 3D de la vacuna usando el gráfico de Ramachandran.** El gráfico de Ramachandran de (a) modelo sin refinar and (b) modelo refinado. Regiones más favorables (A, B y L) y adicionalmente permitidas (a, b, l y p) regiones de muestran con color rojo y amarillo, respectivamente. Regiones generosamente permitidas (~a, ~b, ~l y ~p) son indicadas en amarillo pálido, y las regiones no

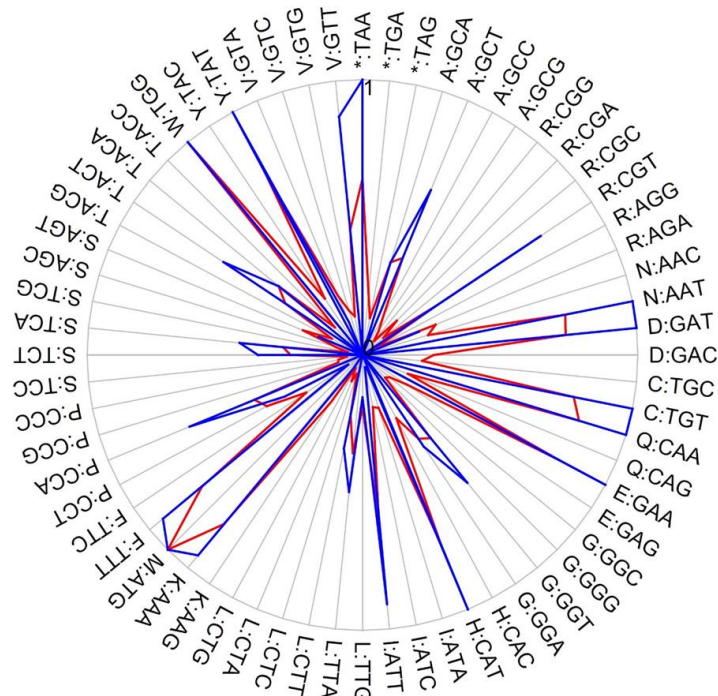
permitidas en blanco. Residuos de glicina se muestran en triángulo negro y los demás residuos se muestran en cuadros negros.

## **7.6 Antigenicidad, alergenicidad, solubilidad y parámetros fisicoquímicos de la vacuna.**

La antigenicidad de la vacuna fue estimada por VaxiJen. Se obtuvo una puntuación de antigenicidad de 0.5547 en el umbral de 0.4 para el modelo bacteriano. La alergenicidad de la proteína, que se evaluó mediante dos métodos, mostró que la vacuna no es alérgica. El peso molecular y el pI teórico de la proteína fueron 40.7 kDa y 9.36, respectivamente. La solubilidad de la vacuna de proteína recombinante con la sobreexpresión en *E. coli* se predijo con la probabilidad de 0.821589. Se estimó que la vida media era de 30 h en reticulocitos de mamíferos, > 20 h en levadura y > 10 h en *E. coli*. El índice de inestabilidad (II) se calculó en 32.58, lo que clasificó la vacuna como estable. GRAVY y el índice alifático se evaluaron -0.485 y 67.77 respectivamente.

## **7.7 Optimización del codón para la expresión en *L. lactis*.**

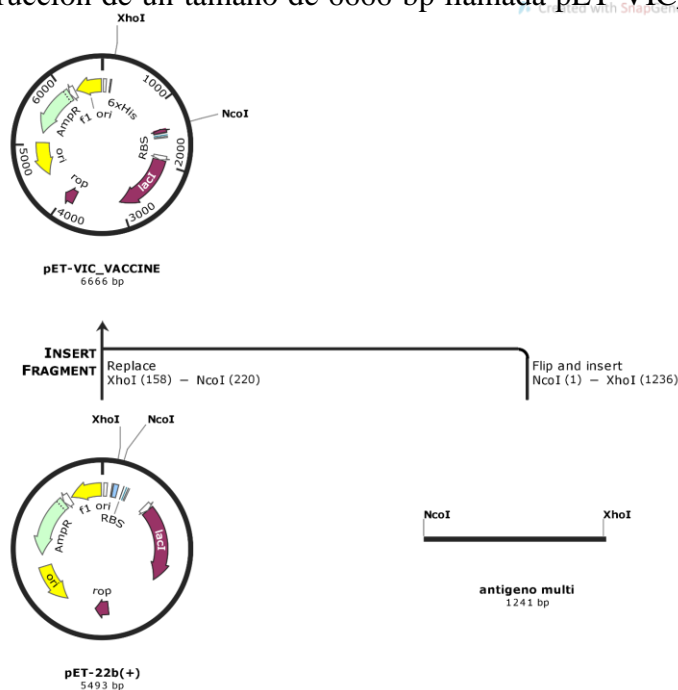
La traducción inversa y la optimización del codón de la secuencia de la vacuna proteica se llevaron a cabo simultáneamente por el servidor COOL para obtener la secuencia de DNA optimizada por el codón para la máxima expresión de la proteína en *L. lactis*. El índice de adaptación de codones (CAI) de la secuencia del gen fue 0,9464; un CAI > 0.8 es aceptable para expresión de alto nivel en el huésped de *L. lactis* (Fig. 9). El estado físico del contenido de GC, el estado físico del codón individual, el estado físico de autocorrelación del codón y la inestabilidad del plegado de 5' RNA fueron -0.0062602, -0.1577, -0.099844 y -1.9, respectivamente. El contenido total de GC fue del 31,63%; el rango ideal de porcentaje de contenido de GC osciló entre 30% y 70%. No se encontraron elementos CIS negativos y secuencias repetidas en el gen optimizado. Se encontraron un total de 78 codones de parada ocultos; Se excluyeron las secuencias de RNAm de Shine-Dalgarno. Para clonar el gen en el vector lanzadera *E. coli-L. lactis*, pNZ8048, los sitios de restricción NcoI y HindIII se introdujeron en los extremos 5' y 3' de la secuencia de DNA, respectivamente.



**Figura 9. Comparación del uso de codones individuales entre el host y las secuencias optimizadas.** El host y las secuencias optimizadas se muestran en líneas rojas y azules, respectivamente

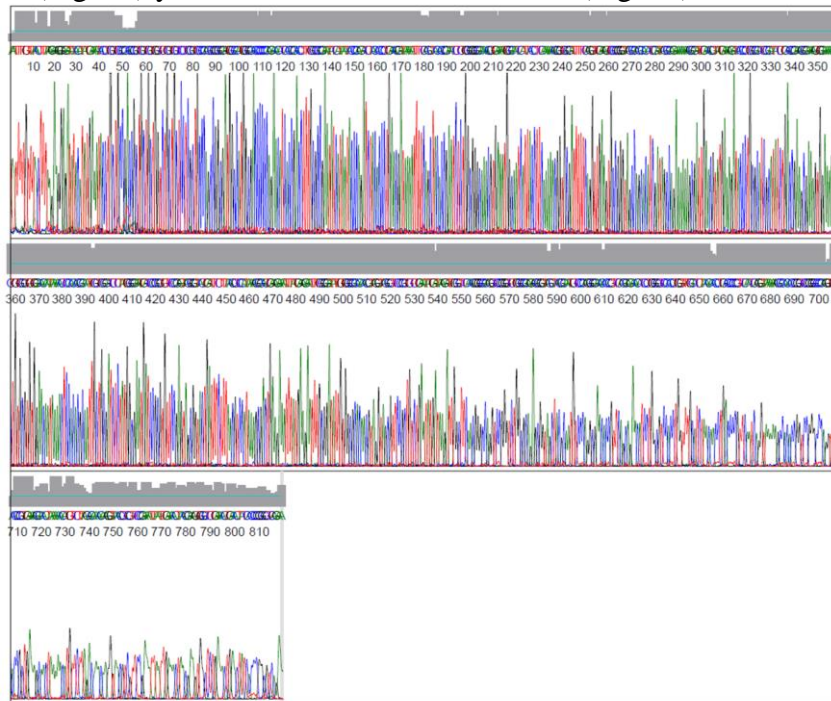
### 7.8 Construcción del vector inicial de expresión.

La secuencia de DNA codificante al antígeno multi-epitopo con un tamaño de 1241 bp fue sintetizada junto al vector PET-22b (+) en los sitios de restricción NcoI y XhoI para obtener una construcción de un tamaño de 6666 bp llamada pET-VIC\_VACCINE (Fig. 10)



**Figura 10. Esquema de la construcción de pET-VIC\_VACCINE.** La secuencia de DNA codificante al antígeno multi-epitopo con un tamaño de 1241 bp fue sintetizada junto al vector PET-22b (+) en los sitios de restricción NcoI y XhoI para obtener una construcción de un tamaño de 6666 bp.

Se realizó un análisis de secuenciación automatizada para verificar potenciales mutaciones en la secuencia y para conocer la orientación del inserto desde el sitio promotor (Fig. 11) y de la secuencia de terminación (Fig. 12) del vector.



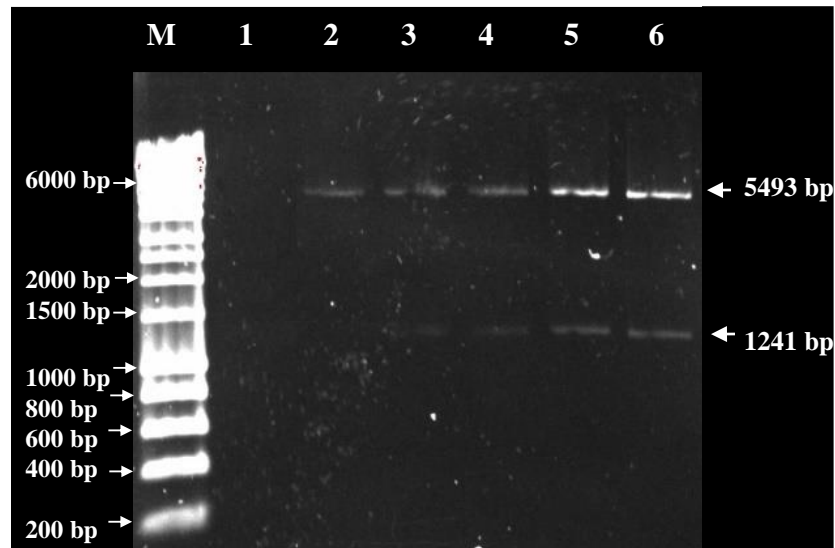
**Figura 11. Análisis de secuenciación automatizada de la construcción pET-VIC\_VACCINE.** Electroferogramas desde la región promotor T7 usando el oligonucleótido T7 Fwd.



**Figura 12. Análisis de secuenciación automatizada de la construcción pET-VIC\_VACCINE.** Electroferogramas desde la región terminador T7 usando el oligonucleótido T7 Rv.

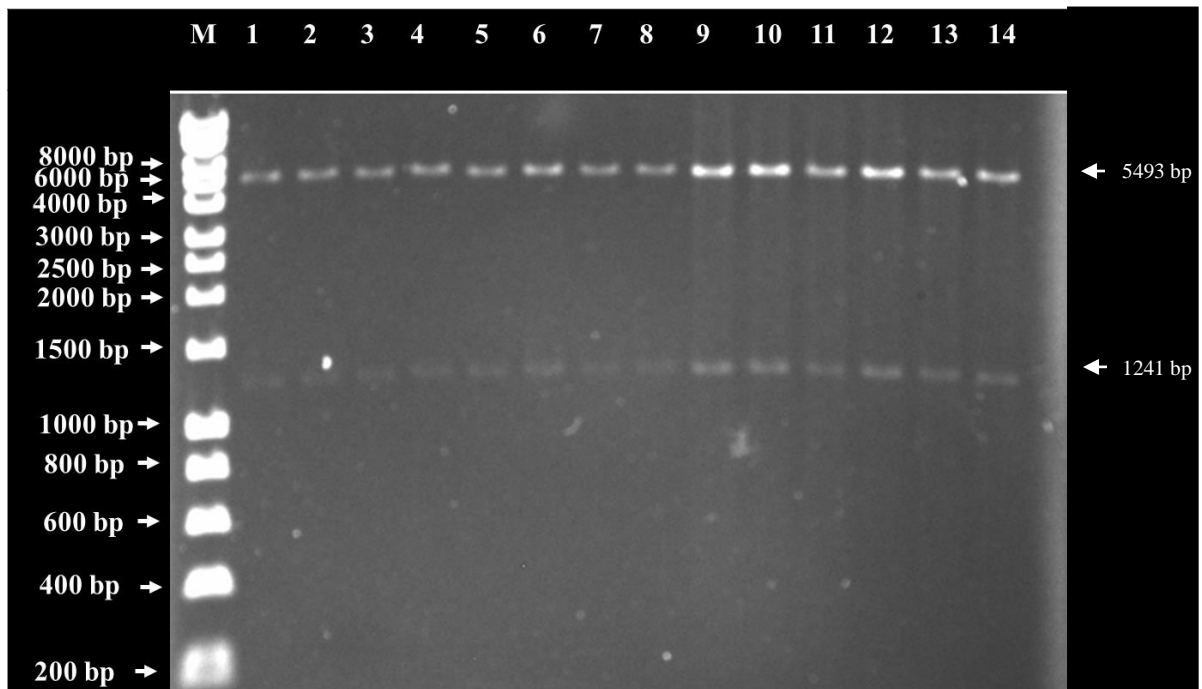


Se realizó una digestión enzimática con las enzimas NcoI y XhoI a diferentes concentraciones del vector para verificar la construcción y si los sitios de corte eran adecuados para liberar nuestro inserto de interés (Fig. 13)



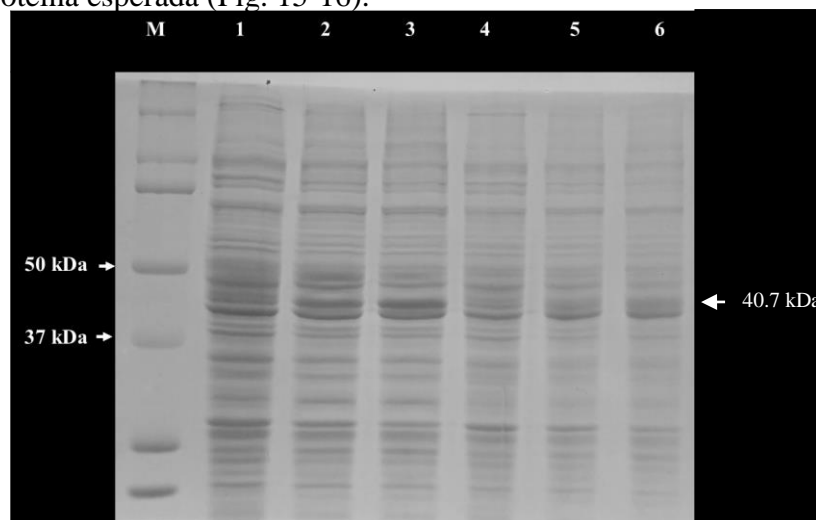
**Figura 13. Digestión enzimática con NcoI y XhoI del pET-VIC\_VACCINE.** Se realizaron digestiones enzimáticas usando diluciones seriadas del plásmido desde 0, 10, 20, 40 80 y 160 ng correspondientes a los carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente. M, marcador de peso molecular de DNA 0.1-10 kb.

Se realizó la transformación en *E. coli* DH5- $\alpha$  mediante choque térmico y seleccionamos 8 clonas positivas al azar para la extracción de DNA plasmídico a escala de miniprep. 100 ng de cada extracción fueron necesarios para digestión enzimática con las enzimas NcoI y XhoI. Las reacciones de digestión fueron cargadas a un gel de agarosa al 0.8% donde pudimos identificar que todas las clonas contenían dos bandas, una correspondiente al inserto y la otra al vector linearizado (Fig. 14). Realizamos un cultivo para la obtención del plásmido a escala Maxiprep de una de las clonas. Posteriormente realizamos la transformación bacteriana en *E. coli* Bl-21 mediante choque térmico, seleccionamos 7 clonas al azar y de igual forma pudimos identificar en todas las clonas la presencia de nuestro vector e inserto de interés, como se observa en la figura 14.

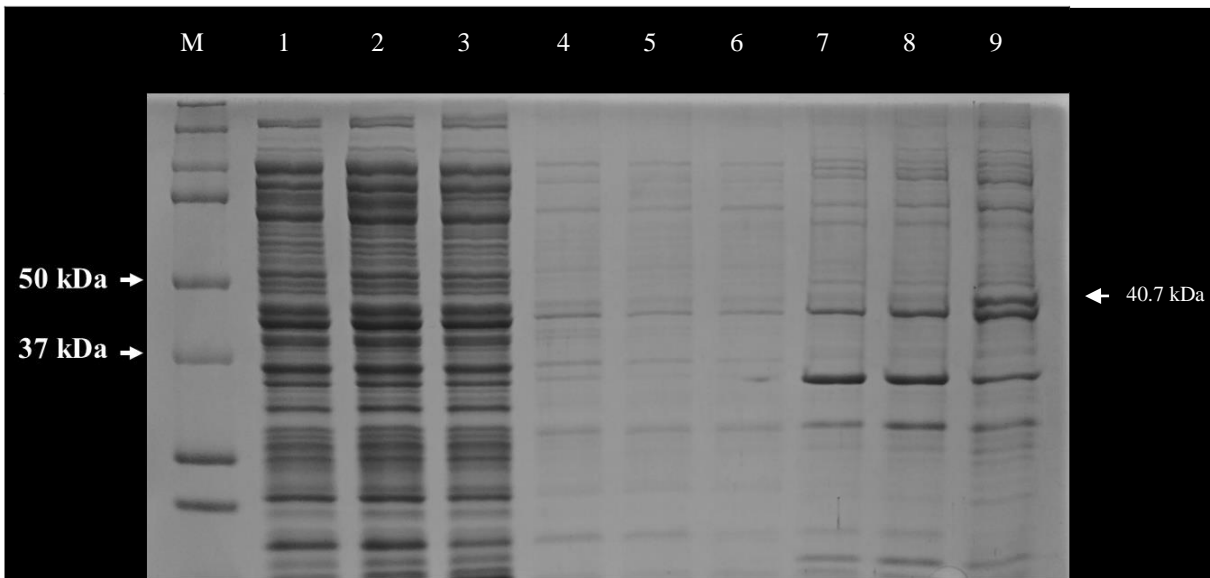


**Figura 14. Digestión enzimática con NcoI y XhoI de las clonas *E. coli* DH5- $\alpha$ .** Se realizó un extracción de DNA plasmídico a escala miniprep fueron digeridos y cargados. Clonas DH5- $\alpha$  carriles del 1 al 8 y BL-21 carriles del 9 al 14.

Realizamos una inducción de la expresión del antígeno en una de las clonas de *E. coli* BL-21 a temperaturas de 37°C y 30°C, además utilizamos dos concentración de IPTG 0.5 mM y 1 mM. Donde pudimos observar la presencia de una banda correspondiente al peso de la proteína esperada (Fig. 15-16).

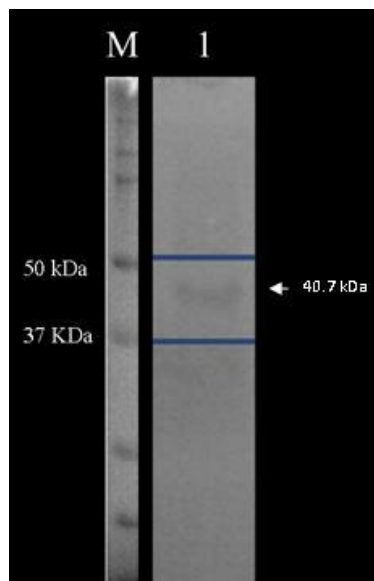


**Figura 15. Expresión del antígeno multi-epítipo en *E. coli* BL-21.** Extracción de proteínas totales. Carriles 1 al 3 a 30°C, carriles 4 al 6 a 37°C. carril 1 y 4 sin inducir, carril 2 y 5 con IPTG al 0.5 mM, carriles 3 y 6 con IPTG al 1 mM.



**Figura 16. Expresión del antígeno multi-epítopo en *E. coli* BL-21 en cuerpos de inclusión con Urea al 10 M.** Carriles 1 al 3 proteínas totales, carriles 4 al 6 a proteínas periplasmáticas y carriles 7 al 9 a proteínas solubilizadas con cuerpos de inclusión. Carriles 1, 4 y 7 sin inducir, carril 2, 5 y 8 con IPTG al 0.5 mM, carriles 3, 6 y 9 con IPTG al 1 mM.

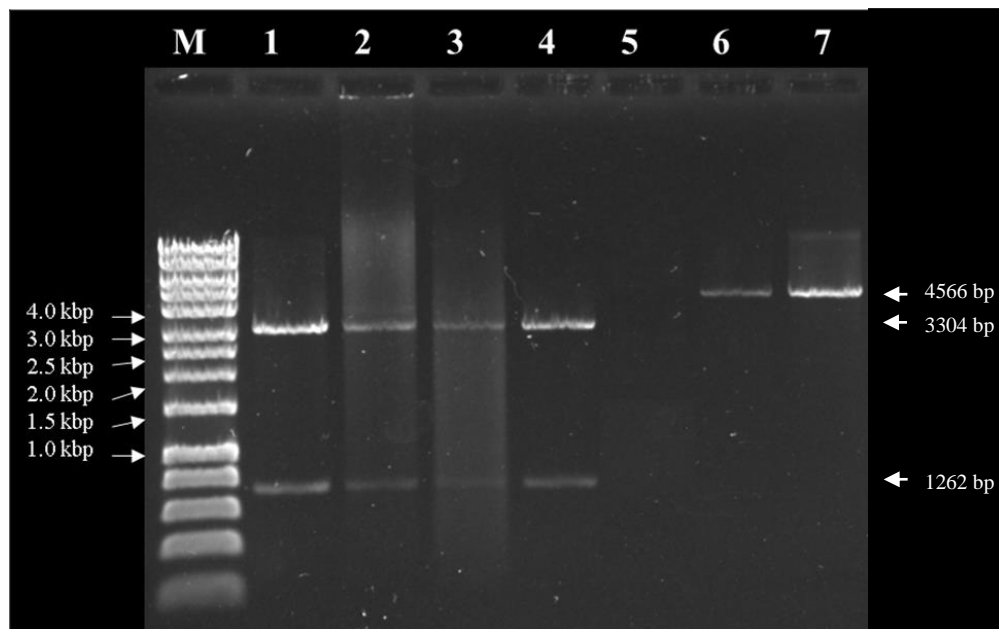
Realizamos un western blot utilizando la etiqueta de 6 histidinas ubicada en el extremo C terminal de nuestro antígeno multi-epítopo. Pudimos observar la señal de quimioluminiscencia correspondiente al tamaño de nuestro antígeno de interés (Fig. 17).



**Figura 17. Expresión del antígeno multi-epítopo en *E. coli* BL-21 por western blot.** M, marcador de peso de proteínas; carril 1, producto de purificación.

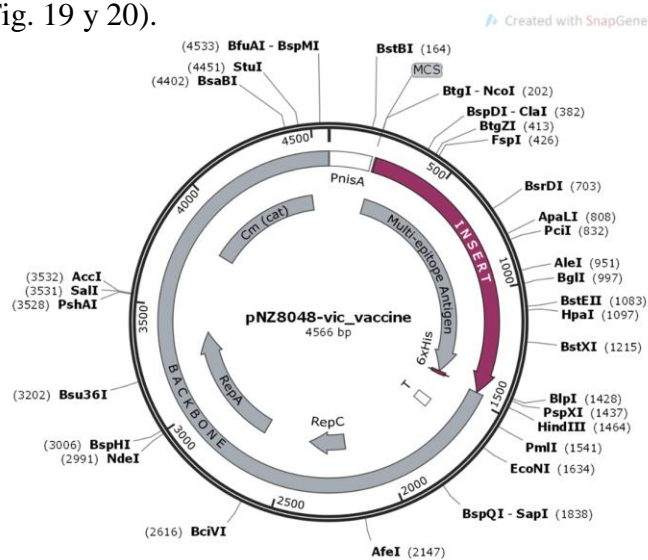
## 7.9 Construcción del vector final de expresión.

Realizamos extracción de DNA plasmídico para obtener a escala de Maxiprep el vector pNZ8048:GFP. Realizamos digestión enzimática con NcoI y HindIII (Fig. 18).

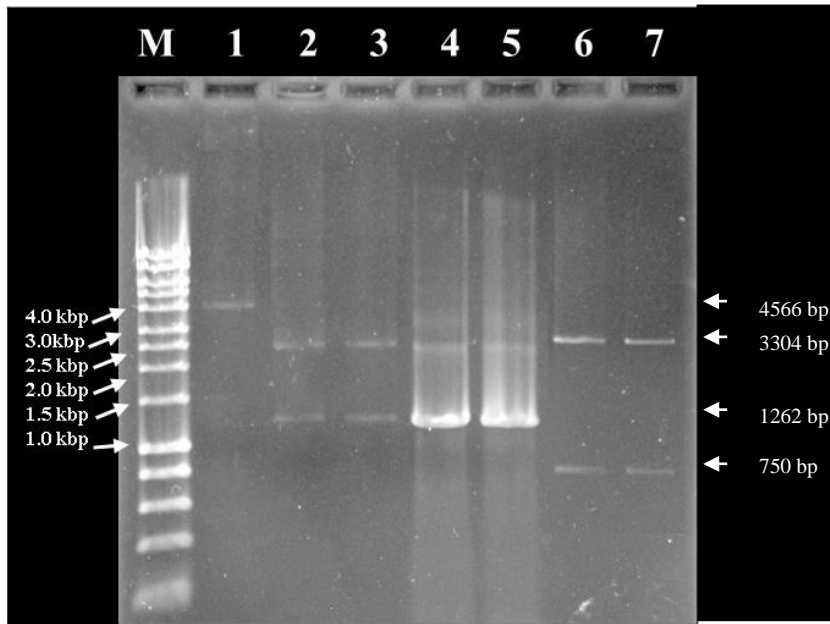


**Figura 18.** Caracterización del plásmido PNZ8048:GFP obtenidos de *L. lactis*. M, Marcador; 1-4, digeridos con NcoI & HindIII; 5, agua; 6-7, plásmido linealizado.

Realizamos la clonación de nuestro inserto de interés en los sitios NcoI y HindIII para obtener un tamaño final de 4566 bp nuestro vector final de expresión pNZ8048-VIC\_VACCINE (Fig. 19 y 20).

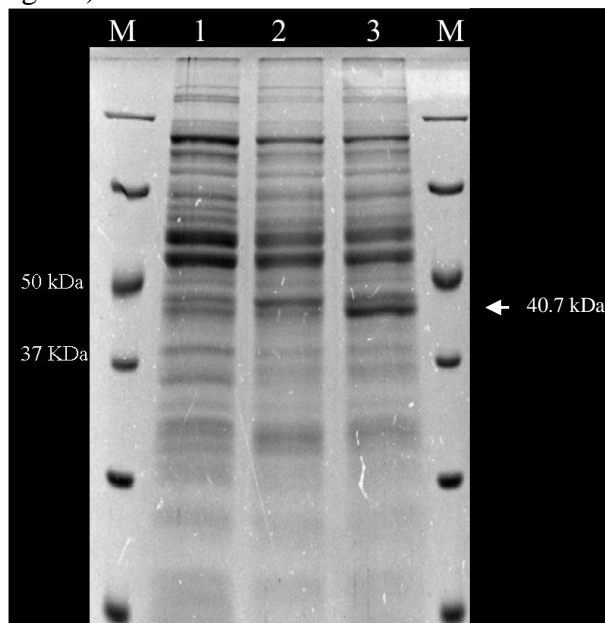


**Figura 19.** Construcción del plásmido pNZ8048-VIC\_VACCINE. El inserto de 1262 bp fue clonado en el sitio NcoI (202) y HindIII (1464) dentro del vector linealizado de 3304 bp para formar una construcción de 4566 bp.

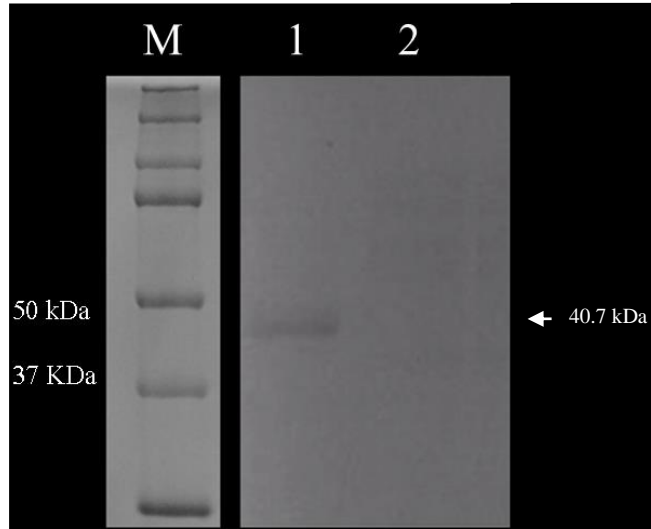


**Figura 20. Construcción del plásmido PNZ8048-VIC\_VACCINE obtenidos de *E. coli* TOP10.** M, Marcador; 1, sin digerir; 2-3, digeridos con NcoI & HindIII; 4-5, inserto; 6-7, pNZ8048:GFP digerido con NcoI & HindIII.

Se realizó la expresión del antígeno multi-epítipo en *L. lactis* recombinante donde pudiste observar la presencia de nuestra proteína de interés mediante SDS-PAGE (Fig. 21) y Western Blot (Fig. 22).



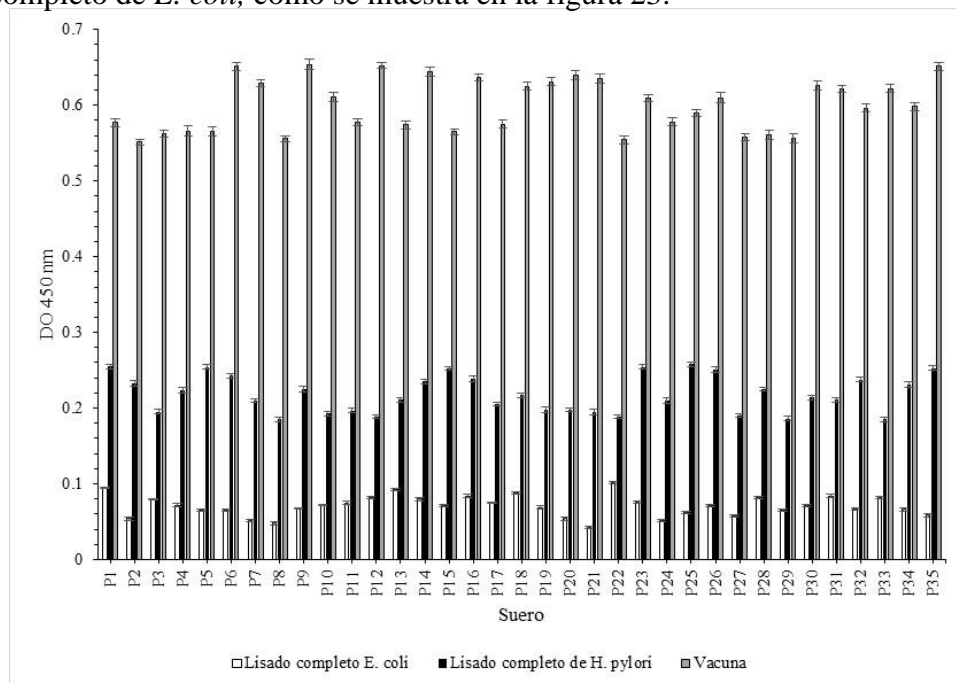
**Figura 21. SDS-PAGE de lisado completo de células de *L. lactis* NZ9000 para la expresión de la vacuna.** Carril 1, no transformado *L. Lactis* NZ9000; carril 2, recombinante no inducido *L. lactis* PNZ8048-vic\_vaccine; carril 3, recombinante 5 h después de la inducción con 10 ng/mL de nisina; carriles M, marcador de peso molecular de proteína.



**Figura 22.** Expresión del antígeno en *L. lactis* NZ9000 pNZ8048-vic\_vaccine por western blot. Carril 1, recombinante 5 h después de la inducción con 10 ng/mL de nisina; carril 2, recombinante no inducido *L. lactis* PNZ8048-vic\_vaccine.

### 7.10 Inmunoreactividad de la vacuna en pacientes infectados mediante ELISA.

Se observó inmunoreactividad tipo IgG en el 100% de los sueros de pacientes infectados por *H. pylori*. La absorbancias fueron significativamente mayores ( $p \leq 0.05$ ) cuando se utilizó la vacuna como antígeno en comparación al lisado completo de *H. pylori* J99 y el lisado completo de *E. coli*, como se muestra en la figura 23.



**Figura 23.** Inmunoreactividad de la vacuna recombinante mediante ELISA indirecto. Se evaluaron 35 sueros de pacientes infectados por *H. pylori*.

## VIII. DISCUSIÓN

Una justificación adicional a la resistencia a los antibióticos para el desarrollo de una vacuna contra el *H. pylori* es la relación entre el *H. pylori* y el cáncer gástrico. Las personas que desarrollan cáncer gástrico generalmente permanecen asintomáticas hasta que el cáncer está bien establecido. Por lo tanto, en el momento en que se les ha diagnosticado una infección por *H. pylori*, el pronóstico es malo. Aproximadamente el 1% de los individuos infectados con *H. pylori* desarrollan adenocarcinoma gástrico y menos del 1% desarrollan linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa (Blanchard y Czinn 2015). Los costos de identificar a todas las personas infectadas dentro de un país y proporcionar terapia antimicrobiana a todas las personas infectadas serían imposibles, particularmente en países donde el *H. pylori* y sus enfermedades asociadas tienen una alta prevalencia. Una vacuna proporcionaría los medios más rentables para prevenir el cáncer gástrico en América Latina donde la incidencia es alta. La prevención de la infección por *H. pylori* se lograría mediante la vacunación. Por ese motivo, en este estudio proponemos un diseño de vacuna novedoso.

Se han realizado esfuerzos para producir una vacuna eficaz contra *H. pylori*, con un éxito marginal. Estos estudios confirmaron que la vacunación protege a los animales contra las infecciones por *H. pylori*; sin embargo, rara vez se logra una protección completa, lo que sugiere que la optimización de la combinación de antígenos, el adyuvante, la vía y el régimen de inmunización aún son necesarios. Además, se sabe que la eficacia en animales puede no lograrse en seres humanos. Varios estudios han demostrado que la protección en ratones puede lograrse utilizando numerosos antígenos de proteína *H. pylori* distintos. Una lista de antígenos demostrados para brindar protección contra *H. pylori* en ratones incluye las subunidades de ureasa, CagA, VacA, catalasa, flagelinas, proteínas de choque térmico, HpaA, NapA y lisados de células completas (Ferrero y cols., 1995; Ghiara y cols., 1997; Radcliff y cols., 1997; Satin y cols., 2000; Amedei, 2006; Skene y cols., 2007; Sutton y cols., 2007). Se ha demostrado que la combinación de una larga lista de antígenos puede aumentar la efectividad de las vacunas. Rossi y cols, evaluó la combinación de CagA, VacA y NapA para determinar su eficacia como vacuna terapéutica en el modelo de infección en perros beagle experimental con *H. pylori*; hubo una respuesta de IgG contra cada uno de los tres

antígenos, sin efectos secundarios. Además, la colonización bacteriana y la gastritis se redujeron significativamente (Rossi y cols., 2004). Malfertheiner y cols, evaluó dicha vacuna multicomponente en voluntarios humanos; observaron que la vacuna era segura y altamente inmunogénica, induciendo respuestas humorales y celulares de larga duración a los antígenos (Malfertheiner y cols. 2008). Estos hallazgos indicaron que es necesario incluir múltiples antígenos. En consecuencia, nuestro prototipo de vacuna incluyó once antígenos proteicos de *H. pylori* que se seleccionaron por su papel en el mecanismo de adhesión y colonización, participación en el desarrollo patológico de la infección y capacidad antigénica informada previamente.

Las proteínas extracelulares y superficiales de un organismo desempeñan funciones versátiles, que incluyen la absorción de nutrientes, la quimiosensibilización, la motilidad, la adherencia, la formación de biopelículas, el escape del ataque inmunitario del huésped y el impacto de la respuesta inmunológica en las células huésped (Dwivedi y cols., 2016). Por lo tanto, las proteínas superficiales y extracelulares son buenos objetivos para desarrollar una vacuna dirigida a la prevención de infecciones y enfermedades bacterianas. En este estudio, la mayoría de las proteínas seleccionadas se predijeron como una membrana externa o extracelular (Tabla 1). Los genes esenciales son aquellos genes de un organismo que son críticos para su supervivencia; los genes esenciales son de particular importancia debido a sus aplicaciones teóricas y prácticas, como estudiar la robustez de un sistema biológico, definir un genoma / organismo mínimo e identificar objetivos terapéuticos efectivos en patógenos (Chen y cols. 2017). En este estudio, los genes HP0807 y HP 1118 se identificaron como esenciales en la base de datos OGEE v2. HP0807 es uno de los tres genes que codifican un receptor de membrana externa para el índice de Fe<sup>3+</sup> (FecA), como un mecanismo de adquisición de Fe en *H. pylori* (Velayudhan y cols., 2000). Por otro lado, la codificación HP 1118 a gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) desempeña un papel metabólico en la conversión de glutamina en glutamato y amoníaco, y glutatión en glutamato y cisteinilglicina. Además, GGT apoya la colonización y la patología gástricas (Ricci, 2014). Los buenos candidatos de vacuna se consideran aquellos que no presentan homología con proteínas humanas para evitar la generación de una posible respuesta autoinmune; estos candidatos también deben carecer de regiones transmembrana para facilitar su expresión.



Otra característica que debe tener una buena vacuna candidata es tener buenas propiedades antigénicas, que son importantes para la patogénesis del microorganismo y para la protección contra la enfermedad (Monterrubio-López y cols., 2015). Nuestras predicciones muestran que todas las proteínas seleccionadas tienen antigenicidad probable (excepto FecA), no homóloga a la humana y no tienen más de dos hélices transmembrana. Algunos autores han usado estos enfoques en la selección de proteínas candidatas para el diseño *in silico* de vacunas contra *H. pylori* (Naz y cols., 2015; Nezafat y cols., 2017).

Para un diseño de vacuna universal que pueda prevenir la infección de múltiples cepas de *H. pylori*, se requieren proteínas con secuencias de aminoácidos conservadas (Grimm y Ackerman 2013). Según nuestro análisis de conservación, las proteínas CagA, VacA, FecA, BabA y SabA mostraron variabilidad en la secuencia de aminoácidos; UreB, NapA, GGT, FlaA, HpaA y OipA se conservaron altamente. En consecuencia, para reducir la variabilidad entre las cepas de *H. pylori*, se obtuvieron secuencias de consenso utilizando 85 cepas de *H. pylori* de diferentes regiones geográficas. Este enfoque se ha utilizado contra agentes infecciosos con una alta tasa de variabilidad, como el VIH (Thomson y cols., 2005).

La vacuna dirigida por epítomos es un concepto atractivo que se está logrando con éxito en un gran número de grupos de investigación, especialmente en el desarrollo de vacunas dirigidas a epítomos conservados en patógenos variables o que mutan rápidamente. Los epítomos seleccionados en una vacuna deberían conservarse idealmente en diferentes etapas del patógeno y sus variantes. Además, debe tenerse en cuenta la respuesta inmune deseada. La respuesta mediada por células T citotóxicas se obtiene mediante una ruta que comprende el procesamiento de antígenos intracelulares con epítomos lineales como dianas predominantes. En este sentido, los epítomos seleccionados para una vacuna deben tener una afinidad de unión con más de un alelo principal complejo de histocompatibilidad (MHC) y deben cubrir una población importante. Por otro lado, la obtención de respuestas humorales se basa en el reconocimiento de epítomos lineales y epítomos conformacionales. Este último constituye

un desafío para el diseño de vacunas quiméricas, ya que deben conservar su conformación nativa para ser funcionales. Por lo tanto, el conocimiento de toda la estructura del antígeno es necesario para ayudar en el diseño racional de las vacunas dirigidas a los epítomos de células B conformacionales (Soria-Guerra y cols., 2015). Utilizamos una combinación de seis servidores para la predicción de epítomos de células B y tres servidores para la predicción de epítomos de células T con afinidades para los alelos MHC-I / -II más frecuentes. Se seleccionaron once epítomos de alto rango, el epítomo HpaA 33-52 se ha informado previamente por Hu y cols, evaluaron la respuesta de linfocitos T CD4 + específicos de antígeno estimulados con HpaA recombinante de 101 infectados con *H. pylori*, se observó un aumento significativo del porcentaje de células T CD4 + específicas de antígeno productoras de IFN- $\gamma$  (Hu y cols., 2016). Además, nueve residuos del epítome UreB 170-189 predichos en este estudio coinciden con el epítomo UreB 181-195 reportado por Qiu y cols, observaron la reactividad positiva de este epítome con sueros de pacientes infectados con *H. pylori* mediante ELISA; los ratones inmunizados con el péptido de fusión glutatión S-transferasa (GST) - UreB 181-195 mostraron que los anticuerpos específicos de epítomo eran capaces de inhibir la actividad enzimática de la ureasa. En otro estudio, Guo y cols. diseñaron y evaluaron una vacuna multivalente basada en epítomos (CWAE), que incluye el epítomo UreB 181-195 (Guo y cols., 2017). La inmunización terapéutica oral con CWAE redujo significativamente el número de colonias de *H. pylori* en el estómago de los jerbos de Mongolia. La protección de CWAE se asoció con niveles más altos de respuesta mixta de células T CD4 +, IgG y anticuerpos secretores de IgA contra *H. pylori* (Guo y cols., 2017). Estos informes indican la capacidad y utilidad de las herramientas bioinformáticas en la predicción y selección de epítomos.

El diseño de vacunas basadas en epítomos ofrece formas novedosas y racionales de desarrollar vacunas basadas en información genómica y representa una manera de elevar una respuesta inmune específica contra componentes antigénicos. Un paso del diseño de la tubería se refiere a la entrega de los epítomos seleccionados. Una estrategia común concatena los epítomos en un llamado polipéptido de cadena de cuentas. El orden de los epítomos dentro de una cadena de cuentas juega un papel crucial, especialmente en la

degradación (Schubert y cols., 2015). Por lo tanto, fue necesario optimizar el ordenamiento de manera que la probabilidad de recuperación de los epítomos fuera máxima.

Para aumentar la capacidad inmunogénica de las vacunas, se han utilizado los adyuvantes. La subunidad CTB es capaz de inducir una respuesta inmune sin la toxicidad asociada con la subunidad CTA. La CTB ha demostrado ser un fuerte adyuvante para los antígenos no acoplados cuando se administra por vía nasal, pero menos cuando se administra por vía oral. Sin embargo, no se recomienda la vía nasal de administración debido al riesgo potencial de desarrollar la parálisis de Bell. Se ha informado que al acoplar el antígeno a CTB, se logra una respuesta mucho más fuerte a través de la vía de administración oral. Además, el potencial adyuvante de CTB también se ha demostrado en modelos animales grandes, lo que indica que el potencial adyuvante sería escalable a especies más altas (Baldauf y cols., 2015). Por lo tanto, el CTB se agregó en el terminal N de nuestro diseño de vacuna.

La inmunización oral tiene amplias ventajas en comparación con otras vías de administración, como la administración segura y fácil, el alto cumplimiento del paciente sin dolor, la necesidad de personal médico capacitado, la absorción fácil y las respuestas inmunitarias en los sitios sistémicos y de la mucosa. En el intestino, las células M son portales de recolección de antígenos ubicados en el epitelio asociado al folículo (FAE) de los parches de Peyer, que facilitan el transporte de antígenos desde la luz intestinal hasta debajo del sistema inmunológico de la mucosa (Lelouard y cols., 2012). Por lo tanto, la focalización de células M podría ser una de las estrategias prometedoras para desarrollar una vacuna oral eficaz. Se introdujo un ligando peptídico dirigido a células M, CKS9, que consiste en 9 aminoácidos con conformación cíclica en el terminal C de nuestro diseño de vacuna oral. Yoo y cols. demostraron que CKS9 es una focalización eficiente combinada con nanopartículas de quitosano en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Yoo y cols., 2010).

Nuestra vacuna fue modelada y se obtuvo la estructura 3D. Para lograr una estructura 3D de alta calidad, el proceso de refinación se realizó en el modelo 3D inicial. Nuestros resultados indicaron que la calidad y la estabilidad del modelo refinado final se mejoraron notablemente en base a las predicciones de parcelas de Ramachandran.

Además, nuestro diseño de vacuna se evaluó como no alergénico, probablemente antigénico, soluble y con un peso molecular y un punto isoeléctrico apropiados.

## IX. CONCLUSIONES

- Se identificaron once epítomos predichos de proteínas de *H. pylori* relacionados a los mecanismos de patogenicidad (UreB170-189, VacA459-478, CagA1103-1122, GGT106-126, NapA30-44 y OipA211-230) y colonización (HpaA33-52, FlaA487-506, FecA437-456, BabA129-149 y SabA540-559).
- Se diseñó una vacuna oral multi-epítomo de 373 aminoácidos con un peso molecular estimado de 40.7 kDa que contiene CTB un adyuvante de mucosa en el extremo N terminal. CTB se fusionó con los once epítomos predichos separados por secuencias espaciadoras apropiadas y en el extremo C terminal un péptido CKS9. La predicción de la estructura secundaria, modelado de la estructura terciaria y su evaluación indicaron que la vacuna es no alergénica, antigénica, soluble, peso molecular y punto isoeléctrico adecuados.
- Se construyó la recombinante *L. lactis* con el vector de expresión pNZ8048-vic\_vaccine de 4,566 bp mediante clonación; la construcción se confirmó por digestión enzimática, PCR y secuenciación.
- Se identificó la expresión proteína de la vacuna mediante la detección de una banda de un peso aproximado de ~40 kDa en SDS-Page y Western blot tras la inducción con 10 ng/mL de nisina durante 5 h a 37°C en condiciones anaerobias.
- Se obtuvo una inmunoreactividad de 100% de la vacuna contra suero de pacientes infectados por *H. pylori* mediante ensayos in vitro por ELISA.

## **X. PERSPECTIVAS**

Es muy importante realizar un estudio profundo sobre la respuesta generada de cada uno de los epítomos, evaluación de su procesamiento y montaje por parte de las células presentadoras de antígenos, estabilidad y tiempo de vida del antígeno. Así como, la capacidad de la vacuna para prevenir la infección de *H. pylori* por ensayos *in vivo* de infección bacteriana en pacientes previamente inmunizados.

La inmunoreactividad de la vacuna a anticuerpos de pacientes infectados la perfila como un prototipo de vacuna oral de grandes expectativas, sin embargo, es necesario realizar inmunizaciones en modelos animales para evaluar la producción de anticuerpos específicos, memoria inmunológica, estimulación de linfocitos, cambios morfológicos en la mucosa gástrica y otros eventos inmunológicos de relevancia en la inmunización.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdo-Francis JM. 2007. Tratamiento: III consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de Gastroenterología de México*. 72(3):332-338.
- Agarwal K y Agarwal S. 2008. *Helicobacter pylori* vaccine: from past to future. *Mayo Clinic Proceedings*. 83(2):169-175
- Algood HM y Cover TL. 2006. *Helicobacter pylori* persistence: an overview of interactions between *H. pylori* and host immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(4):597-613
- Atherton J, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vaca*, the vacuolating cytotoxin gene in *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 112:92-99.
- Azizi A, Kumar A, Diaz-Mitoma F, Mestecky J. 2010. Enhancing oral vaccine potency by targeting intestinal m cells. *PLOS Pathogens*. 6(11):e1001147.
- Allen LA. 2007. Phagocytosis and persistence of *Helicobacter pylori*. *Cellular Microbiology*. 9(4):817-828
- Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M, Tasca E, Azzurri A, D'Elios MM, Del Prete G, De Bernard M. 2006. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(4):1092-1101.
- Baldauf K, Royal J, Hamorsky KT, Matoba N. 2015. Cholera Toxin B: One Subunit with Many Pharmaceutical Applications. *Toxins*. 7(3):974-996.
- Baele M, Pasmans F, Flahou B, Chiers K, Ducatelle R, Haesebrouck F. 2009. Non-*Helicobacter pylori* helicobacters detected in the stomach of humans comprise several naturally occurring *Helicobacter* species in animals. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 55(3):306-313
- Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL. 1997. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*. 40(1): 25-30.

- Beswick EJ, Suarez G, Reyes V. 2006. *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 12(35):5599-5605.
- Bergman MP y D'Elios MM. 2010. Cytotoxic T cells in *H. pylori*-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;104918.
- Blanchard TG y Nedrud JG. 2012. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. *Current Protocols in Microbiology*. doi: 10.1002/9780471729259.mc08b01s24.
- Blanchard TG y Czinn SJ. 2015. Current Status and Prospects for a *Helicobacter pylori* Vaccine. *Gastroenterology Clinics of North America*. 44(3):677-689
- Blaser MJ, Pérez-Pérez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. 1995. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *caga* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Research*. 55(10):2111-2115.
- Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M. 2006. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor critical regulators of b-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *The Journal of Biological Chemistry*. 281(17):11637-11648.
- Bermúdez-Humarán LG, Kharrat P, Chatel JM, Langella P. 2011. Lactococci and lactobacilli as mucosal delivery vectors for therapeutic proteins and DNA vaccines. *Microbial Cell Factories*. 10(1):S4 <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S4>.
- Czinn SJ, Blanchard T. 2011. Vaccinating against *Helicobacter pylori* infection. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 8(3):133-140.
- Corthésy B, Boris S, Isler P, Grangette C, Mercenier A. 2005. Oral immunization of mice with lactic acid bacteria producing *Helicobacter pylori* urease B subunit partially protects against challenge with *Helicobacter felis*. *The Journal of Infectious Diseases*. 192(8):1441-1449.
- Clyne M, Thomas J, Weaver L, Drumm B. 1997. In vitro evaluation of the role of antibodies against *Helicobacter pylori* in inhibiting adherence of the organism to gastric cells. *Gut*. 40(6):731-738.



Camargo MC, García A, Riquelme A, Otero W, Camargo CA, Hernandez-García T, Candia R, Bruce MG, Rabkin CS. 2014. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in latin america. *American Journal of Gastroenterology*. 109(4):485-495.

Cerezo S, Ponce M y Gutiérrez G. 2006. Diagnóstico microbiológico, serológico, gentotipificación de *Helicobacter pylori* aislado de biopsias de niños y adultos. Detección molecular de la isla de patogenicidad *cag* de *Helicobacter pylori*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2:99–104.

Chiarini A, Calà C, Bonura C, Gullo A, Giuliana G, Peralta S, D'Arpa F, Giammanco A. 2009. Prevalence of virulence-associated genotypes of *Helicobacter pylori* and correlation with severity of gastric pathology in patients from Western Sicily, Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 28(5): 437-446.

Chromvarin C, Namwat W, Chaicumpar K, Mairiang P, Sangchan A, Sripa B, Tor-Udom S, Vilaichone RK. 2008. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 12(1):30-36.

Chen W-H, Lu G, Chen X, Zhao X-M, Bork P. 2017. OGEE v2: an update of the online gene essentiality database with special focus on differentially essential genes in human cancer cell lines. *Nucleic Acids Research*. 45(D1):D940-D944.

Dharmani P, Srivastava V, Kisson-Singh V, Chadee K. 2008. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity*. 1(2):123-135

Doyle J, Evans J and Evans D. 2001. *Helicobacter pylori cagA*: Analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of *cagA* as a virulence factors. *Helicobacter*. 6(3):187-198.

Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. 1996. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *The American Journal of Surgical Pathology*. 20(10):1161-1181.

- Duong T, Miller MJ, Barrangou R, Azcarate-Peril MA, Klaenhammer TR. 2011. Construction of vectors for inducible and constitutive gene expression in *Lactobacillus*. *Microbial Biotechnology*. 4(3):357-367.
- Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*. 10(4):720-741.
- Dye B, Kruszon-moran D, McQuillan G. 2002. The relationship between periodontal disease attributes and helicobacter pylori infection among adults in the united states. *The American Journal of Public Health*. 92(11):1809-1815.
- De Vos WM. 2011. Systems solutions by lactic acid bacteria: from paradigms to practice. *Microbial Cellular Factories*. 10(1):S2. doi: 10.1186/1475-2859-10-S1-S2.
- Daniel C, Roussel Y, Kleerebezem M, Pot B. 2011. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in Biotechnology*. 29(10):499-508.
- Del Giudice G, Malfertheiner P, Rappuoli R. 2009. Development of vaccines against *Helicobacter pylori*. *Expert Review of Vaccines*. 8(8):1037-1049.
- Dwivedi P, Alam SI, Tomar RS. 2016. Secretome, surfome and immunome: emerging approaches for the discovery of new vaccine candidates against bacterial infections. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(9):155.
- Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Dirican A, Kocazeybek B. 2006. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *babA* genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*. 11(6):574-580.
- Flach CF, Svensson N, Blomquist M. 2011. A truncated form of HpaA is a promising antigen for use in a vaccine against *Helicobacter pylori*. *Vaccine*. 29(6):1235-1241.
- Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. 2013. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*. 109(2):S35-S50
- Ferrero RL, Thiberge JM, Kansau I, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. 1995. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal

infection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(14):6499-6503.

Guo L, Yang H, Tang F, Yin R, Liu H, Gong X. 2017. Oral Immunization with a Multivalent Epitope-Based Vaccine, Based on NAP, Urease, HSP60, and HpaA, Provides Therapeutic Effect on *H. pylori* Infection in Mongolian gerbils. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7:349.

Guo L, Liu K, Xu G, Li X, Tu J, Tang F, Xing Y, Xi T. 2012. Prophylactic and therapeutic efficacy of the epitope vaccine CTB-UA against *Helicobacter pylori* infection in a BALB/c mice model. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 95(6):1437-1444.

Grangette C, Müller-Alouf H, Hols P, Goudercourt D, Delcour J, Turneer M, Mercenier A. 2004. Enhanced mucosal delivery of antigen with cell wall mutants of lactic acid bacteria. *Infection and Immunity*. 72(5):2731-2737.

Guzman-Murillo MA, 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. *Journal of Medical Microbiology*. 50(4):320-329.

Ghiara P, Rossi M, Marchetti M, Di Tommaso A, Vindigni C, Ciampolini F. 1997. Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates an otherwise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infection and Immunity*. 65(12):4996-5002.

Grimm SK, Ackerman ME. 2013. Vaccine design: emerging concepts and renewed optimism. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(6):1078-1088.

Hernández F, Monge-Nájera J. 1994. Ultrastructure of the bacteria *Campylobacter* and *Helicobacter*: implications for the phylogeny of mammal gastric bacteria. *Rev Biol Trop*. 42(2):85-92.

Hongying F, Xianbo W, Fang Y, Yang B, Beiguo L. 2014. Oral immunization with recombinant *Lactobacillus acidophilus* expressing the adhesin hp0410 of *Helicobacter pylori* induces mucosal and systemic immune responses. *Clinical and Vaccine Immunology*. 21(2):126-132.

- Hugentobler F, Di Roberto RB, Gillard J, Cousineau B. 2012. Oral immunization using live *Lactococcus lactis* co-expressing LACK and IL-12 protects BALB/c mice against *Leishmania major* infection. *Vaccine*. 30(39):5726-5732.
- Hugentobler F, Yam KK, Gillard J, Mahbuba R, Olivier M, Cousineau B. 2012. Immunization against *Leishmania major* infection using LACK- and IL-12-expressing *Lactococcus lactis* induces delay in footpad swelling. *PLOS One*. 7(2):e30945.
- Hu J, Chen L, Yang W, Li B, Sun H, Wei S. 2016. Systematic identification of immunodominant CD4<sup>+</sup> T cell responses to HpaA in *Helicobacter pylori* infected individuals. *Oncotarget*. 7(34):54380-54391.
- Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, Kanamoto T, Sugita-Konishi Y, Aibara K, Koga T. 1990. Oral immunization with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infection and Immunity*. 58(9):2929-2934.
- Ihan A, Pinchuk IV, Beswick EJ. 2012. Inflammation, immunity, and vaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 17(1):16-21.
- Inoue K, Shiota S, Yamada K, Gotoh K, Suganuma M, Fujioka T, Ahmed K, Iha H, Nishizono A. 2009. Evaluation of a new tumor necrosis factor-alpha-inducing membrane protein of *Helicobacter pylori* as a prophylactic vaccine antigen. *Helicobacter*. 14(5):135-143.
- Iankov ID, Haralambieva IH, Galanis E. 2011. Immunogenicity of attenuated measles virus engineered to express *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Vaccine*. 29(8):1710-1720.
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*. 18(2):299-313.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. Global cancer statistics. *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 61(2):69-90.
- Jagusztyń-Krynicka EK, Godlewska R. 2008. New approaches for *Helicobacter* vaccine development--difficulties and progress. *Polish Journal of Microbiology*. 57(1):3-9.

- Kim N, Kim JJ, Choe YH, Kim HS, Kim JI, Chung IS. 2009. Diagnosis and treatment guidelines for *Helicobacter pylori* infection in Korea. *The Korean Journal of Gastroenterology*. 54(5):269-278.
- Kanampalliwar AM, Rajkumar S, Girdhar A, Archana T. 2013. Reverse vaccinology: basics and applications. *Journal of Vaccines & Vaccination*. 4(6):194-198.
- Kajikawa A, Zhang L, Long J, Nordone S, Stoeker L, LaVoy A, Bumgardner S, Klaenhammer T, Dean G. 2012. Construction and immunological evaluation of dual cell surface display of HIV-1 gag and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium FliC in *Lactobacillus acidophilus* for vaccine delivery. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(9):1374-1381.
- Kotloff KL, Wasserman SS, Losonsky GA, Thomas W Jr, Nichols R, Edelman R, Bridwell M, Monath TP. 2001. Safety and immunogenicity of increasing doses of a *Clostridium difficile* toxoid vaccine administered to healthy adults. *Infection and Immunity*. 69(2):988-995.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, Kuby J. 2006. Kuby immunology. New York, N.Y.; Basingstoke: W.H. Freeman.
- Kawai T, Akira S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 34(5):637-650.
- Kabir S. 2007. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: A review. *Helicobacter*. 12(2):89-102.
- Long M, Luo J, Li Y, Zeng FY, Li M. 2009. Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 15(19):2381-2388.
- Lee CK. 2001. Vaccination against *Helicobacter pylori* in non-human primate models and humans. *Scandinavian Journal of Immunology*. 53(5):437-442.
- Lelouard H, Fallet M, de Bovis B, Méresse S, Gorvel JP. 2012. Peyer's Patch Dendritic Cells Sample Antigens by Extending Dendrites Through M Cell-Specific Transcellular Pores. *Gastroenterology*. 142(3):592-601.

- Moorthy G, Ramasamy R. 2007. Mucosal immunisation of mice with malaria protein on lactic acid bacterial cell walls. *Vaccine*. 25(18):3636-3645.
- Malaty HM. 2007. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology*. 21(2):205-214.
- Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D. 2007. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 56(6):772-781.
- Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, Kaufmann SH, Ulrichs T, Novicki D. 2008. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterology*. 135(3):787-795.
- Monterrubio-López GP, González-Y-Merchand JA, Ribas-Aparicio RM. 2015. Identification of Novel Potential Vaccine Candidates against Tuberculosis Based on Reverse Vaccinology. *BioMed Research International*. 2015:1-16.
- Marshall BJ, Warren JR. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1(8390):1311-1315.
- Mendz GL, Hazell SL, Burns BP. 1993. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *Journal of General Microbiology*. 139(12):3023-3028.
- Monteiro MA, Britton S, Applebee LA, Baqar S. 2011. Synthesis and immunogenicity of a *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-based conjugate. *Vaccine*. 29(17):3098-3102.
- Moss SF, Moise L, Lee DS, Kim W, Zhang S, Lee J, Rogers AB, Martin W, De Groot AS. 2011. HelicoVax: epitope-based therapeutic *Helicobacter pylori* vaccination in a mouse model. *Vaccine*. 29(11):2085-2091.
- Maidin MS, Song AA, Jalilsood T, Sieo CC, Yusoff K, Rahim RA. 2014. Construction of a novel inducible expression vector for *Lactococcus lactis* M4 and *Lactobacillus plantarum* Pa21. *Plasmid*. 74:32-38.
- Macho Fernandez E, Pot B, Grangette C. 2011. Beneficial effect of probiotics in IBD: are peptidoglycan and NOD2 the molecular key effectors?. *Gut Microbes*. 2(5):280-286.

- Moayyedi P, Feltbower R, Rocombe W, Mason S, Atha P, Brown J, Dowell AC. 2000. The effectiveness of omeprazole, clarithromycin and tinidazole in eradicating *Helicobacter pylori* in a community screen and treat program. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 14(6):719-728.
- Magalhaes Queiroz DM, Lizza F. 2006. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 11(s1):1-5.
- Nyström J, Svennerholm AM. 2007. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine*. 25(14):2591-2598.
- Naz A, Awan FM, Obaid A, Muhammad SA, Paracha RZ, Ahmad J. 2015. Identification of putative vaccine candidates against *Helicobacter pylori* exploiting exoproteome and secretome: A reverse vaccinology based approach. *Infection, Genetics and Evolution*. 32:280-91.
- Nezafat N, Eslami M, Negahdaripour M, Rahbar MR, Ghasemi Y. 2017. Designing an efficient multi-epitope oral vaccine against *Helicobacter pylori* using immunoinformatics and structural vaccinology approaches. *Molecular BioSystems*. 13(4):699-713.
- Olfat F, Zheng Q, Oleastro M. 2005. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor baba with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 44(2):151-156.
- Otero W, Gómez M, Trespalacios AA. 2007. *Helicobacter pylori*: después de todo. Temas escogidos de gastroenterología. *Asociación colombiana de gastroenterología*. 2007:43-56.
- Panayotopoulou E, Sgouras D, Papadakos K, Kalliaropoulos A, Papatheodoridis G, Mentis A, Archimandritis A. 2007. Strategy to characterize the number and type of repeating EPIYA phosphorylation motifs in the carboxyl terminus of CagA protein in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(2):488-495.
- Peek RM, Jr., Fiske C, Wilson KT. 2010. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiological Reviews*. 90(3):831-858.

- Pizza M, Giuliani MM, Fontana MR, Monaci E, Douce G, Dougan G, Mills KH, Rappuoli R, Del Giudice G. 2001. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. *Vaccine*. 19(17-19):2534-2541.
- Rhead JL, Letley DP, Mohammadi M, Hussein N, Mohagheghi MA, Eshagh Hosseini M, Atherton JC. 2007. A new *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin determinant, the intermediate region, is associated with gastric cancer. *Gastroenterology*. 133(3):926-936.
- Rudnicka A, Chimela M. 2004. Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections. *Current Trends in Immunology*. 6:1-19.
- Ruiz-Bustos E, Ochoa JL, Wadström T, Ascencio F. 2001. Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. *Journal of Medical Microbiology*. 50(3):215-222.
- Rupnow MF, Chang AH, Shachter RD. 2009. Cost-effectiveness of a potential prophylactic *Helicobacter pylori* vaccine in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*. 200(8):1311-1317.
- Radcliff FJ, Hazell SL, Kolesnikow T, Doidge C, Lee A. 1997. Catalase, a novel antigen for *Helicobacter pylori* vaccination. *Infection and immunity*. 65(11):4668-4674.
- Rossi G, Ruggiero P, Peppoloni S, Pancotto L, Fortuna D, Lauretti L. 2004. Therapeutic Vaccination against *Helicobacter pylori* in the Beagle Dog Experimental Model: Safety, Immunogenicity, and Efficacy. *Infection and immunity*. 72(6):3252-3259.
- Ricci V. 2014. *Helicobacter pylori* gamma-glutamyl transpeptidase and its pathogenic role. *World Journal of Gastroenterology*. 20(3):630-638.
- Schubert B, Brachvogel H-P, Jürges C, Kohlbacher O. 2015. EpiToolKit-a web-based workbench for vaccine design. *Bioinformatics*. 31(13):2211-2213.
- Svennerholm AM, Lundgren A. 2007. Progress in vaccine development against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 50(2):146-156.
- Smith MF, Mitchell A, Li G. 2003. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR5, but not TLR4, are required for *Helicobacter pylori*-induced NF- $\kappa$ B activation and chemokine



expression by epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(35):32552-32560.

Sicinschi L, Correa P, Bravo L, Schneider B. 2003. A positive assay for identification of *cagA* negative strains of *Helicobacter pylori*. *Journal of Microbiological Methods*. 55(3):625-633.

Sun B, Li ZS, Tu ZX, Xu GM, Du YQ. 2006. Construction of an oral recombinant DNA vaccine from *H. pylori* neutrophil activating protein and its immunogenicity. *World Journal of Gastroenterology*. 12(43):7042-7046.

Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F. 2000. The Neutrophil-Activating Protein (Hp-Nap) of *Helicobacter pylori* Is a Protective Antigen and a Major Virulence Factor. *The Journal of Experimental Medicine*. 191(9):1467-1476.

Skene C, Young A, Every A, Sutton P. 2007. *Helicobacter pylori* flagella: antigenic profile and protective immunity. *FEMS immunology and medical microbiology*. 50(2):249-256.

Sutton P, Doidge C, Pinczower G, Wilson J, Harbour S, Swierczak A. 2007. Effectiveness of vaccination with recombinant HpaA from *Helicobacter pylori* is influenced by host genetic background. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 50(2):213-219.

Shanmugham B y Pan A. 2013. Identification and characterization of potential therapeutic candidates in emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus*: a novel hierarchical in silico approach. *PLOS One*. 8(3):e59126.

Szatraj K, Szczepankowska AK, Sączyńska V, Florys K, Gromadzka B, Łeppek K, Płucienniczak G, Szewczyk B, Zagórski-Ostoja W, Bardowski J. 2014. Expression of avian influenza haemagglutinin (H5) and chicken interleukin 2 (chIL-2) under control of the *ptcB* promoter in *Lactococcus lactis*. *Acta Biochimica Polonica*. 61(3):609-614.

Stoeker L, Nordone S, Gunderson S, Zhang L, Kajikawa A, LaVoy A, Miller M, Klaenhammer TR, Dean GA. 2011. Assessment of *Lactobacillus gasseri* as a candidate oral vaccine vector. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18(11):1834-1844.

- Suerbaum S, Michetti P. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *The New England Journal of Medicine*. 347(15):1175-1186.
- Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics*. 53:405-414.
- Tarahomjoo S. 2012. Development of vaccine delivery vehicles based on lactic acid bacteria. *Molecular Biotechnology*. 51(2):183-199.
- Thomson SA, Jaramillo AB, Shoobridge M, Dunstan KJ, Everett B, Ranasinghe C. 2005. Development of a synthetic consensus sequence scrambled antigen HIV-1 vaccine designed for global use. *Vaccine*. 23:4647-4657.
- Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. 2005. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(15):15390-15397.
- Vannella L, Lahner E, Annibale B. 2012. Risk for gastric neoplasias in patients with chronic atrophic gastritis: a critical reappraisal. *World Journal of Gastroenterology*. 18(12):1279-1285.
- Villena J, Medina M, Racedo S, Alvarez S. 2010. Resistance of young mice to pneumococcal infection can be improved by oral vaccination with recombinant *Lactococcus lactis*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 43(1):1-10.
- Velin D, Michetti P. 2010. Advances in vaccination against *Helicobacter pylori*. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. 4(2):157-166.
- Vajdy M, Singh M, Ugozzoli M, Briones M, Soenawan E, Cuadra L, Kazzaz J, Ruggiero P, Peppoloni S, Norelli F. 2003. Enhanced mucosal and systemic immune responses to *Helicobacter pylori* antigens through mucosal priming followed by systemic boosting immunizations. *Immunology*. 110(1):86-94
- Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC. 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Molecular Microbiology*. 37(2):274-286.

- Wang Y, Huang Y. 2014. Effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* supplementation to standard triple therapy on *Helicobacter pylori* eradication and dynamic changes in intestinal flora world. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 30(3):847-853.
- Wirh H, Yang M, Sanabria-Valentin E, Berg D, Dubois A, Blaser MJ. 2006. Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys. *The FASEB Journal*. 20(9):1534-1536.
- Wirth HP, Yang M, Peek R, Hook-Nikanne J, Fried M, Blaser MJ. 1999. Phenotypic diversity in Lewis expression of *Helicobacter pylori* isolates from the same host. *Clinics in Laboratory Medicine*. 133:488-500.
- Wilson KT, Crabtree JE. 2007. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*. 133(1):288-308.
- Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ, Narasimhan B. 2009. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98(4):1278-1316.
- Yamaoka Y, Kato M, Asaka M. 2008. Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Internal Medicine*. 47(12):1077-1083.
- Yamazaki S, Yamakawa A, Okuda T. 2005. Distinct diversity of *vacA*, *cagA* and *cagE* genes of *Helicobacter pylori* associated with peptic ulcer in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(8):3906-3916.
- Yang JC, Kuo CH, Wang HJ, Wang TC, Chang CS, Wang WC. 1998. Vacuolating toxin gene polymorphism among *Helicobacter pylori* clinical isolates and its association with *m1*, *m2*, or chimeric *vaca* middle types. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 33(11):1152-1157.
- Yang W-C, Chen L, Li H-B. 2013. Identification of two novel immunodominant UreB CD4+ T cell epitopes in *Helicobacter pylori* infected subjects. *Vaccine*. 31(8):1204-1209.

Yoo M-K, Kang S-K, Choi J-H, Park I-K, Na H-S, Lee H-C. 2010. Targeted delivery of chitosan nanoparticles to Peyer's patch using M cell-homing peptide selected by phage display technique. *Biomaterials*. 31(30):7738-7747.

WHO. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)

Wells JM, Mercenier A. 2008. Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 6(5):349-362.

## RESUMEN BIOGRÁFICO

M.C. Víctor Hugo Urrutia Baca

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: DESARROLLO DE UNA VACUNA ORAL CONTRA *Helicobacter pylori*  
BASADA EN LA EXPRESIÓN DE UN ANTÍGENO MULTI-EPÍTOPO EN  
*Lactococcus lactis* RECOMBINANTE

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacido en la Ciudad de León, Departamento de León, Nicaragua el 16 de agosto de 1990, hijo de Norma del Socorro Baca Aguilar y Victorino Urrutia

Educación: Egresado de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, grado obtenido Licenciatura en Bioanálisis Clínico en 2012.

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2016.

Experiencia Profesional: Responsable del Laboratorio de Hematología en el Depto. de Microbiología y Parasitología UNAN-León, desde 2012 hasta enero de 2014.