

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**SELECCIÓN DE UN APTÁMERO DE ARN
QUE SE ACOPLA MOLECULARMENTE A LOS
DOMINIOS ADHESIÓN DE LAS ADHESINAS DE
HELICOBACTER PYLORI MEDIANTE UN
ENFOQUE COMPUTACIONAL**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA:

YOALI ZUZEL TRINIDAD ROBLES

DIRECTOR:

DR. JOSÉ DE JESÚS OLIVARES TREJO

**POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS**

Ciudad de México, julio, 2022

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidenta: Dra. Lilia López Cánovas, UACM

Secretario: Dr. José de Jesús Olivares Trejo, UACM

Vocal: Dr. Marco Antonio López González, UAM

Suplente: Dra. Claudia Selene Zárate Guerra, UACM

Plantel de adscripción:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTOR

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

UACM

AGRADECIMIENTOS

Al apoyo financiero del proyecto con número Ccyt-2021-1 de la convocatoria del Colegio de Ciencia y Tecnología de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Al apoyo financiero de CONACYT en el programa 000027 de la Maestría en Ciencias Genómicas de la UACM con número de becario 1036551.

Agradezco la beca recibida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, mi casa de estudios, por brindarme la oportunidad de obtener el grado de M. en C. Genómicas. Por hacer de la educación, mi autonomía y libertad.

Al Posgrado en Ciencias genómicas, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de grado con Doctores de calidad académica y humanística excepcional.

A las estimadas Dras. Lilia López y Selene Zárate del Posgrado en Ciencias Genómicas, por compartir sus conocimientos y guiar este trabajo de investigación con su honorable experiencia.

Al distinguido Dr. Marco González de la Universidad Autónoma Metropolitana, por su asesorado tanto objetivo como profesional en el desarrollo de este proyecto con su honorable experiencia. Gracias por su dedicación.

Especialmente, al estimado y respetable Dr. José de Jesús Olivares Trejo, por permitirme pertenecer a su grupo de investigación, guiar sabiamente este proyecto, dedicar su valioso tiempo, observaciones y comentarios que aportaron sustancialmente a la realización y culminación exitosa del proyecto de investigación con su inigualable experiencia en la investigación científica y delicadeza humana; sus palabras de aliento y consejo fueron un pilar importante para este logro.

¡Gracias!

¡Autonomía, educación y libertad! ¡Autonomía, educación y libertad!

¡Arriba, la Autónoma de la Ciudad!

DEDICATORIA

A mi *mamaíta* Raquel Robles, por su excepcional apoyo en el desarrollo y culminación de mis estudios, su amor, atención y consejo siempre objetivo.

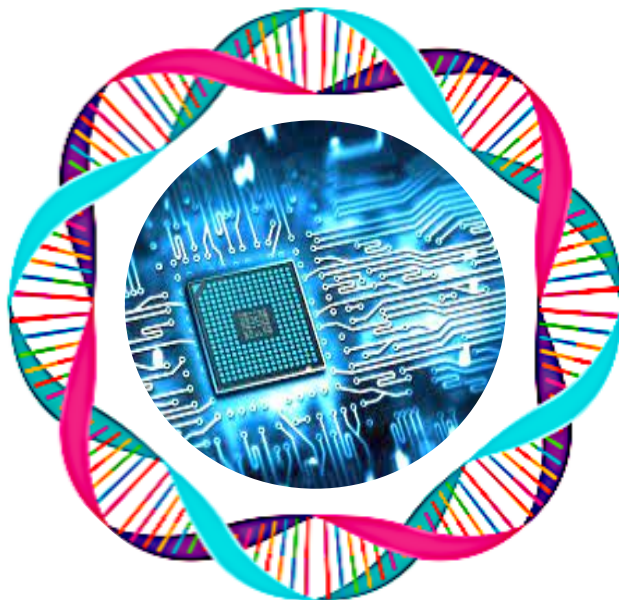
A mi *papaíto* Jesús Trinidad, por prepararme para los desafíos académicos e ir siempre de la mano conmigo en mis estudios y enseñarme que la disciplina y constancia, son amigas del éxito.

A mi hermana Rosa de Lima Trinidad, por demostrarme el valor de las palabras redistribución, reconocimiento y paridad: justicia, en los desafíos de la vida y la ciencia.

¡Lo logramos!

“Los seres humanos son constructores de herramientas por naturaleza. Estamos reordenando y alterando continuamente nuestro entorno para nuestro bienestar y para que nuestras perspectivas de una mejor forma de vida sean más favorables...somos también unos seres que se atreven a correr riesgos...lo cierto es que muchos de los nuevos productos y procesos de la incipiente revolución biotecnológica son potencialmente beneficiosos y...nos obligará a todos a poner un espejo ante los valores que más apreciamos...”

Rifkin, Jeremy



ÍNDICE

Índice de tablas	1
Índice de figuras	2
Abreviaturas.....	4
Resumen	5
Abstract.....	6
Introducción	
1. <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>)	7
1.1. Microbiología de <i>H. pylori</i>	7
1.2. Importancia clínica de <i>H. pylori</i>	8
1.2.1. Transmisión y manifestaciones clínicas de la infección por <i>H. pylori</i>	9
1.2.2. Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i>	11
1.2.3. Tratamiento para erradicar la infección por <i>H. pylori</i>	13
1.2.4. Resistencia a los fármacos para el tratamiento de <i>H. pylori</i>	14
1.3. Patogenicidad de <i>H. pylori</i>	16
1.3.1. Neutralización del ácido gástrico por <i>H. pylori</i>	17
1.3.2. Citoadherencia y citotoxicidad por <i>H. pylori</i>	18
1.3.3. Evasión de la respuesta inmune y apoptosis	21
1.4. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en <i>H. pylori</i>	22
1.5. Aptámeros.....	23
Antecedentes particulares	
2. El papel de las proteínas de la familia <i>Hop</i> con función de adhesina..	28
2.1. La familia <i>Hop</i>	28
2.1.1. Homología estructural del sitio de adhesión de las adhesinas de la familia <i>Hop</i>	30
2.1.2. Disminución de la colonización de <i>H. pylori</i> mediada por el bloqueo de las adhesinas de la familia <i>Hop</i>	36
2.2. El uso de los aptámeros en la detección y control de enfermedades causadas por bacterias.	38

2.2.1. Inhibición de la adhesión y formación de biopelículas mediante un aptámero.	40
2.3. Estudios <i>in silico</i> con aptámeros	41
2.3.1. Asignación de aptámeros asistido por computadora	36
Hipótesis	47
Justificación.....	47
Objetivos.....	48
Objetivo general	48
Objetivos particulares.....	48
Estrategia <i>in silico</i>	49
Metodología	50
Resultados	55
Discusión	79
Conclusiones	87
Perspectivas	88
Referencias	89
Anexo 1. Calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas.....	100
Anexo 2. Selección de los aptámeros para cada adhesina.....	105
Anexo 3. Gráficos de calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas.....	112
Anexo 4. Secuencias de los aptámeros seleccionados y su notación de paréntesis.....	121

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estrategias de erradicación de la infección por <i>H. pylori</i> determinadas por la Organización Mundial de Gastroenterología.....	14
Tabla 2. Aptámeros dirigidos a bacterias.....	39
Tabla 3. Modelado <i>Ab initio</i> de las adhesinas AlpA, AlpB y OipA	67
Tabla 4. Modelado por homología de las adhesinas BabB y HopZ	68
Tabla 5. Aptámeros seleccionados para cada adhesina de la familia Hop de <i>H. pylori</i>	69
Tabla 6. Predicción de interacción adhesina- aptámero seleccionado.....	70
Tabla 7. Acoplamiento molecular adhesina-aptámero seleccionado.....	71
Tabla 8. Aptámero seleccionado como control de unión negativa a la región de cabeza (verde) y corona (magenta) de todas las adhesinas de la familia Hop de <i>H. pylori</i>	72
Tabla 9. Aptámero seleccionado como control de unión negativa a la adhesina HpaA de <i>H. pylori</i>	73
Tabla 10. Control de especificidad.....	74
Tabla 11. Mutaciones por glicina en la interfaz aptámero-adhesina.....	75
Tabla 12. ID de proteína en UniProt y residuos de aminoácidos que fueron mutados	75
Tabla 13 A. Modelado de las adhesinas mutadas AlpA, AlpB, BabA, BabB, SabA y LabA.....	76
Tabla 13 B. Modelado de las adhesinas mutadas OipA, HopQ y HopZ.....	77
Tabla 14. Acoplamiento molecular de las adhesinas mutadas de la familia Hop de <i>H. pylori</i> con su aptámero seleccionado.	78

ÍNDICE DE FIGURAS

1	Morfología de <i>H. pylori</i>	7
2	Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i> a nivel mundial.....	9
3	Mutaciones de <i>H. pylori</i> asociados a la resistencia a los fármacos de tratamiento.....	16
4	Proceso de infección de <i>H. pylori</i>	17
5	Proteínas de la membrana externa de <i>H. pylori</i> involucradas en la adhesión bacteriana.....	19
6	Blancos reconocidos por aptámeros.....	24
7	Aplicación de los aptámeros.....	25
8	Tubería clásica de la selección <i>in silico</i> de un aptámero.....	27
9	Filogenia del conjunto de proteínas de membrana externa identificadas en <i>Helicobacter pylori</i>	28
10	Arquitectura de los dominios de las proteínas <i>Hop</i> y <i>Hor</i> de <i>H.</i> <i>pylori</i>	29
11	Estructura cristalina del dominio de adhesión N-terminal de la adhesina SabA (HopP) de <i>H. pylori</i>	31
12	Residuos de aminoácidos conservados en el dominio de cabeza de la adhesina SabA y su parche cargado positivamente.....	31
13	Arquitectura del dominio extracelular N-terminal de BabA.....	32
14	Estructura de los bucles de interacción de la adhesina HopQ- CEACAM1.....	33
15	Arquitectura del dominio extracelular N-terminal de LabA.....	34
16	Superposición de los dominios de adhesión de A) SabA, B) BabB, C) HopQ con LabA (gris)	35
17	Adherencia de <i>H. pylori</i> al tejido gástrico.....	37
18	Adherencia de distintas cepas de <i>H. pylori</i> a la mucosa gástrica pretratada con anticuerpos monoclonales para los receptores de LabA.....	38
19	Esquema de acción del aptámero 3 dirigido a los dominios funcionales de la flagelina de <i>Salmonella choleraesuis</i>	40
20	Efecto de los aptámeros en <i>Cándida albicans</i>	41

21	Asignación de aptámeros asistido por computadora.....	42
22	Acoplamiento molecular en HDOCK.....	46
23	MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas BabA (HopS) de <i>H. pylori</i>	56
24	MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas SabA (HopP) de <i>H. pylori</i>	57
25	MSA del extremo N-terminal (residuos1-400) de las adhesinas LabA (HopD) de <i>H. pylori</i>	58
26	MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas HopQ de <i>H. pylori</i>	59
27	MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas AlpA (HopC) de <i>H. pylori</i>	60
28	MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas AlpB (HopB) de <i>H. pylori</i>	61
29	MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas BabB (HopT) de <i>H. pylori</i>	62
30	MSA del extremo N-terminal (residuos 1-203) de las adhesinas HopZ de <i>H. pylori</i>	63
31	Panel A. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-160) de las adhesinas OipA (HopH) de <i>H. pylori</i>	64
32	Panel B. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-160) de las adhesinas OipA (HopH) de <i>H. pylori</i>	65

ABREVIATURAS

<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
MALT	linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica
OMP	Proteína de membrana externa
ADN	Ácido desoxirribonucleíco
ARN	Ácido ribonucleíco
Cag-PAI	Isla de patogenicidad
OMS	Organización Mundial de la Salud
WGO	Organización Mundial de Gastroenterología
PCR	Reacción en Cadena de la Polimeraza
FISH	hibridación <i>in situ</i> fluorescente
PAU	Prueba de aliento con urea marcada
BabA	Adhesina de unión al antígeno del grupo histo-sanguíneo fucosilado
BabB	Adhesina de unión a antígenos sanguíneos lewis ^b
TSS4	Sistema de secreción tipo IV
AlpA	Lipoproteína A asociada a la adherencia
AlpB	Lipoproteína B asociada a la adherencia
SabA	Adhesina de unión a ácido siálico
OipA	Proteína inflamatoria externa A
LabA	Adhesina de unión a residuos LacdiNAc
CagA	Antígeno inmunodominante asociado a la citotoxicidad
VacA	Citotóxina vacuolizante A
VHC	Virus de hepatitis tipo C
ZIKV	virus del zika
DENV	virus del Dengue
SARS-CoV	Síndrome respiratorio agudo severo por Coronavirus
VIH	Virus de inmunodeficiencia Humana
SELEX	Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial
CEACAM	moléculas del antígeno carcinoembrionario humano
ID	Identidad de secuencia
RMSD	Desviación cuadrática media de la raíz atómica
CAPRI	Evaluación crítica de la predicción de interacciones

RESUMEN

La infección por *H. pylori* se ha convertido en un problema de salud pública debido a la resistencia bacteriana a los antibióticos de tratamiento, la prevalencia de la infección a nivel mundial y su papel en el desarrollo de carcinoma gástrico y el linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT).

En nuestro grupo de trabajo, la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para erradicar la infección por *H. pylori*, apuntó a hacia las adhesinas de la familia del lúpulo (*Hop*), proteínas de la membrana externa (OMP's) de la bacteria que actúan como factores de virulencia en el proceso de adhesión del patógeno a las células epiteliales gástricas del humano, un proceso crucial para el establecimiento de la infección.

Una alternativa novedosa para el tratamiento y erradicación de *H. pylori*, es el uso de aptámeros de ARN que con el desarrollo las metodologías clásicas de asignación de aptámeros *in silico* y la asignación de fármacos mediante métodos computacionales, ambos validados experimentalmente, han conferido validez a la bioinformática en la investigación científica, disminuyendo además los tiempos y costos de experimentación.

Los resultados de nuestro trabajo *in silico* muestran que los nueve aptámeros de ARN seleccionados para cada adhesina de la familia *Hop* predicen una sola conformación tridimensional estable termodinámicamente. Además, se predijo parches electrostáticos positivos de unión a ARN en el exodominio de adhesión de las adhesinas cristalizadas y modeladas con su respectiva validación estereoquímica, que se confirmó con la predicción de interacción positiva aptámero-adhesina y con el acoplamiento molecular dirigido al parche electrostático positivo, mostrando una alta afinidad, especificidad y selectividad por la estructura homologa de mango-cabeza-corona de cada adhesina, que se perdió al realizar seis mutaciones simultáneas en residuos de aminoácidos conservados por arriba del 70% ubicados en el área de interfaz aptámero-adhesina. Además, no se observó reactividad cruzada con otras adhesinas como HpaA de *H. pylori* y FimH de *E. coli*, lo que redundaría a futuro en nuevos esquemas de tratamiento para la erradicación de la infección de *H. pylori* mediante la inhibición de su mecanismo de adhesión. No obstante, estamos reportando por primera la conservación de regiones de aminoácidos involucrados en la formación de la estructura de mango-cabeza-corona de las adhesinas AlpA, AlpB, BabB, LabA, OipA, HopZ y HopQ y presentamos su modelado molecular.

ABSTRACT

H. pylori infection has become a public health problem due to bacterial resistance to antibiotic treatment, the prevalence of the infection worldwide and its role in the development of gastric carcinoma and gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma (MALT).

In our group, the search for new therapeutic targets to eradicate *H. pylori* infection was focused on adhesins of the *Hop* family, outer membrane proteins (OMPs) of the bacterium that act as virulence factors in the process of pathogen adhesion to human gastric epithelial cells, a crucial process for the establishment of the infection.

A novel alternative for the treatment and eradication of *H. pylori* is the use of RNA aptamers that, with the development of classical methodologies of *in silico* aptamer assignment and drug assignment by computational methods, both experimentally validated, have given validity to bioinformatics in scientific research, also reducing the time and costs of experimentation.

The results of our *in silico* work show that the nine RNA aptamers selected for each adhesin in the *Hop* family predict a single thermodynamically stable three-dimensional conformation. Furthermore, positive electrostatic RNA-binding patches were predicted in the binding exodomain of the crystallized and modeled adhesins with their respective stereochemical validation, which was confirmed by the predicted positive aptamer-adhesin interaction and molecular docking directed to the positive electrostatic patch, showing high affinity, specificity and selectivity for the homologous handle-head-crown structure of each adhesin, which was lost by performing six simultaneous mutations in amino acid residues conserved above 70% located in the aptamer-adhesin interface area. Furthermore, no cross-reactivity was observed with other adhesins such as HpaA from *H. pylori* and FimH from *E. coli*, which could lead to new treatment schemes for the eradication of *H. pylori* infection by inhibiting its adhesion mechanism. Nevertheless, we are reporting for the first time the conservation of amino acid regions involved in the formation of the handle-head-crown structure of the adhesins AlpA, AlpB, BabB, LabA, OipA, HopZ and HopQ and present their molecular modeling.

1. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

1.1. Microbiología de *H. pylori*

En 1983 Marshall y Warren descubrieron a un patógeno capaz de colonizar el estómago de humano asociado a enfermedades como la gastritis y úlceras peptídicas que inicialmente se había designado a la especie *Campylobacter* y tiempo después se clasificó como *H. pylori*. Hoy en día se sabe que es una bacteria Gram negativa con morfología helicoidal (1 a 3 vueltas) predominantemente; sin embargo, puede encontrarse en forma de bacilo o coco en cultivo. Tiene un tamaño de 2 a 4 μ de largo por 0.5 a 1 μ de ancho y cuenta con 3 a 7 flagelos monopolares en forma de gancho (figura 1) (Kusters, J. 2006).



Figura 1. **Morfología de *H. pylori***, tomado de Formento, M. *et al.*, 2004. En la imagen se observa la morfología helicoidal de la bacteria con cinco flagelos en forma de gancho.

Esta bacteria tiene la capacidad de crecer en ambientes microaerófilicos, cuenta con un metabolismo oxidativo y fermentativo, capaz de catabolizar la glucosa, pero no otros azúcares, para el cual requiere de elementos metálicos como el hierro, níquel, cobre

y cobalto. Así mismo, es una bacteria positiva para ureasa, catalasa y oxidasa (Kusters, J. 2006).

Su genoma está conformado por 1.5 a 1,7 Mb y un aproximado de 1491 a 1587 genes anotados (Lara-Ramírez, E., *et al.*, 2011; Kusters, J. 2006). De su genoma, el 4% codifica para proteínas de la membrana externa (OMP) (~64 OMPs) que le permiten mantener la estructura de la membrana externa, garantizar el transporte de material y tener contacto con las células epiteliales gástricas (Šterbenc, A., *et al.*, 2019; Xu, C. *et al.*, 2020). No obstante, las OMPs también están involucradas en la virulencia de *H. pylori* a través de mecanismos como la adhesión, penetración de la barrera de defensa y evasión del sistema inmunológico (Testerman, T. L., & Morris, J. 2014; Xu, C. *et al.*, 2020). Algunas de las cepas de la especie *H. pylori* cuentan con una región de ADN de 40 Kb denominada isla de patogenicidad (Cag-PAI) que contiene aproximadamente 27 genes, de los cuales, 17 se encargan de formar el sistema de secreción de tipo IV mediante el cual secreta la proteína Cag A a la célula huésped, así mismo, contiene el gen de la proteína efectora CagA y otras proteínas asociadas a un mayor riesgo de desarrollar carcinoma gástrico y úlceras peptídicas, en comparación con aquellas cepas que no contienen a Cag PAI en su genoma, debido a su heterogeneidad genética (Cover, T, *et al.*, 2020).

1.2. Importancia clínica de *H. pylori*

Luego de los estudios realizados por Marshall y Warren que les hicieron acreedores del premio Nobel de Medicina en el 2005 donde reportaron que la bacteria *H. pylori* podía colonizar el estómago de humanos y conducir a una inflamación crónica de la mucosa gástrica e infecciones recurrentes (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014), la infección por *H. pylori* se determinó como un agente etiológico en la formación de úlceras gástricas y duodenales, el carcinoma gástrico y el linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT). Epidemiológicamente el 85-95% de la población de los países en desarrollo está infectado por *H. pylori* (Sharndama, H. C. & Mba, I., 2022) y en México la prevalencia de la infección en la población se encuentra en un rango de 50-69% (figura 2) (Hooi, J., *et al.*, 2017).

Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS), incluyó en su lista de bacterias para la que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos a *H. pylori* debido a

la alta tasa de resistencia bacteriana a los antibióticos establecidos para su tratamiento (OMS, 2020).

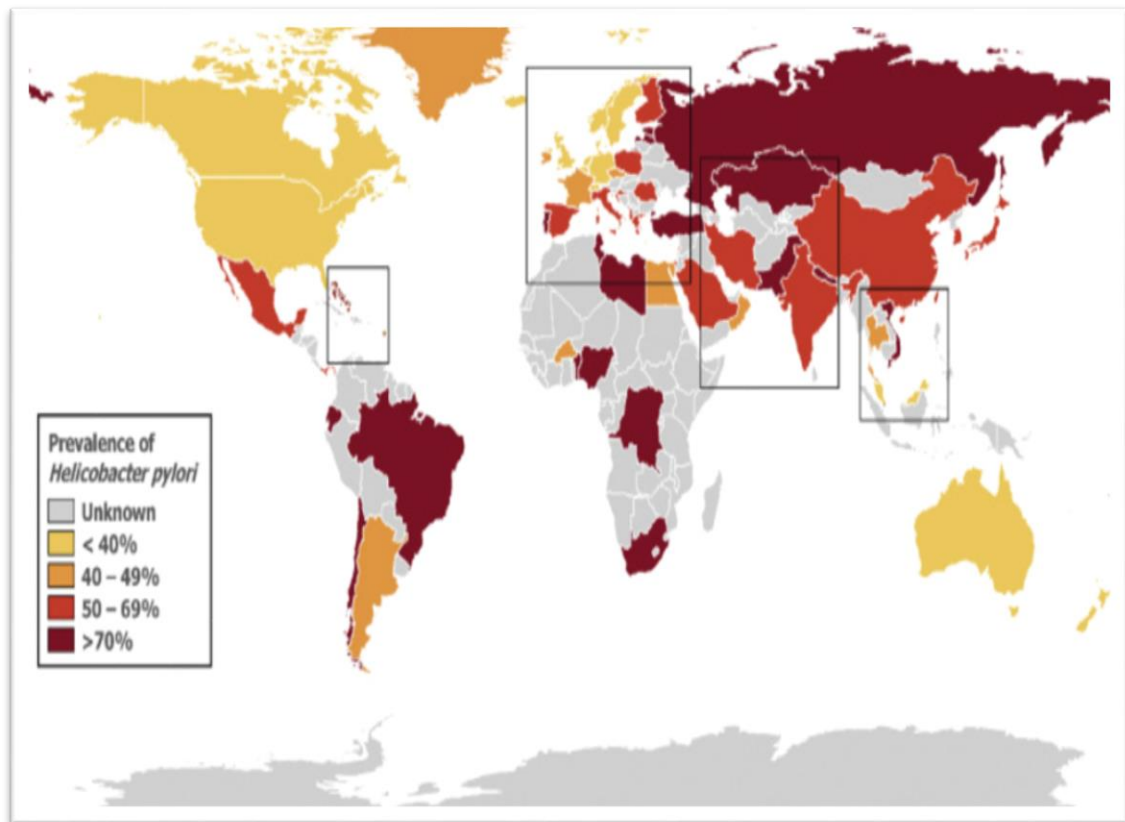


Figura 2. **Prevalencia de la infección por *H. pylori* a nivel mundial**, tomado y modificado de Hooi, J., *et al.*, 2017. La prevalencia de la infección del patógeno de menor a mayor se muestra en el código de colores gris a rojo oscuro respectivamente.

1.2.1. Transmisión y manifestaciones clínicas de la infección por *H. pylori*

H. pylori es una bacteria que ha mostrado una antigua asociación con el humano proveniente del este de África y sus posteriores asentamientos humanos a través de la historia. Actualmente se han asignado cuatro grupos de poblaciones de *H. pylori* por su distribución: hpAfrica1, hpAfrica2, hpEastAsia y hpEurope. Posteriormente, la población hpEastAsia se dividió en las subpoblaciones hspAmerind, hspEAsia y hspMaori, y la población hpAfrica1 en hspWAfrica y hspSAfrica. De las cuales, la subpoblación de hspAmerind representó aislados de los inuits y amerindios del norte y Sudamérica, y en menor proporción se aisló subpoblaciones hspWAfrica en las Américas (Falush, D., *et al.*, 2003).

La transmisión de *H. pylori* no se encuentra establecida con mucha precisión, sin embargo, las Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO por sus siglas en inglés) del 2021, muestran evidencia sobre la transmisión de persona a persona, siendo las vías más aceptadas de ingestión de la bacteria: gastro-oral y oral-oral, sin descartar la vía fecal-oral (WGO,2021).

Los síntomas que causan la infección por este patógeno se presentan principalmente en la región abdominal superior como son: el dolor y/o ardor epigástrico, saciedad temprana, plenitud posprandial (Bosques-Padilla, F., *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha establecido la asociación de *H. pylori* con el desarrollo de otras enfermedades gástricas más graves:

a) Gastritis aguda y crónica.

La infección por *H. pylori* en la gastritis aguda puede asociarse con síntomas dispépticos transitorios e inespecíficos (plenitud, náuseas, vómitos, inflamación de la mucosa del estómago o pangastritis), además de una hipoclorhidria que puede durar meses. En la gastritis crónica, cuando la colonización bacteriana se vuelve persistente, la correlación entre el nivel de secreción de ácido y la distribución de la gastritis, se hace evidente, es decir, cuando la secreción de ácido está intacta, *H. pylori* coloniza el antro gástrico, donde hay pocas células parietales secretoras de ácido, en contraste, cuando la secreción de ácido está alterada, la bacteria tiene una distribución más uniforme en el antro y el cuerpo lo que permite un mayor contacto con la mucosa desarrollando una pangastritis. Además, la inflamación crónica, puede conducir a la pérdida de la arquitectura normal de la mucosa gástrica y por lo tanto a aumenta el riesgo de cáncer gástrico (Kusters, J. G., *et al.*, 2006).

b) Úlcera péptica.

Se calcula que la infección por *H. pylori* confiere un riesgo individual de úlcera péptica del 15 al 20% a lo largo de la vida y se puede identificar por la hemorragia digestiva, perforación y formación de estenosis. Las úlceras gástricas ocurren en la curvatura menor del estómago, en particular, en la transición de la mucosa del

cuerpo al antro, y las duodenales generalmente ocurren en el bulbo duodenal (área más expuesta al ácido gástrico) (Kusters, J. G., *et al.*, 2006; WGO, 2021).

c) Cáncer gástrico y MALT .

La gastritis crónica puede originar atrofia de la mucosa gástrica con metaplasia intestinal y estos cambios premalignos, pueden evolucionar hacia una displasia, cáncer clínicamente silencioso y luego a cáncer gástrico avanzado. Las estimaciones de riesgo de desarrollar cáncer a causa de la infección por *H. pylori* son de 1.5 a 2 %, sin embargo, los reportes de carga mundial de cáncer ubican el cáncer de estómago dentro de los primeros cinco, con 1.09 millones de casos. El desarrollo de MALT a causa de la infección por *H. pylori* es poco frecuente, no obstante, la mayoría de los casos de MALT son consecuencia de este patógeno, afortunadamente la erradicación de la bacteria cuando el linfoma es de bajo grado, puede inducir la regresión y curación de los pacientes (WGO, 2021).

1.2.2. Diagnóstico de la infección por *H. pylori*

Hoy en día, existen diferentes métodos de diagnóstico disponibles para detectar la infección por *H. pylori* que pueden ser pruebas invasivas (endoscópicas) y no invasivas (no endoscópicas), lo más eficaz suele ser la combinación de dos modalidades de pruebas según lo último publicado por las Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología (WGO, 2021).

a) Pruebas invasivas.

La endoscopía es una evaluación visual que se utiliza para obtener una biopsia (muestra) y evaluar el grado de patología en el estómago. Esta se puede combinar con histología y/o cultivo de la muestra de biopsia gástrica (Pohl, D., *et al.*, 2019). Las tinciones de Giemsa, Warthin-Starry y Diff-Quik, tinción estándar de hematoxilina y eosina son utilizadas para la identificación de *H. pylori*, la evaluación de la inflamación y también proporcionan evidencia de metaplasia

intestinal. Sin embargo, se requieren múltiples biopsias y capacitación del personal (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

La prueba rápida de ureasa de *H. pylori* utiliza muestras de tejido gástrico que se colocan en una tira reactiva o gel de agar a la cual se agrega un indicador de color sensible al pH, tampón y urea. La urea se convierte en amoníaco provocando el aumento de pH, por lo tanto, el cambio de color la muestra. Su sensibilidad es superior al 93 % y su especificidad es del 98 % (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

El aislamiento y cultivo de *H. pylori* a partir de biopsias gástricas proporciona alta especificidad, sin embargo, requiere de condiciones especiales de transporte (temperatura, duración de la exposición al aire, etc.), calidad de la muestra, la presencia de flora microbiana comensal, el intervalo de tiempo entre la toma de la muestra, el cultivo y el transporte. Además, requiere de personal de laboratorio altamente capacitado y el manejo de equipo especializado (Pohl, D., *et al.*, 2019).

La detección de ADN de *H. pylori* mediante PCR en biopsias tiene una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%. Sin embargo, el mal uso del endoscopio puede interferir en la toma de muestras y crear falsos positivos; también pueden obtenerse falsos negativos debido a los inhibidores de la PCR en el tejido gástrico o las heces. Esta técnica también puede utilizarse en saliva y heces (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) también tiene una buena sensibilidad y especificidad en la detección de *H. pylori* en biopsias, sin la necesidad de extraer el ADN. Esta técnica utiliza una sonda de ADN marcada con fluorescencia que hibrida con la secuencia complementaria dentro del cromosoma bacteriano (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

b) Pruebas no invasivas.

La prueba de aliento con urea marcada con el isótopo estable C^{13} o C^{14} (PAU) son muy útiles y tienen mayor exactitud diagnóstica que otras pruebas no invasivas (WGO, 2021). Consiste en beber urea marcada con el isótopo estable C^{13} o C^{14} , este se convierte en dióxido de carbono y amoníaco por la ureasa creada por *H.*

pylori; el dióxido de carbono se absorbe en el torrente sanguíneo y se analiza una muestra de aire espirado para detectar la presencia del carbono marcado. Esta prueba, tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 98% (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

Las pruebas de antígenos fecales, son tan precisas como las PAU, sin embargo, el personal sanitario y especializado muestran menos preferencias por realizar este tipo de pruebas (WGO, 2021). Se utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección de *H. pylori* y tienen una sensibilidad y especificidad del 94.1 % y 91.8% respectivamente (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

Las pruebas serológicas de anticuerpos están muy generalizadas, ya que están ampliamente disponibles y son económicas, sin embargo, carecen de sensibilidad y especificidad para la decisión de tratamiento en el paciente (WGO, 2021). Estas pruebas son placas de de microtitulación recubiertas con antígenos de *H. pylori*, combinados con un anticuerpo secundario y se utilizan para detectar IgG específica de *H. pylori*. Su sensibilidad es de 85% y su especificidad de 79% (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

1.2.3. Tratamiento para erradicar la infección por *H. pylori*

Existen diferentes opciones terapéuticas y directrices que han establecido principios universales en la terapia antibiótica para erradicar la infección por *H. pylori*, entre los que destacan la disponibilidad del fármaco, adherencia al tratamiento, diferencia local en las tasas de resistencia bacteriana a la terapia, dosis, duración, costo y la transmisión de información clara entre el médico-paciente, los cuales son un punto clave en la elección del tratamiento para cada paciente (WGO, 2021).

Los regímenes estándares de actuales de primera línea para la erradicación de *H. pylori* consisten en cuatro estrategias terapéuticas diferentes según lo establecido por la Organización Mundial de Gastroenterología (tabla 1) (WGO, 2021).

Terapia	Estrategia
Triple	Establece el uso de inhibidores de la bomba de protones (IBP), amoxicilina y claritromicina durante 14 días.
Cuádruple a base de bismuto	Esta utiliza una combinación de un inhibidor de la bomba de protones (IBP), un producto de bismuto y antibióticos que contienen metronidazol y tetraciclina durante 7 a 14 días.
Cuádruple sin bismuto	Establece el uso de un IBP, amoxicilina, claritromicina y metronidazol, sino existe resistencia a este último fármaco.
Triple con levofloxacin	Esta estrategia incluye el uso de un IBP, amoxicilina y levofloxacin durante 10 a 14 días

Tabla 1. Estrategias de erradicación de la infección por *H. pylori* determinadas por la Organización Mundial de Gastroenterología.

Sin embargo, debido a la progresión lenta de *H. pylori*, el gran número de personas infectadas y su persistencia en los informes de consenso a nivel internacional, las campañas de prevención y estrategias de erradicación de la infección por dicho patógeno no ha recibido la atención adecuada en la mayoría de los países, aunado la enorme carga financiera y médica, por lo que la urgencia por encontrar nuevas estrategias o fármacos sigue estando vigente (Ding S. Z. 2020; WGO, 2021).

1.2.4. Resistencia a los fármacos para el tratamiento de *H. pylori*

Una de las razones que ha llamado la atención del sector de salud pública en la erradicación de la infección causada por *H. pylori*, es su resistencia a los antibióticos. Se ha demostrado que las tasas de resistencia a los antibióticos de primera línea de tratamiento son muy altas, siendo la del metronidazol la más frecuente con un 50% a nivel mundial en contraste con la amoxicilina que se encuentra por debajo del 3% en países como América y Europa, no obstante, el aumento de la resistencia a la claritromicina y la levofloxacin se ha atribuido al uso generalizado de estos antibióticos para las infecciones del tracto respiratorio y del tracto urinario, respectivamente (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014; Roszczenko-Jasińska, P., *et al.*, 2020).

El estudio de la susceptibilidad antibacterial a los fármacos es considerado como una alternativa ante la resistencia bacteriana, de tal manera que se pueda optimizar y reducir el uso de antibióticos en el tratamiento para *H. pylori*. Sin embargo, el éxito de las terapias no solo depende de este factor, sino también de las dosis, las formulaciones, el uso de adyuvantes, la duración del tratamiento y las tasas de reinfección. Otra opción que se ha propuesto es el uso de programas de vigilancia de la resistencia de *H. pylori* en todo el mundo para lo cual se requiere la obtención de biopsias, un aspecto que resulta en un desafío por la propia invasividad de la endoscopia (Roszczenko-Jasińska, P., *et al.*, 2020).

En los estudios sobre la resistencia bacteriana a los fármacos de tratamiento como la claritromicina que actúa sobre los ribosomas bacterianos inhibiendo la síntesis de aminoácidos, se ha relacionado con el 90% de la resistencia bacteriana a la mutación del gen *rrl* el cual codifica la subunidad ribosomal 23S, en las posiciones A2146G, A2147G y A2146C (Rehman, A., 2018; Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

Otra mutación implicada en la resistencia de *H. pylori* a las quinolonas y fluoroquinolonas de tratamiento que actúan sobre el ADN bacteriano, es la del gen *gyrA* en las posiciones Asn- 87, Asp-91, N87K y D91G, un elemento regulador que contribuye a la topología del ADN en la en la escisión y reordenación del ADN bacteriano (Rehman, A., 2018).

El metronidazol es otro fármaco de tratamiento que actúa desregulando el potencial de membrana y la integridad de la membrana del patógeno mediante la reacción redox de la nitroreductasa y la nitroreductasa NADPH insensible al oxígeno. Sin embargo, *H. pylori* también ha desarrollado mutaciones en los genes *frxA* (nitroreductasa) y *rdxA* (nitroreductasa NADPH insensible al oxígeno) dando lugar a su inactivación (Rehman, A., 2018; Testerman, T. L., & Morris, J., 2014).

Otros fármacos como la rifabutina, actúan sobre la subunidad β de la ARN polimerasa (RPO), y de igual manera, las mutaciones en el gen *rpoB* en las posiciones 524, 525 y 585 le confieren resistencia a la bacteria. Así mismo, la bacteria a generado mutaciones en el gen del ARN 16S en las posiciones AG-926/927-GT y A926G/A928C que impiden el bloqueo de la síntesis de proteínas por la tetraciclina, además de que estas mutaciones propician a la formación de bombas de exclusión de tal manera que el fármaco no se acumule en en el interior de la célula bacteriana (Figura 3) (Testerman, T. L., & Morris, J., 2014; Rehman, A., 2018).

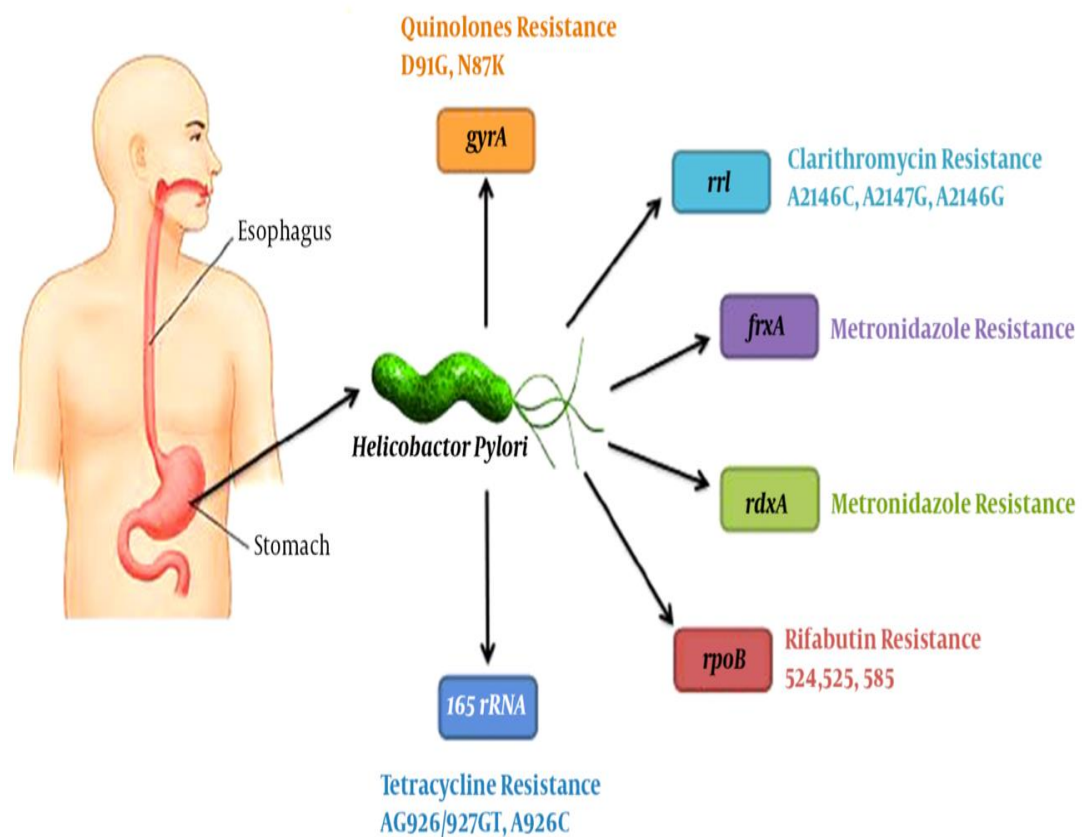


Figura 3. **Mutaciones de *H. pylori* asociados a la resistencia a los fármacos de tratamiento** tomado de Rehman, A., 2018. Se muestran con flechas los genes mutados en *H. pylori* que favorecen la resistencia bacteriana de los fármacos como: quinolonas, claritromicina, metronidazol, rifabutin y tetraciclina.

1.3. Patogenicidad de *H. pylori*

El estudio de la patogenicidad de *H. pylori* ha permitido la comprensión de su proceso de infección en el tracto digestivo, lo que ha favorecido el desarrollo de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas para su erradicación, por lo que es importante describir los procesos de colonización y establecimiento de *H. pylori* con éxito en el huésped. Para ello, la bacteria ha desarrollado propiedades de virulencia como: la neutralización del ácido gástrico, la citoadherencia, la citotoxicidad, la evasión de la respuesta inmune y finalmente la apoptosis (Figura 4) (Sharndama, H. & Mba, I., 2022).

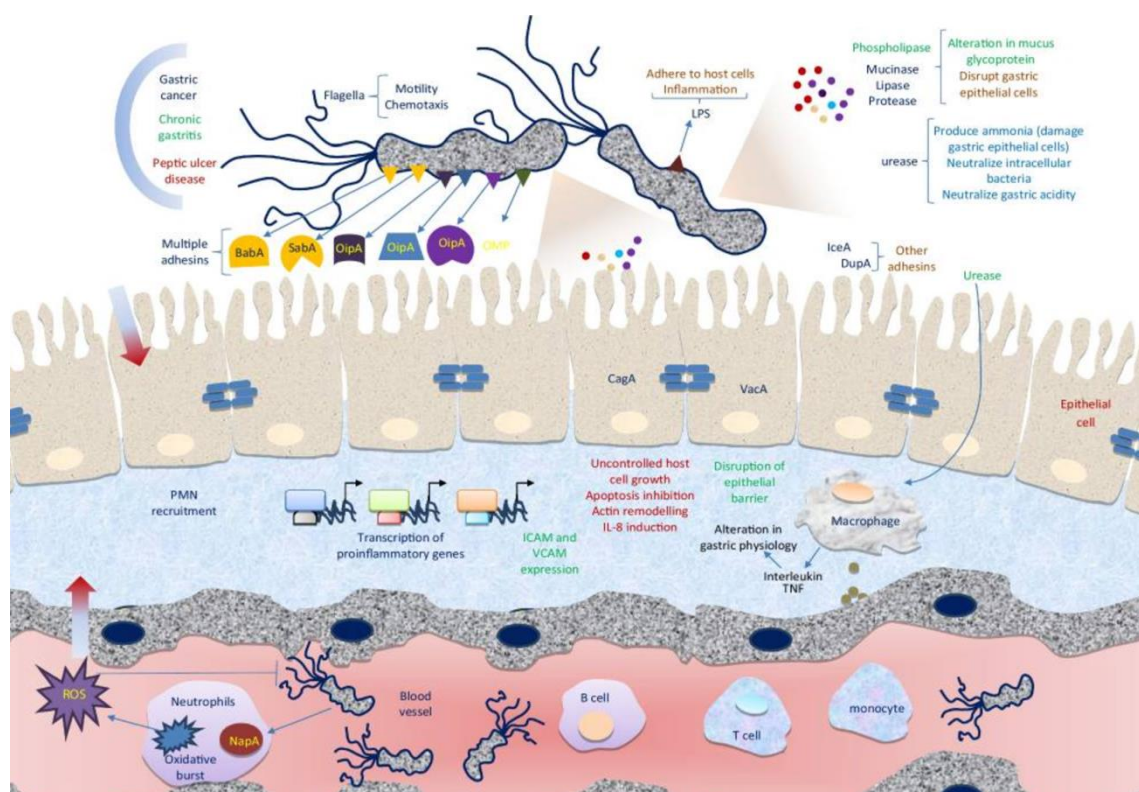


Figura 4. **Proceso de infección de *H. pylori*** tomado de Sharndama, H. & Mba, I., 2022. La bacteria mediante la motilidad y quimiotaxis se adhiere al epitelio gástrico mediante múltiples adhesinas causando inflamación en la célula huésped induciendo la formación de úlceras gástricas, gastritis crónica y el desarrollo de cáncer. Las fosfolipasas, mucinasas, lipasas y proteasas inducen la disrupción de las células epiteliales gástricas y alteran la composición de glicoproteínas en la mucosa. La ureasa secretada por la bacteria induce el reclutamiento de macrófagos alterando la fisiología del epitelio. La invasión bacteriana del epitelio gástrico induce también el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN), células B, células T, monocitos y neutrófilos que mediante las especies reactivas de oxígeno favorecen la transcripción de genes pro-inflamatorios, alterando la apoptosis, el remodelamiento de actina y la inducción de la IL-8.

1.3.1. Neutralización del ácido gástrico por *H. pylori*

La morfología de *H. pylori* tiene un papel principal en la patogenicidad bacteriana, su forma helicoidal le proporciona motilidad y le protege de las condiciones ácidas del estómago. Además, sus flagelos le permiten movilidad y adhesión. Estos le protegen del ambiente ácido del estómago, es decir, en el pH ácido del estómago, los flagelos tienen una fuerza motriz de protones mayor conduciendo a la bacteria hacia la mucosa gástrica para atravesarla y establecerse en el epitelio gástrico (Sharndama, H. & Mba, I., 2022; Ansari, S., & Yamaoka, Y., 2019).

Como el ambiente ácido del estómago no es óptimo para la bacteria, es secretado otro factor de virulencia: la ureasa. Su reacción se basa en la hidrólisis de la urea en amoníaco (NH_3) y carbamato, que luego se descompone en otro amoníaco (NH_3) y ácido carbónico (H_2CO_3), este último se descompone en moléculas de dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O). El amoníaco en su forma protonada (NH_4^+) es el encargado de neutralizar la acidez estomacal, desempeñando un papel importante en la formación de un microambiente casi neutro y favorable alrededor de *H. pylori*. Además el CO_2 se convierte en bicarbonato (HCO_3^-) y H^+ en el espacio periplásmico de la bacteria mediante la anhidrasa carbónica α periplásmica, manteniendo un pH de 6.1 periplásmico, y de esta manera, la producción de NH_3 y CO_2 proporciona el entorno necesario para la supervivencia gástrica de *H. pylori* en el ambiente hostil del estómago (Sharndama, H. & Mba, I., 2022; Ansari, S., & Yamaoka, Y., 2019).

Además, la producción de NH_4^+ tiene como función interrumpir las uniones celulares estrechas, romper la integridad celular y dañar el epitelio gástrico. En contraste, el CO_2 , tiene como función proteger a la bacteria de la actividad bactericida de productos metabólicos como el óxido nítrico y la muerte intracelular por parte de los fagocitos. Aunado a esto, la ureasa es capaz de unirse al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II e inducir la apoptosis celular (Ansari, S., & Yamaoka, Y., 2019).

1.3.2. Citoadherencia y citotoxicidad por *H. pylori*

Un paso crucial en el establecimiento de la infección, es la adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico, donde las adhesinas bacterianas tienen un papel fundamental. Estas son OMP's que se unen a receptores ubicados en las células epiteliales protegiendo a la bacteria de los mecanismos de eliminación del huésped como: el flujo de ácido gástrico, la peristalsis, el depredamiento y reposición de la mucosa, acceso nutricional para la bacteria y entrega de toxinas y moléculas efectoras a las células huésped (Sharndama, H. & Mba, I., 2022).

Los estudios reportan que *H. pylori* expresa alrededor de 64 OMP's, la familia más importante en la adhesión está compuesta por los genes de *lúpulo* (*Hop*) con un perfil de expresión variable, que codifican para adhesinas que comparten una similitud de secuencia en sus extremos terminales amino y carboxilo como: BabA, BabB, AlpA, AlpB, SabA, OipA, LabA, HopZ y HopQ. Para la mayoría se ha podido determinar su

función de adhesina, sin embargo, aún no se conoce el receptor en la célula huésped para todas (Figura 5) (Paraskevopoulou, V., *et al.*, 2020; Sharndama, H. & Mba, I., 2022; Matos, R. *et al.*, 2021).

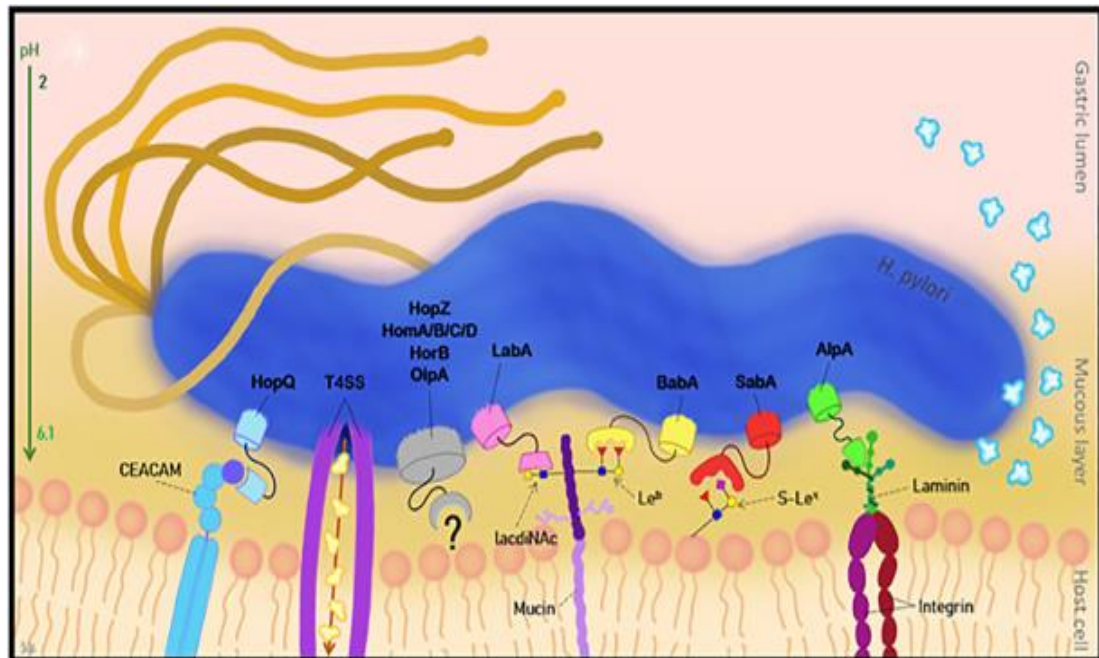


Figura 5. **Proteínas de la membrana externa de *H. pylori* involucradas en la adhesión bacteriana** tomado de Matos, R. *et al.*, 2021. Las proteínas de la membrana externa con función de adhesina se unen a sus respectivos receptores en las células epiteliales gástricas una vez que la bacteria ha atravesado la mucosa gástrica alterada mediante al cambio del pH inducido por la secreción de la ureasa.

Las adhesinas BabA (HopS) y BabB (HopT) (adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo) se unen a los antígenos del grupo sanguíneo H-tipo 1 y ABO/Lewis b (Leb) expresados en el epitelio gástrico, además de que su expresión facilita la actividad del TSS4 en la liberación de CagA y VacA promoviendo el daño a los tejidos del huésped a través de respuestas inmunitarias como: la infiltración de granulocitos, la liberación de IL-8, induciendo la inflamación gástrica (Baj, J., *et al.*, 2020).

Las lipoproteínas A y B asociadas a la adherencia, AlpA y AlpB, son las únicas adhesinas de la familia *Hop* que tienen una expresión ubicua en la cepas de *H. pylori*, éstas se unen a colágeno IV y laminina en las células epiteliales gástricas, estas adhesinas pueden regular la liberación de varias citocinas y factores proinflamatorios como la Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-8 (IL-8). Además de estar involucradas en la

activación de las vías ERK, c-Fos, JNK y NF- κ B (Senkovich, O. *et al.*, 2011; Baj, J., *et al.*, 2020).

La adhesina de unión al ácido siálico, SabA (HopP), se unen a los antígenos Sialyl-Lewis x y sialyl-Lewis en las células epiteliales gástricas y está asociada con la progresión de enfermedades gástricas, infiltración excesiva de neutrófilos y atrofia gástrica durante la infección. SabA tiene la capacidad de activar los neutrófilos humanos contribuyendo a la inflamación persistente a través de la inducción del daño oxidativo (Baj, J., *et al.*, 2020; Sharndama, H. & Mba, I., 2022).

Aunque no hay información clara sobre la estructura y los receptores de OipA (HopH) la proteína inflamatoria externa A, se sabe que es una adhesina capaz de activar la cascada apoptótica en las células huésped a través de la familia Bcl-2, aumenta los niveles de Bax y la caspasa 3 activa. Además, la síntesis de CagA y VacA está regulada por la expresión de esta adhesina y se ha informado que los pacientes con cepas que la expresan tienen un mayor riesgo de desarrollar úlceras pépticas y cáncer gástrico (Ansari, S., & Yamaoka, Y., 2019).

La adhesina HopQ se une a varios miembros de la familia de moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM) expresadas en el epitelio gástrico, de tal manera que desempeña un papel importante en la colonización de *H. pylori* y en la inhibición de las actividades de las células inmunitarias (Ansari, S., & Yamaoka, Y., 2019). Además, HopQ comparte identidades de secuencia de 35% con BabA y 23% con SabA, presentando una estructura de cabeza-corona relacionada con BabA, SabA y HopQ (Bonsor, D. A., *et al.*, 2018).

HopZ, otra adhesina de las OMP's de la familia *Hop*, aunque se desconoce su receptor en las células epiteliales, se sabe que facilita la adherencia bacteriana, estimula la colonización de *H. pylori* en la mucosa gástrica y está relacionada con la alteración de la secreción del ácido gástrico y la hipoclorhidria transitoria durante las primeras etapas de infección por *H. pylori* (Baj, J., *et al.*, 2020).

La adhesina específica de LacdiNAc, LabA (HopD), reconoce a LacdiNAc (N, N 1 -diacetylactosdiamine/GalNAcb4GlcNAc, LDN) en las células epiteliales gástricas. Se ha demostrado que a pesar de la baja similitud en su secuencia de aminoácidos con BabA, SabA y HopQ su estructura mango-cabeza-corona, donde se encuentra su sitio de adhesión, se conserva en todas ellas, lo que sugiere que esta estructura puede cumplir una función importante en la adhesión (Paraskevopoulou, V., *et al.*, 2020).

Si bien, algunas de las adhesinas tienen un papel importante en la inducción de citotoxicidad a nivel de mucosa y epitelio gástrico; el sistema de secreción tipo IV codificado por la “isla de patogenicidad Cag-PAI” tiene como función la inyección de la proteína efectora CagA inducida por la adherencia bacteriana en las células epiteliales. La proteína CagA induce alteraciones celulares en la motilidad celular, la proliferación celular, la apoptosis y la disposición del citoesqueleto. Sin embargo, los estudios han demostrado la existencia de cepas de *H. pylori* negativas para la expresión de la “isla de patogenicidad Cag-PAI” caracterizadas por una menor virulencia (Sharndama, H. & Mba, I., 2022).

Adicionalmente, la citotoxina A vacuolizante (VacA) secretada por la bacteria, está involucrada en la formación de poros en el huésped induciendo las vías de autofagia en las células epiteliales que ante una exposición crónica de la citotoxina, promueve la formación de autofagosomas dañados induciendo la formación de vacuolas intracelulares, permitiendo así la supervivencia y colonización bacteriana en el interior celular. En cambio, este gen está presente en todas las cepas de *H. pylori* (Baj, J., *et al.*, 2020).

El lipopolisacárido (LPS) también es un componente de la membrana externa de *H. pylori*, involucrado en la inducción de la progresión de la infección bacteriana crónica, activación de respuestas inflamatorias y la interrupción de la secreción de la mucosa gástrica virulencia (Sharndama, H. & Mba, I., 2022).

1.3.3. Evasión de la respuesta inmune y apoptosis

El éxito de la infección por *H. pylori* y su persistencia esta dada por la capacidad del patógeno para evadir el sistema inmunológico adaptativo a traves de la modulación de la activación de células T mediante su unión con VacA desencadenando un reordenamiento de actina y la inhibición de la proliferación; la formación de poros mediado por esta citotoxina también conduce a la producción de vacuolas en las células huésped que dan lugar a la apoptosis; en cuanto a la inhibición de la presentación de antígenos la bacteria, ha desarrollado estrategias para protegerse del reconocimiento de los anticuerpos mediante la inhibición de la exportación del complejo de histocompatibilidad de clase II y el efecto inhibitorio de CagA sobre la proliferación de las células T. Aunado a esto, *H. pylori* regula la inmunidad innata mediante la modulación de la función de los macrófagos induciendo la muerte celular asociada a la mitocondria, la producción de peroxirredoxina

y arginasa que protegen a la bacteria de los radicales NO u O²⁻. En cuanto a la inhibición de las células polimorfonucleares y monocitos, la bacteria utiliza a la proteína CagA para inducir la expresión de IL-8 involucrada en la inducción de células inflamatorias (Abadi,A., *et al.*, 2017).

1.4. Búsqueda de nuevas dianas terapéuticas en *H. pylori*

La importancia de erradicar la infección por *H. pylori* ha generado interés en los investigadores por buscar nuevas dianas farmacológicas que deriven en alternativas terapéuticas exitosas. La inhibición de la virulencia como una estrategia de erradicación del patógeno confiere ventajas que se hacen evidentes ante el problema de la resistencia bacteriana a los antibióticos utilizados para su tratamiento, sin alterar la microbiota del hospedero, de manera que la estrategia puede implicar la inhibición de un factor de virulencia o un proceso bacteriano involucrado en la virulencia bacteriana como se han propuesto: la inhibición de la proteasa Csd4 que tienen un papel fundamental en la forma helicoidal del patógeno; el bloqueo de CagA mediante una molécula pequeña que evita la traslocación de la molécula efectora al huésped; la inactivación de genes *dsb* que codifican para proteínas Dsb responsables de la formación de enlaces disulfuro entre los residuos de cisteína en las proteínas, lo que impide la modificación postraduccional de las proteínas para lograr estructuras funcionales y las OMP's con su papel en la adhesión de *H. pylori* a las células hospedero que también contienen residuos de cisteína involucrados en su conformación funcional; se ha demostrado que al generar una cepa deficiente de oxidoreductasa Dsb, da como resultado una estructura de HopQ (proteína de la familia *Hop* de unión a CEACAM) no funcional y una disminución significativa del proceso de virulencia de adhesión bacteriana (Roszczenko-Jasińska, P., *et al.*, 2020).

En los estudios *in silico*, proteómicos, metabolómicos y genómicos de la bacteria, se han identificado nuevos objetivos específicos de fármacos que han sido validados y aprobados mediante el acoplamiento molecular, estudios de interactoma y estudios estructurales. Por esta razón, las proteínas codificadas por el genoma central bacteriano, se vuelven un objetivo latente en esta búsqueda de nuevas dianas terapéuticas y se pueden clasificar en proteínas: de la biopelícula, del metabolismo y factores de virulencia de *H. pylori* (Roszczenko-Jasińska, P., *et al.*, 2020).

En el análisis *in silico* proteómico y filogenético del repertorio de proteínas de membrana externa de *H. pylori*, se ha determinado algunas OMP's con roles conocidos o supuestos en la virulencia o la colonización que pueden funcionar como dianas terapéuticas, tal es el caso de las proteínas de la membrana externa que conforman la familia 1 (Hop/Hor/Hom) y la familia 2 (Hof), de las cuales, las proteínas de la familia Hop son específicas de *H. pylori* y se encuentran involucradas en la adhesión bacteriana al epitelio gástrico, un proceso de virulencia fundamental para la colonización y establecimiento de la infección por este patógeno (Bawens, E., *et al.*, 2018).

Recientemente, se demostró mediante el acoplamiento molecular cómo la dioscina interactúa con la proteína SpoT reduciendo la formación de biopelículas de *H. pylori* (Spiegel, M., *et al.*, 2021). Así mismo, se ha identificado *in silico* nuevos candidatos a objetivos de medicamentos de la Isla de patogenicidad PAI (CagPAI) mediante métodos computacionales como Island Pick, SIGI-HMM e Island Path (Nammi, D., *et al.*, 2017). Sin embargo, aún no se ha reportado alguna metodología *in silico* en bacterias, direccionado a la inhibición de la función de las proteínas de la membrana externa involucradas en la adhesión de *H. pylori*, como se lleva a cabo en el presente trabajo de investigación.

1.5. Aptámeros

El término aptámero acuñado por Ellington y colaboradores, proviene de la raíz latina *aptus* “que encaja” y la raíz griega *mers* “molécula”, es decir, “molécula que encaja” (Ospina, I.D., 2020). Estos son oligonucleótidos de 20 a 100 bases de ARN o ADN monocatenario, que tienen la capacidad de unirse de manera selectiva por su forma tridimensional a células enteras, parásitos, bacterias, virus, proteínas o péptidos, iones, toxinas y moléculas pequeñas (figura 6), con gran especificidad y afinidad ya que su plegamiento le permite encajar en su blanco a través de diferentes estructuras tridimensionales como: tallos-bucles, horquillas, protuberancias, pseudonudos y G-cuádruplex, a través de su área de interfaz con la formación de contactos polares como los enlaces de hidrógeno e interacciones electrostática, interacciones hidrofóbicas, interacciones de van der Waals y apilamiento aromático (Allemailem, K., *et al.*, 2020; Ospina J. D. 2020).

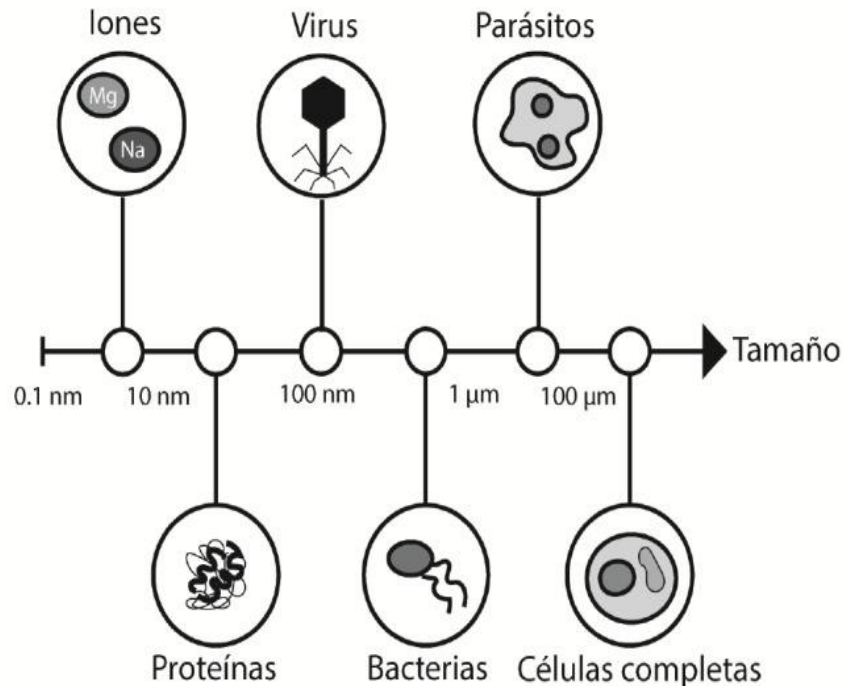


Figura 6. **Blancos reconocidos por aptámeros** tomado de Ospina J. D. 2020. Los aptámeros pueden reconocer una diversidad de moléculas diana como: iones, proteínas, virus, bacterias, parásitos y células completas a pesar de sus diferentes tamaños que van desde los 0.1 nm hasta los 100 μm.

Hoy en día, estos se han utilizado para el diagnóstico de enfermedades, como herramientas terapéuticas, transportadores de fármacos, marcación para imágenes biológicas, biosensores, en la orientación de nanopartículas y la inspección de alimentos (figura 7). No obstante, los aptámeros son excelentes alternativas no basadas en proteínas en comparación con los anticuerpos monoclonales ya que no se requiere de modelos biológicos, su tiempo de producción es breve, se pueden modificar químicamente para evitar degradación, la síntesis disminuye la variabilidad entre lotes, la secuencia de nucleótidos se almacena para posteriores producciones, tienen una especificidad y afinidad iguales o mejor que las de los anticuerpos monoclonales, se unen a una amplia variedad de blancos inmunógenos y no inmunógenos, fácil acceso a tejidos o células por su tamaño (12-15 kDa), bajo costo de producción y largo tiempo de almacenamiento a temperatura ambiente, además de que la patente de la técnica SELEX ha expirado. Sin embargo, algunas de sus desventajas incluyen una vida media corta y son proclives a la filtración renal (Ospina J. D., 2020).

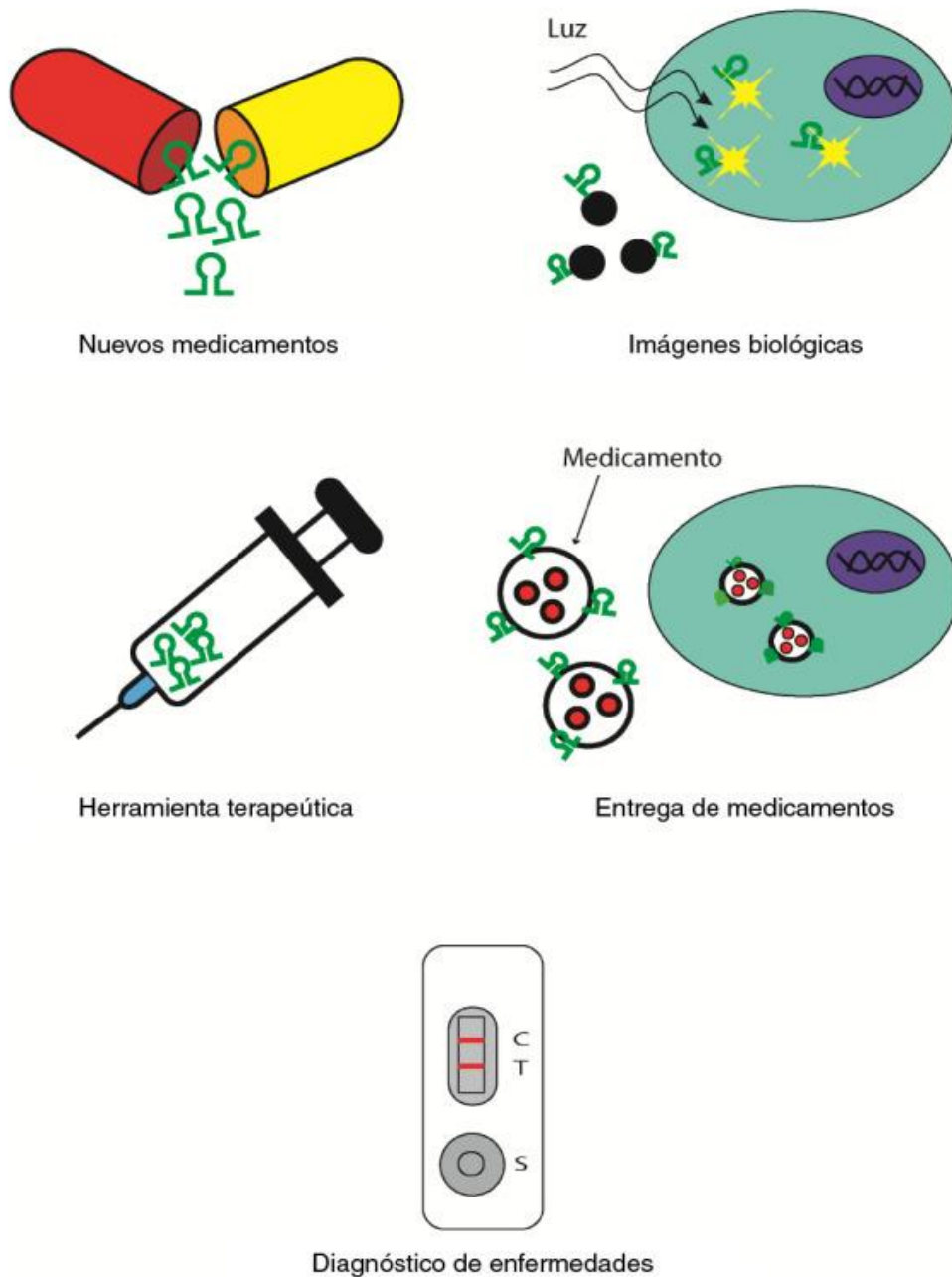


Figura 7. **Aplicación de los aptámeros**, tomado de Ospina J. D., 2020. Se ha utilizado como fármacos novedosos dirigidos a moléculas u organismos completos, en la detección los aptámeros pueden conjugarse con moléculas fluorescentes y emitir imágenes biológicas, en la entrega de medicamentos y/o herramientas terapéuticas para mejorar el efecto de otros fármacos y en el desarrollo tecnológico de dispositivos de diagnóstico de enfermedades.

Con la propuesta de los factores de virulencia de *H. pylori* como nuevas dianas terapéuticas, las OMP's involucradas en la adhesión se vuelven un blanco prometedor de los aptámeros. Actualmente, se ha reportado el uso de diferentes aptámeros en distintas

fases de pruebas clínicas tanto para el diagnóstico como tratamiento de algunas enfermedades como: el Virus del Papiloma Humano (VPH), el virus de hepatitis tipo C (VHC), el virus del zika (ZIKV), el virus del Dengue (DENV), el virus de encefalitis, el Norovirus, el síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV), el virus de la influenza, virus del ébola, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Kim, T. & Lee, S. 2021). El uso de aptámeros también está vigente en la detección de parásitos como: el *Plasmodium spp* causante de la malaria, *Entamoeba histolytica* agente causal de la amebiasis humana, *Leishmania spp* causante de la leishmaniasis y *trypanosoma spp* causante de la tripanosomiasis (Ospina J. D. 2020). En cuanto a su uso en bacterias, hay reportes de estudios para detectar *Escherichia coli* causante de calambres abdominales, vómitos, diarrea con sangre e incluso insuficiencia renal aguda en los niños, este aptámero de ADN patentado, se dirige a la célula completa del patógeno; en *Salmonela*, causante de enfermedades relacionadas con los alimentos, el aptámero de ADN también es dirigido a la célula completa para su detección *in vitro*; en *Tuberculosis micobacteriana* causante de la tuberculosis, los aptámeros se dirigen a los antígeno MPT64 antígeno y HspX funcionando como un sensor electroquímico para la detección ultrasensible del patógeno; en *Staphilococcus aureus* un organismo comensal que reside en la piel y las mucosas con un gran impacto en la salud humana y existen dos aptámeros de ADN que detectan *in vitro* al patógeno; en algunas especies de *Vibrio* que causan vibriosis, se han diseñado aptámeros para su detección mediante la técnica cell-SELEX; existe también un aptasensor colorimétrico para la detección *in vitro* de *C. Jejuni*, entre otras bacterias como: *Bifidobacterium bifidum*, *Brucella melitensis*, *Neisseria meningitidis* y *Pseudomonas aeruginosa*, etc. Todos ellos utilizados para la detección del patógeno. (Wan, Q., et al., 2021).

La selección de aptámeros *vía* SELEX (Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial) es la técnica utilizada por excelencia, consiste de manera en general, en la exposición de un coctel de aptámeros a una molécula diana. Luego se eliminan aquellos aptámeros que no se unieron y se vuelve a poner a interactuar aquellos aptámeros que se unieron al blanco enriqueciéndolos mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de manera exponencial, de tal manera que se obtenga un aptámero que se unió de manera específica y selectiva a la molécula blanco, repitiendo el ciclo de 8 a 15 veces (Kim, T. & Lee, S. 2021).

Con el propósito de disminuir el tiempo y el costo del proceso SELEX, se ha implementado el análisis *in silico*. La tubería clásica implica la predicción de estructuras 2D y 3D del aptámero, el acoplamiento molecular y dinámica molecular con su blanco y la generación de mutaciones en el sentido de evaluar la especificidad del aptámero con su blanco (figura 8), de tal manera que se permite hacer un filtro del cribado *in vitro* donde los candidatos se someten posteriormente en modelos animales y a estudios clínicos (Chen, Z., *et al.*, 2021).

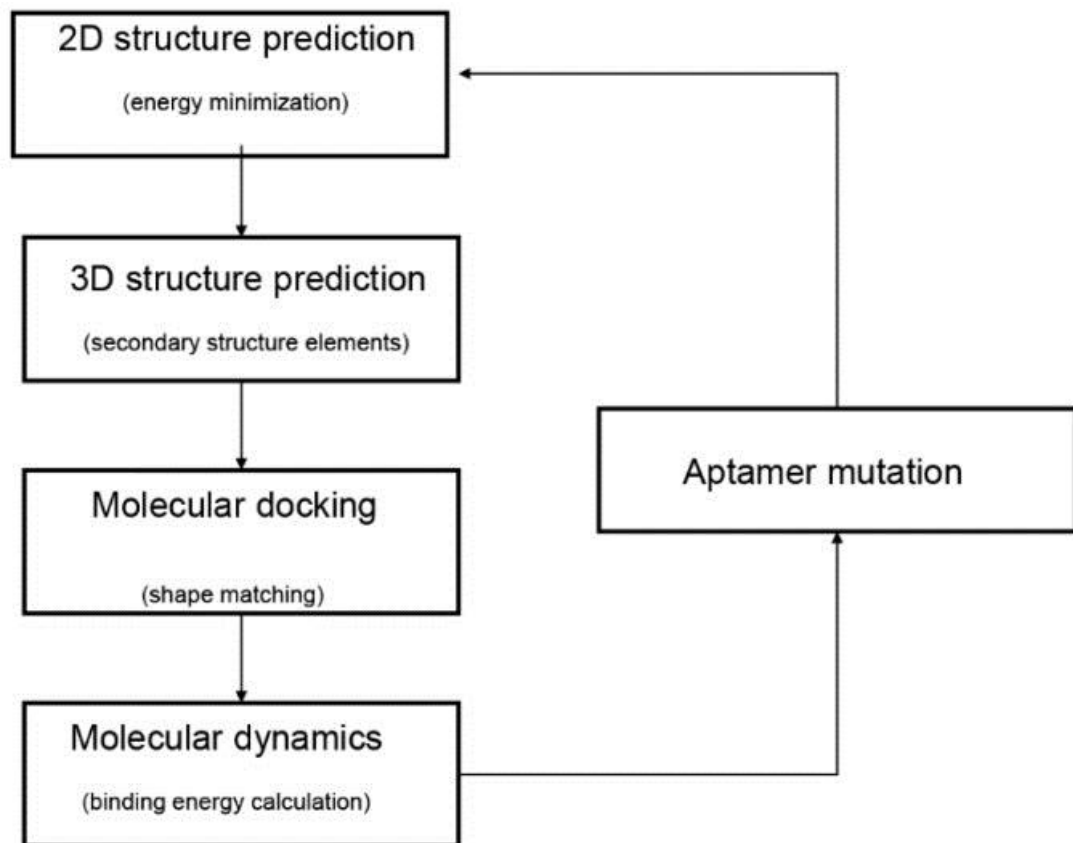


Figura 8. **Tubería clásica de la selección *in silico* de un aptámero** tomado de Chen, Z., *et al.*, 2021. Esta metodología implica el análisis y predicción de las estructuras secundarias y tridimensionales de los aptámeros para poder llevar a cabo el acoplamiento molecular con la molécula blanco y calcular la energía de unión mediante su dinámica molecular. La mutación de los aptámeros seleccionados se lleva a cabo para demostrar su especificidad, afinidad y selectividad por su blanco, probando la misma secuencia metodológica.

Las proteínas Hop y Hor tienen secuencias muy similares, tanto en su extremo amino (N) termina de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos con una identidad de secuencia (ID) del 58%, como en su extremo carboxilo (C) terminal, con un aproximado de 180 residuos (7TM) con una identidad de secuencia del 35%, y una región intermedia variable que va de 150 a 1000 residuos, correspondiente al exodominio (α -helicoidal ED) de las proteínas Hop en donde se encuentra su sitio de adhesión específico para los diferentes receptores en las células epiteliales gástricas de aquellas proteínas que tienen función de adhesina (figura 10) (Coppens, F., *et al.*, 2018).

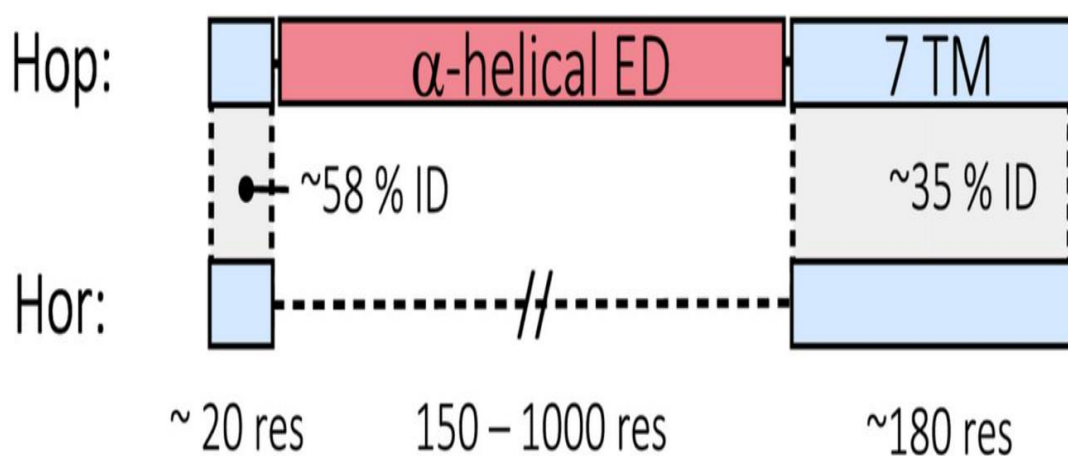


Figura 10. **Arquitectura de los dominios de las proteínas Hop y Hor de *H. pylori***, tomado y modificado de Coppens, F., *et al.*, 2018. Comparación de las regiones amino y carboxilo terminal (azul) de las proteínas de la familia 1 (Hop y Hor) de las OMPs de *H. pylori* y la región del exodominio α -helice (rosa) con su respectivo porcentaje de identidad de secuencia (ID).

En el análisis de secuencias de las OMPs de la familia Hop de *H. pylori*, las cuales tienen función de porinas, se ha reportado la conservación de la región C-terminal encargado de la formación del barril- β caracterizado por una serie de motivos de secuencia de aminoácidos anfipáticos (residuos hidrófilos e hidrófobos alternos) que dan lugar a la formación de las estructuras de lámina β antiparalelas conectadas por bucles externos, los cuales están conformados por residuos conservados de aminoácidos del extremo N-terminal, involucrados en la interacción con su receptor en la célula huésped (Alm, R. A., *et al.*, 2000).

Actualmente se sabe que en la región α -helicoidal ED del extremo N-terminal de las proteínas Hop se encuentra el sitio de interacción con la célula huésped de las

adhesinas más estudiadas: BabA, SabA y HopQ, también se ha reportado la conservación de ciertos residuos de aminoácidos de cisteína involucrados en la formación de la estructura de adhesión mango-cabeza-corona a través de la formación de enlaces disulfuro. Sin embargo, los residuos involucrados en la interacción con su receptor son específicos para cada una de ellas y solamente se han reportado para las adhesinas BabA y SabA. No obstante, también se ha reportado los bucles implicados en la interacción con su receptor en la célula huésped para las adhesinas HopQ y LabA que se abordarán más adelante en el estudio de la homología estructural reportada para las adhesinas de la familia Hop por diversas investigaciones (Coppens, F., *et al.*, 2018, Pang, S. S., *et al.*, 2014; Hage, N., *et al.*, 2015; Moonens, K., *et al.*, 2017; Javaheri, A., *et al.*, 2016; Bonsor, D. A., *et al.*, 2018 y Rossez, Y., *et al.*, 2014).

2.1.1. Homología estructural del sitio de adhesión de las adhesinas de la familia Hop

Como se ha mencionado antes, algunas proteínas de la familia *Hop* tienen función de adhesina como son: HopB (AlpB), HopC (AlpA), HopH (OipA), HopD (LabA), HopP (SabA), HopS (BabA), HopT (BabB), HopQ y HopZ (Coppens, F., *et al.*, 2018).

Curiosamente, las adhesinas que ya han sido cristalizadas, LabA, SabA, BabA y HopQ, muestran una homología estructural de mango-cabeza y mango-cabeza-corona en su sitio de adhesión a las células epiteliales gástricas, también denominado sitio de inserción, el cual está conformado por el extremo N-terminal de sus secuencias (Pang, S. S., *et al.*, 2014; Rossez, Y., *et al.*, 2014; Hage, N., *et al.*, 2015; Javaheri, A. *et al.*, 2016; Moonens, K., *et al.*, 2017; Bonsor, D., *et al.*, 2018; Paraskevopoulou, V. *et al.*, 2021).

Inicialmente, en el 2014 Pang, S. y colaboradores caracterizaron la estructura tridimensional del dominio de adhesión extracelular N-terminal de la adhesina SabA (HopP) (residuos 1–460), esta estructura cristalina se resolvió a 2.2 Å y mostró una molécula predominantemente α -helicoidal que comprende una región de "mango" (azul), la cual forma un eje rígido que comprende las hélices N- y C-terminales y una de "cabeza" (magenta/amarillo) que comprende un haz de 4 α -hélices yuxtapuestas en ángulo recto con respecto al dominio del mango (figura 11) (Pang, S. S., *et al.*, 2014).

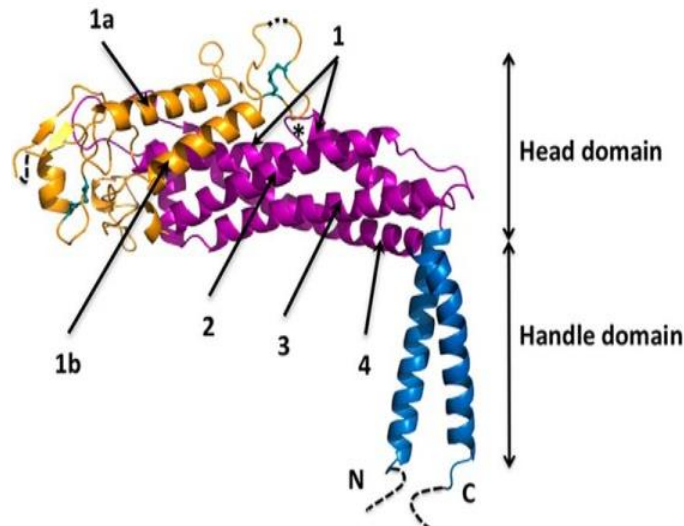


Figura 11. **Estructura cristalina del dominio de adhesión N-terminal de la adhesina SabA (HopP) de *H. pylori***, tomado de Pang, S. S., *et al.*, 2014. Se muestra el dominio de cabeza conformado por las hélices en color amarillo y magenta, y el dominio de mango en color azul.

El análisis de la estructura cristalina de la región de cabeza de la adhesina SabA, mostró un parche electrostático cargado positivamente que funciona como un sitio de unión a antígenos Sialil-Lewis^x de las células epiteliales gástricas y que contiene según el alineamiento múltiple de sus secuencias, residuos de aminoácidos conservados que le proporcionan la selectividad de unión por su ligando: S80, Q162, Q159, K152, Y148, G357, P81 y W97 (figura 12) (Pang, S. S., *et al.*, 2014).

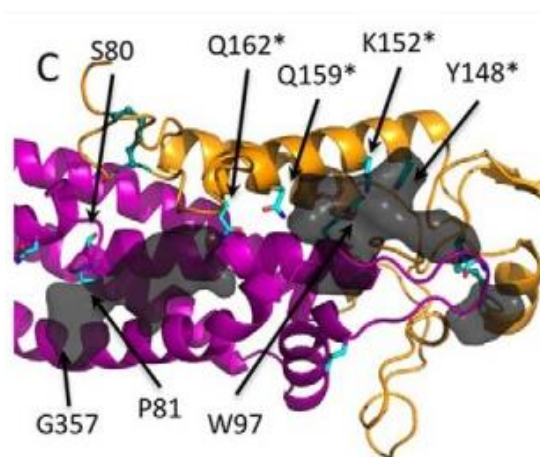


Figura 12. **Estructura del dominio de cabeza de SabA**, tomado de Pang, S. S., *et al.*, 2014. Los residuos de aminoácidos conservados en el dominio de cabeza de la adhesina están señalados con flechas negras, y su parche cargado positivamente donde se une con su receptor en la célula huésped se encuentra en color gris.

Posteriormente, en el año 2015 Hage, N. y colaboradores describieron las bases estructurales de la unión del antígeno de Lewis^b fucosilados por la adhesina BabB, este sitio de adhesión contiene dos dominios, el de unión a las células epiteliales gástricas y la mucina en su extremo N-terminal y el de inserción a la membrana en su extremo C-terminal, como se muestra en la estructura cristalina del dominio extracelular N-terminal de BabA a una resolución de 2.0 Å, donde se observan dos regiones predominantemente α -helicoidales: región del mango y región de la cabeza, con un tercer motivo de 4 hojas- β denominado corona que se ubica en la parte superior de la región de la cabeza conformada por un haz de bobinas enrolladas antiparalelas de cuatro hélices. (figura 13, panel A) (Hage, N., *et al.*, 2015).

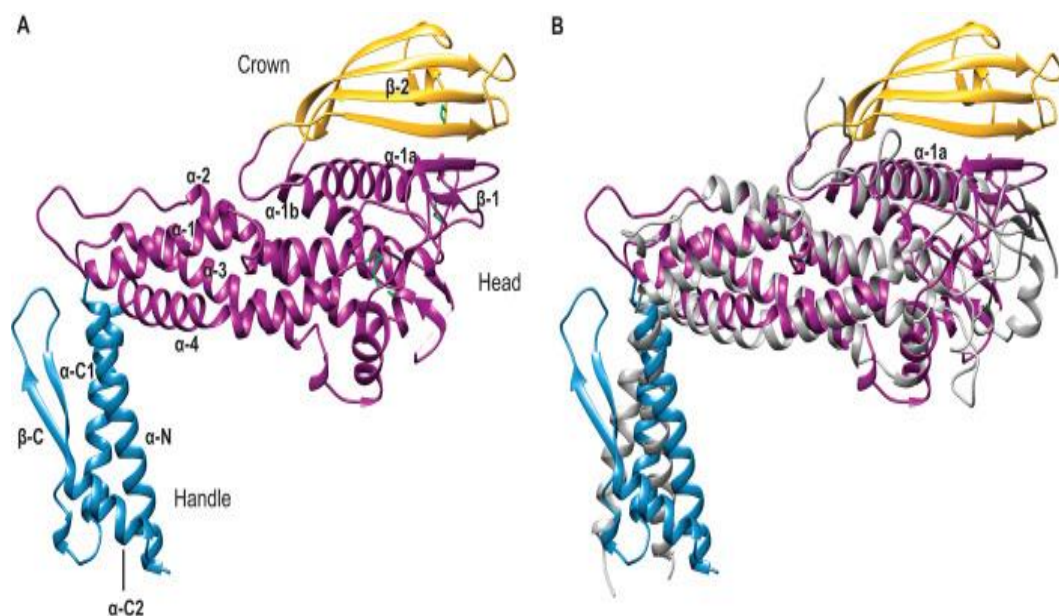


Figura 13. **Arquitectura del dominio extracelular N-terminal de BabA**, tomado de Hage, N., *et al.*, 2015. A) Estructura de BabA, B) Superposición de las estructuras BabA y SabA. Región de mango (azul), cabeza (magenta) y corona (amarillo).

Los residuos de aminoácidos involucrados en la adhesión a antígenos fucosilados de Lewis^b se ubican en la región de corona, pertenecen al extremo N-terminal y están conservados: C189, G191, N194, N206, D233, S244 y T246. En contraste con la estructura cristalina de la adhesina SabA, los residuos de interacción con su ligando se encontraban en la región de cabeza y observaron que esta adhesina carecía de la estructura de corona, lo que explica la especificidad de BabA y SabA. Este equipo también reportó que aunque

la ID entre SabA y Bab era de 26% su estructura estaba estrechamente relacionada (figura 13, Panel B) (Hage, N., *et al.*, 2015; Moonens, K., *et al.*, 2017).

En el 2016, Javaheri y col. describieron la interacción de la adhesina HopQ con moléculas del antígeno carcinoembrionario humano (CEACAM) como son: CEACAM1 anclados a la transmembrana de células peiteliales, CEACAM5, CEACAM6 y CEACAM7 unidos a glicosilfosfatidilinositol localizados en la membrana apical. La estructura de rayos X de HopQ, al igual que BabA y SabA, contiene un exodominio que adopta una topología de haz de 4 α -hélices (cabeza) y una región apical de láminas- β similar a la estructura de corona de BabA (Javaheri, A., *et al.*, 2016). Posteriormente, en el 2018, Bonsor, D. y colaboradores, cristalizaron y determinaron del complejo formado por el dominio extracelular de inserción de HopQ y de CEACAM1 humano a una resolución de 2.7 Å donde observaron a cuatro bucles en la adhesina HopQ respnsables de los contactos intermoleculares con CEACAM1: el bucle α 3- β 1 (residuos 102–111); el bucle β 2- α 4 (residuos 134–161); el bucle α 5- α 6 (residuos 240–244); y el bucle α 7- α 8 (residuos 363–385) (figura 14, panel A). Sin embargo, el bucle β 2- α 4 contribuye aproximadamente con el 60 por ciento del área de interfaz en la formación del complejo donde la mayoría de los enlaces de hidrógeno formados entre CEACAM1 y el bucle HopQ β 2- α 4 provienen de los átomos de la cadena principal (figura 14, panel B) (Bonsor, D., *et al.*, 2018).

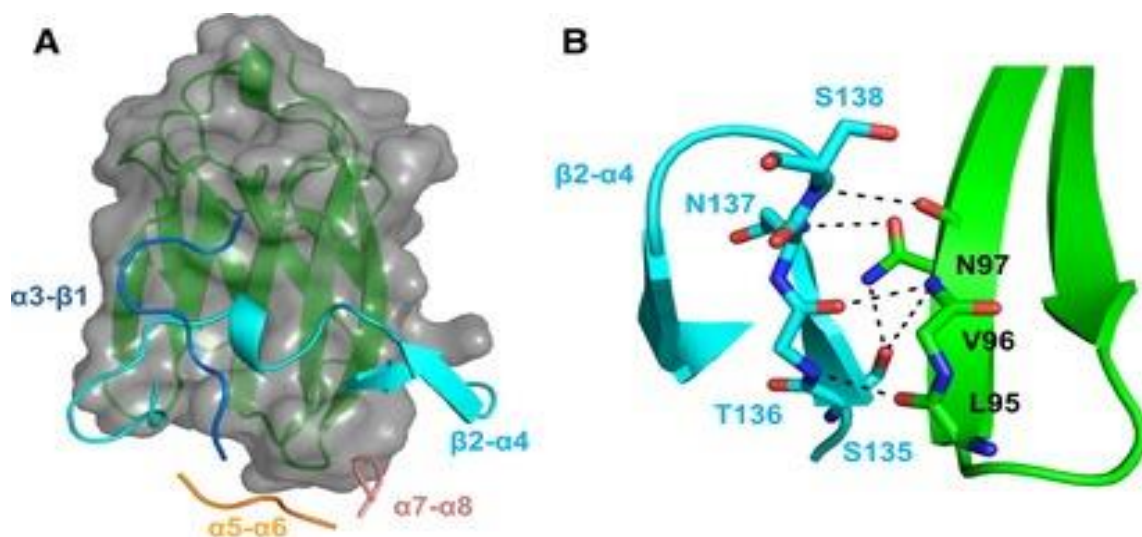


Figura 14. **Estructura de los bucles de interacción de la adhesina HopQ-CEACAM1**, tomado de Bonsor, D., *et al.*, 2018. A). Bucle involucrados en la interacción de HopQ con moléculas CEACAM1. B). Residuos 135–138 del bucle β 2- α 4 (cian) que forman una red de enlaces de hidrógeno (líneas negras) con los residuos 95–97 de CEACAM1 (verde).

La adhesina HopD, denominada también adhesina de unión a lacdiNAc (LabA), se une específicamente al motivo lacdiNAc ((GalNAc β 1-4GlcNAc)) ubicado en las mucinas MUC5AC de la mucosa gástrica (Rossez, Y., *et al.*, 2014). LabA muestra una estructura de mango-cabeza-corona (residuos 21-496) muy similar a las adhesinas anteriormente descritas. Contiene dos regiones principales conformadas principalmente por α -hélices denominada “mango-cabeza” y una región más pequeña de dos hebras- β , denominada “corona”, como se describió para SabA y BabB, una región N-terminal (α -N) y una C-terminal (α -C1) de longitudes similares formaron un haz de bobinas enrolladas antiparalelas de dos hélices. La región de la “cabeza” está conformada por un haz de 4 + 3 α -hélices y la región de “corona” está contenida entre las hélices α -3 y α -4 y está conformada por una hoja- β antiparalela de dos hebras (β -3 y β -4) (figura 15) (Paraskevopoulou, V. *et al.*, 2021).

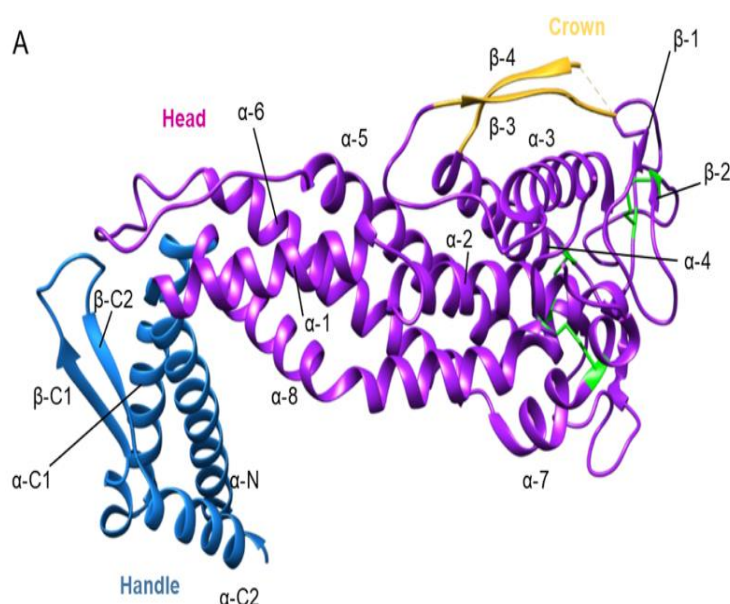


Figura 15. **Arquitectura del dominio extracelular de la adhesina LabA (HopD)**, tomado de Paraskevopoulou, V. *et al.*, 2021. Estructura de “mango” (azul), “cabeza” (morado) y “corona” (amarillo). Se muestra las hélices alfa (α 1-8), láminas beta (β -4) y la estructura de los extremos amino (N) y carboxilo (C) terminal.

Al superponer la estructura de mango-cabeza-corona de la adhesina LabA, con las adhesinas de estructura conocida: BabA, SabA y HopQ, con quienes compartía una ID en sus exodominios de 49%, 20% y 37%, respectivamente; se observa que las regiones de “mango y cabeza”, es decir, el haz de hélices α -4 + α -3, son similares entre LabA y BabA.

No obstante, la estructura de “corona” relacionada con la especificidad de unión a su ligando de cada adhesina, está presente en LabA, HopQ y BabB (figura 16). Además, la alineación múltiple de secuencias de HopD de 84 cepas diferentes denotan la conservación de residuos de aminoácidos tanto en el extremo N-terminal como en el extremo C-terminal (Paraskevopoulou, V. *et al.*, 2021).

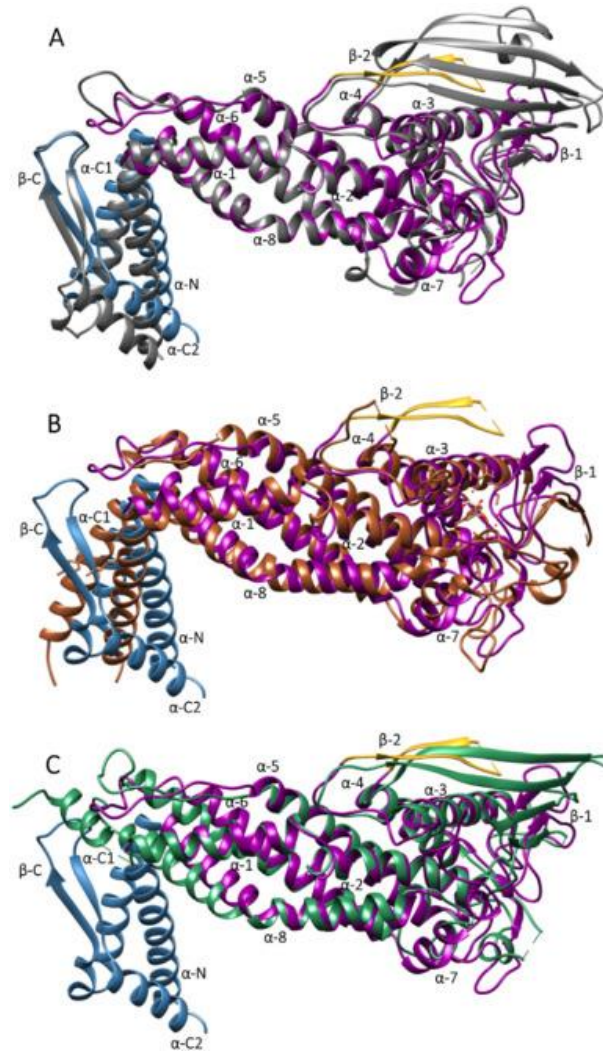


Figura 16. **Superposición de los dominios de adhesión de las adhesinas de la familia Hop**, tomado de Paraskevopoulou, V., *et al.*, 2020. A) Superposición del dominio de adhesión de SabA (gris) con el dominio de adhesión de LabA (azul-magenta-amarillo), B) Superposición de BabB (anaranjado) con el dominio de adhesión de LabA (azul-magenta-amarillo) y C) Superposición del dominio de adhesión de HopQ (verde) con LabA (azul-magenta-amarillo).

Hasta este momento, las adhesinas caracterizadas estructuralmente muestran un patrón estructural altamente conservado de “mango-cabeza” y en menor medida la estructura de “corona” donde se ubica el sitio de inserción, lo que sugiere que esta

estructura puede cumplir una función por descubrir en la adhesión bacteriana (Paraskevopoulou, V. *et al.*, 2021).

En 2018, Coppens y col mostraron que los dominios extracelulares de las estructuras de rayos X de los ectodominios de BabA, SabA y HopQ tienen en común un dominio de cabeza conformado por un haz de 3+4 α -hélices conectado a la región de “mango”. No obstante, en la alineación de secuencias múltiple de las adhesinas *Hop*, dada su topología mediante el mapeo de los elementos de estructura secundaria, este dominio en común se conserva dentro de las adhesinas *Hop* conocidas (Coppens, F., *et al.*, 2018). Así mismo, las propiedades adhesivas de estas adhesinas, se caracterizan por segmentos de inserción en el dominio de la cabeza exclusivos de las adhesinas individuales (Moonens, K., *et al.*, 2016 ; Javaheri, A., *et al.*, 2016).

2.1.2. Disminución de la colonización de *H. pylori* mediada por el bloqueo de las adhesinas de la familia *Hop*.

En la búsqueda de la erradicación y tratamiento de *H. pylori*, se han descubierto compuestos naturales antiadhesivos que no solo pueden curar las infecciones agudas causadas por *H. pylori*, sino también son útiles en la prevención de la recolonización bacteriana del estómago. Estos tienen como principio la interacción con las OMP's bacterianas: la 3'-sialyllactosa, *N*-fenilpropenoil-L-aminoácido amidas, péptidos, polifenoles, polisacáridos y los frutos inmaduros de *Abelmoschus esculentus* (Messing, J., *et al.*, 2014)

Si bien, existen otros los estudios que reportan la disminución significativa de la adhesión bacteriana a las células del epitelio gástrico al afectar la expresión de las adhesinas de la familia *Hop*: AlpA, AlpB, SabA, BabA, BabB, OipA, LabA, HopQ y HopZ de *H. pylori*. Existen pocos estudios que demuestran que al bloquear estas adhesinas con su ligando en forma “libre” antes de exponerlas al epitelio gástrico, la adhesión y por lo tanto la colonización bacteriana se ve disminuida significativamente (Baj, J., *et al.*, 2020; Matsuo, Y., *et al.*, 2017).

En el estudio realizado por Talarico y col, se analizó la adherencia bacteriana de la cepa ST164, la cual contenía el gen funcional de la adhesina *saba*, en contraste con la cepa ST168 la cual se mutó para el gen *saba* no funcional. Se puede observar que la adherencia bacteriana de la cepa ST168 al epitelio gástrico se ve disminuida

significativamente al 86% al no expresar la adhesina SabA funcional. Contrastaron este resultado al poner a interaccionar antígeno de Sialil-Lewisx libre, receptor de SabA en el epitelio gástrico, en la cepa ST164 (gen *saba* funcional) previo a la interacción con las biopsias del epitelio gástrico, es decir, bloquearon el sitio de adhesión de SabA, y observaron que la adhesión al las células epiteliales gástricas disminuía significativamente en un 89% con respecto a la cepa ST164 sin el bloqueo con el antígeno y con la cepa ST168 (gen *saba* no funcional). Un protocolo novedoso que posiciona a las OMP's en los estudios de la inhibición de la adhesión bacteriana (figura 17) (Talarico, S., et al., 2012).

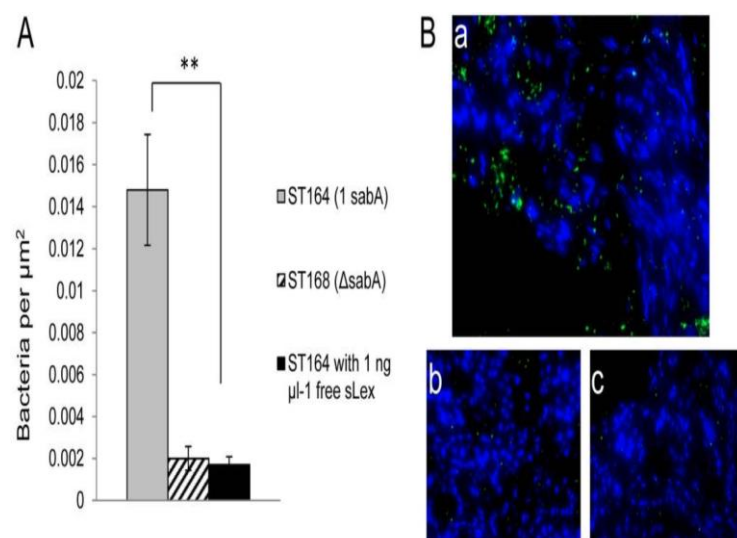


Figura 17. **Adherencia de *H. pylori* al tejido gástrico**, tomado de Talarico y col 2012. **Panel A.** Conteo de bacterias adheridas por μm^2 . **Panel B.** Micrografías de adhesión bacteriana de: a) cepa ST164, b) cepa ST168 y c) cepa ST164 previamente expuesta a su antígeno en forma libre.

En el mismo contexto, la adhesión de *H. pylori* también ha sido estudiada mediante la eliminación de la disponibilidad del receptor para la adhesina LabA. En este estudio, las secciones de mucosa gástrica humana fueron pretratadas con anticuerpos monoclonales contra el receptor de LabA con LacdiNAc disponible comercialmente (LDN) y la mucina gástrica O-glicano que lleva LDN (Hum LDN), además del antígeno de Lewis^b. De la misma manera que los estudios con otras adhesinas descritas, las distintas cepas bacterianas mostraron una colonización del epitelio gástrico disminuida

significativamente al no estar disponible el receptor de LabA (figura 18) (Rossez, Y., *et al*, 29014).

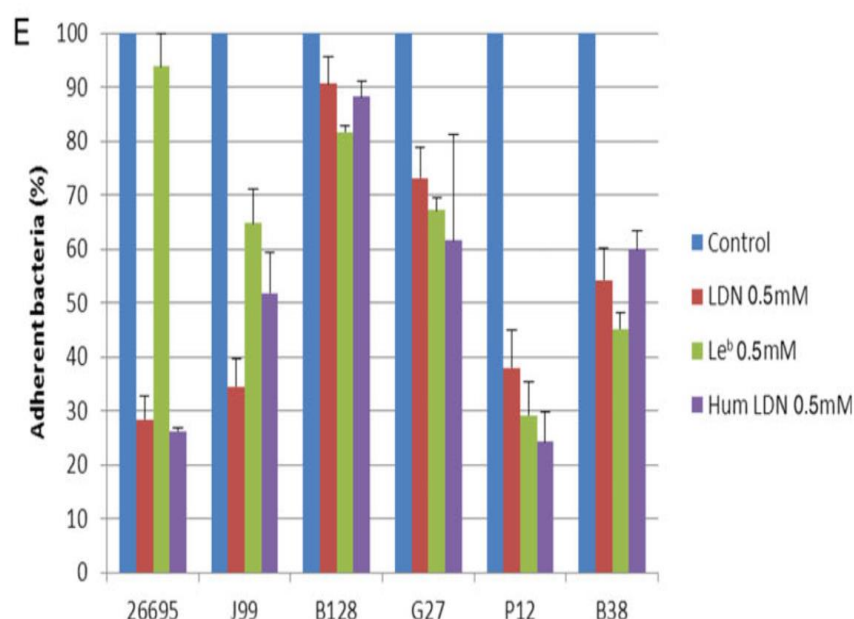


Figura 18. **Adherencia de distintas cepas de *H. pylori* a la mucosa gástrica pretratada con anticuerpos monoclonales para los receptores de LabA**, tomado de Rossez, Y., *et al*, 29014. Adherencia bacteriana de las cepas 26695, J99, B128, G27, P12 y B38 (azul) en contraste con la adherencia de las mismas cepas pretratadas con anticuerpos monoclonales para LabA, LDN (rojo), Le^b (verde) y Hum LDN (morado).

Por esta razón y con un número creciente de cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos, los estudios de proteómica no se han quedado atrás y han propuesto además como adhesinas candidatas para vacunas a otros miembros de la familia *Hop* como son: BabA, SabA y OipA ya que están relacionadas con la resistencia bacteriana a los antibióticos (Xu, C., *et al.*, 2020).

2.2. El uso de los aptámeros en la detección y control de enfermedades causadas por bacterias.

En las bacterias, el uso de los aptámeros puede clasificarse en: aquellos que se dirigen a la célula entera con moléculas blanco que pueden ser desconocidas o conocidas, o bien, aquellos que se dirigen a factores de virulencia o a antígenos y proteínas de la superficie bacteriana (tabla 2) (Pan, Q., *et al.*, 2018).

Aptámero	Tipo	Organismo	Blanco molecular
T9	DNA	<i>M. Tb.</i>	ManLAM ¹
CE24 y CE15	DNA	<i>M. Tb.</i>	Proteína CE ²
CSIR	DNA	<i>M. Tb.</i>	Proteína CE ²
MPT64-A1	DNA	<i>M. Tb.</i>	MPT64 ³
G43 y G78	RNA	<i>M. Tb.</i>	Proteína EsxG ²
MA1	DNA	<i>M. Tb.</i>	Toda la bacteria
Aptámero 1	DNA	<i>M. Tb.</i>	Toda la bacteria
Aptámero 33 Y 45	DNA	<i>S. typhimurium</i>	OMP's ²
I-2	RNA	<i>S. typhimurium</i>	OmpC ¹
C4	DNA	<i>S. typhimurium</i>	Toda la bacteria
ST2P	DNA	<i>S. typhimurium</i>	Toda la bacteria
SAL26	DNA	<i>S. typhimurium</i>	Toda la bacteria
Apt22	DNA	<i>Salmonella</i>	Toda la bacteria
S25	RNA	<i>S. enteritidis</i>	Varias cepas
CRN-1 Y CRN-2	DNA	<i>S. enteritidis</i>	Toda la bacteria
APT ^{SEB1}	DNA	<i>S. aureus</i>	SEB ²
C10	DNA	<i>S. aureus</i>	SEC1 ²
R12.06	DNA	<i>S. aureus</i>	Toxina alfa ²
Antibact 1 y 2	DNA	<i>S. aureus</i>	Peptidoglicano ¹
PA#2/8	DNA	<i>S. aureus</i>	Proteína A ²
SA17, 20, 23, 31, 34 y 43	DNA	<i>S. aureus</i>	Toda la bacteria
A8	DNA	<i>L. monocytogenes</i>	Internalina A ^{2,3}
LLO-3	DNA	<i>L. monocytogenes</i>	Listeriolisina O ²
Lbi-17	DNA	<i>L. monocytogenes</i>	Toda la bacteria
LMCA 2 y 26	DNA	<i>L. monocytogenes</i>	Toda la bacteria
E5, 11,12,16,17,18 y 19	DNA	<i>E. coli</i>	LPS ¹
AM-6	DNA	<i>E. coli</i>	Toda la bacteria
Apt B12	DNA	<i>E. coli</i>	Toda la bacteria
E1,2,10 y 12	DNA	<i>E. coli</i>	Toda la bacteria
Ec3 (31)	RNA	<i>E. coli</i>	Toda la bacteria
8.28A	DNA	<i>E. coli</i>	Toda la bacteria
Aptámero Hp4	DNA	<i>H. pylori</i>	Antígeno recombinante de superficie ²

Tabla 2. **Aptámeros dirigidos a bacterias**, tomado y modificado de Pan, Q., *et al.*, 2018, Wan, Q., *et al.*, 2021; Yan, W., *et al.*, 2019. Los aptámeros de ARN o ADN dirigidos a distintas bacterias pueden acoplarse a proteínas de la membrana externa¹, factores de virulencia², proteínas secretadas³ y toda la bacteria.

Los estudios con aptámeros dirigidos a bacterias están en constante desarrollo como prometedoras alternativas ya sea para agentes terapéuticos y/o diagnósticos. El hecho de que estos puedan reconocer una amplia variedad de blancos, hace referencia a

que no existe límite en sus usos más que la imaginación del humano, mencionó Larry Gold en una edición especial publicada por el *Journal of Molecular Evolution* en el 2015 (Ospina J. D., 2020).

2.2.1. Inhibición de la adhesión y formación de biopelículas mediante un aptámero.

Recientemente, el aptámero 3 dirigido a los flagelos de *Salmonella choleraesuis*, mostró la capacidad de unirse a los dominios funcionales de la flagelina induciendo la supresión del tropismo celular, la adhesión inicial del patógeno y por lo tanto, la formación de biopelículas (figura 19) (Ning, Y., et al., 2020).

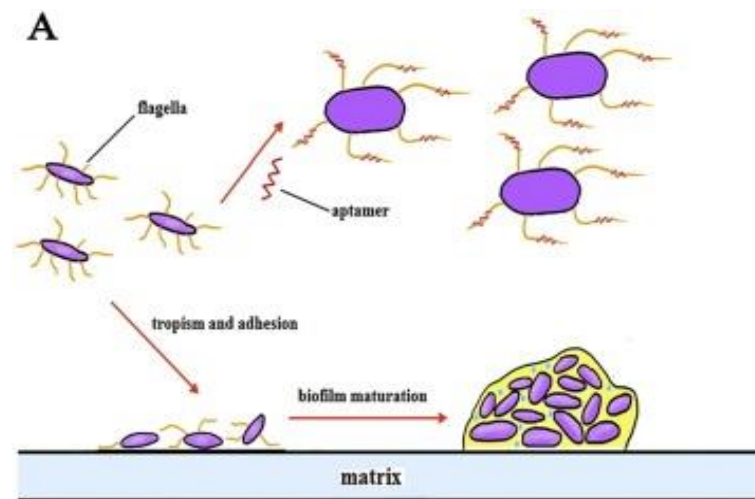


Figura 19. **Esquema de acción del aptámero 3 dirigido a los dominios funcionales de la flagelina de *Salmonella choleraesuis***, tomado de Ning, Y., et al., 2020. El aptámero se une a los flagelos de *Salmonella choleraesuis* afectando la adhesión de la bacteria y la formación de la biopelícula.

En *Pseudomonas aeruginosa* se ha creado un aptámero capaz de unirse a la bacteria y al biofilm con gran especificidad. Así mismo, los aptámeros han mostrado función de inhibición sobre *Bacillus anthracis* al dirigirse a su factor de virulencia: factor letal (LF) (Trunzo, N. & Hong, K., 2020).

Además, se ha demostrado que el aptámero de ARN Ca-apt-1 seleccionado mediante la técnica SELEX, se une con alta afinidad y especificidad a *Candida albicans*

y es capaz de afectar su viabilidad y la formación de biopelículas (figura 20) (Bachtiar, B. M. *et al.*, 2019).

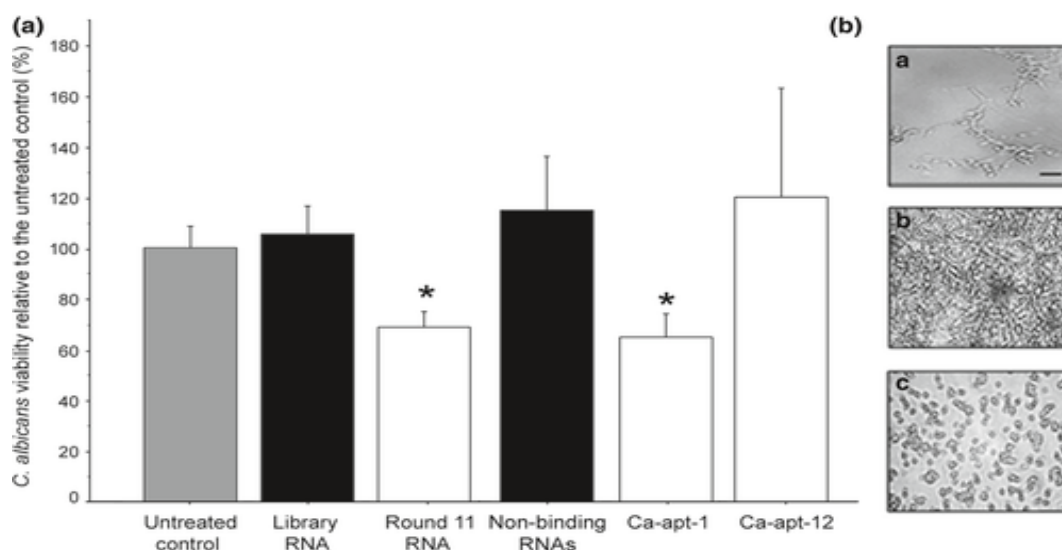


Figura 20. **Efecto de los aptámeros en *Cándida albicans*.** a) Viabilidad de *Candida albicans*. b) Microscopía de luz de *Cándida albicans*, a. control sin tratamiento, b. células tratadas con la biblioteca de aptámeros y c. células tratadas con el aptámero Ca-apt-1.

2.3. Estudios *in silico* con aptámeros

2.3.1. Asignación de aptámeros asistido por computadora

La asignación de fármacos asistido por computadora permite hacer uso de las herramientas computacionales para interpretar y guiar experimentos y así acelerar el diseño de fármacos dirigido a microorganismos, como son las bacterias. En principio, el diseño de fármacos basado en estructuras (SBDD), analizan información estructural de los objetivos terapéuticos, como son las adhesinas de la familia *Hop* de *H. pylori* para identificar sitios clave que son importantes para sus funciones biológicas y a partir de dicha información se puede diseñar un aptámero capaz de interrumpir la adhesión bacteriana (Yu, W., & MacKerell, A. D., 2017).

La tubería clásica de selección *in silico* de los aptámeros contempla el estudio estructural de los aptámeros que al complementarse con los principios de la asignación de fármacos basado en estructuras asistido por computadora, se complementa analizando la estructura 2D y 3D de las moléculas diana y realiza una evaluación bioinformática sobre la interacción del aptámero y su blanco (figura 21) (Zheng, W., *et al.*, 2019).

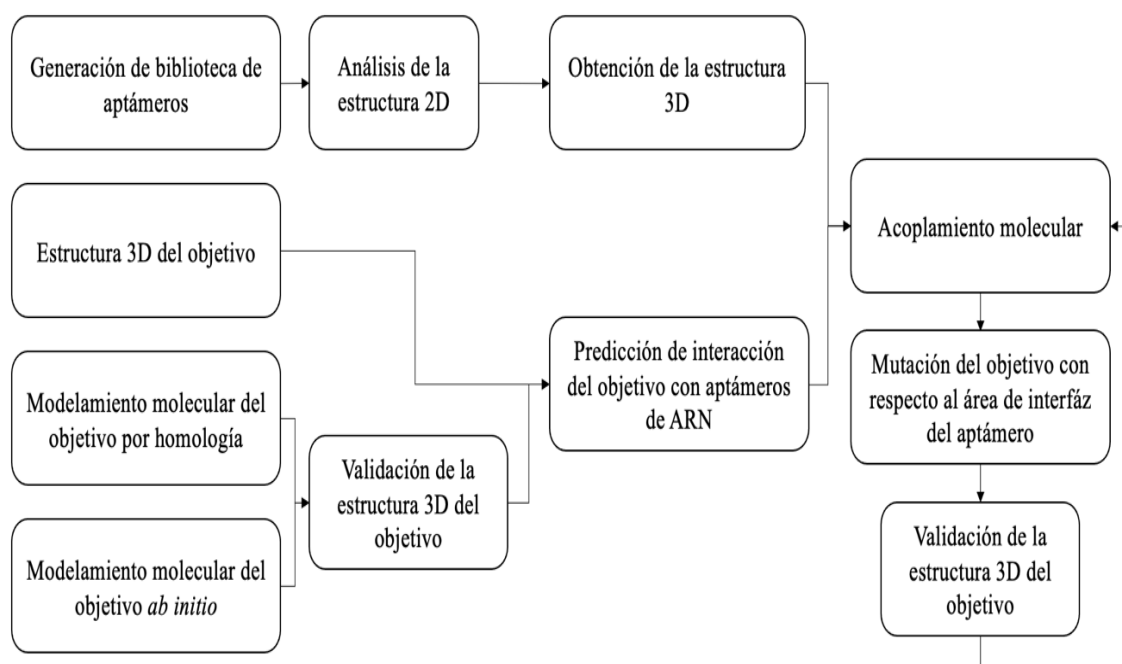


Figura 21. **Asignación de aptámeros asistido por computadora**, tomado y modificado de Chen, Z., *et al.*, 2021, Yu, W., & MacKerell, A. D., 2017 y Yan, Y., *et al.*, 2020. El proceso computacional implica el desarrollo de la biblioteca de aptámeros y su análisis estructural. Así mismo la generación de modelados moleculares, su validación, análisis estructural y la probabilidad de interacción aptámero-molécula diana. En la verificación, se realiza la mutación del objetivo con su respectiva validación para repetir el proceso y evaluar la especificidad, afinidad y selectividad del aptámero por métodos computacionales.

Hoy en día existe una variedad de herramientas que nos permiten realizar un análisis estructural tanto de los aptámeros como de las proteínas blanco. Un primer paso es investigar si se cuenta con la estructura 3D de la proteína diana en la base de datos de proteínas (por su siglas en inglés PDB), de lo contrario se puede optar por un modelamiento molecular bajo la metodología de modelado por homología o *Ab initio*, según sea el caso, algunos servidores validados para modelar proteínas por mencionar algunos son SWISS-MODEL, MODELLER, Rosetta, SCWRL, ProModII y I-TASSER (Studer, G., *et al.*, 2021; Zheng, W., *et al.*, 2019). Este último servidor, fue utilizado para nuestros modelamiento ya que proporciona información sobre las plantillas que utiliza para su modelamiento y es evaluado mediante el factor de confianza (factor C) que debe estar dentro de un rango de puntuación de -5 a 2 y de $\text{RMSD} \leq 5\text{\AA}$, para indicar que el modelado de una proteína es confiable (Zheng, W., *et al.*, 2019; Aprahamian, M. L., & Lindert, S. 2019).

Además, estudios recientes que han requerido del modelamiento molecular, han utilizado al servidor gratuito I-TASSER con éxito, para obtener estructuras de alta calidad por el método de homología para el factor de transcripción STAT3 (Mishra, S., *et al.*, 2021), para la proteína de membrana (M) del SARS-CoV-2 por el método *ab initio* (Mahtarin, R., *et al.*, 2021) y para proteínas de la membrana externa de *E. coli* como NfrA (receptor del bacteriófago N4) y FlgH (proteína del anillo L flagelar) modeladas por el método *ab initio*, y las proteínas BamA (subunidad central de BAM que contiene el barril β) y LptD (Proteína de ensamblaje LPS) modeladas *Ab initio* (Horne, J.E., *et al.*, 2020).

Existe también una amplia variedad de servidores que indican la calidad estructural de los modelados moleculares, validando la información estereoquímica tales como: QMEAN, RAMPAGE y la plataforma SAVES que incluye los servidores Verify 3D, ERRAT y PROCHECK (Hasan, R., *et al.*, 2021). El servidor ERRAT proporciona un factor de calidad que se utiliza para analizar interacciones átomo-átomo no enlazadas en contraste con estructuras de cristalografía de alta resolución, este factor debe ser ≥ 60 . El servidor Verify 3D nos proporciona el porcentaje de residuos de aminoácidos con una puntuación ≥ 0.2 , es decir, el porcentaje de dichos residuos debe ser ≥ 60 . Además el servidor de PROCHECK proporciona el gráfico de Ramachandran para visualizar los ángulos diédricos psi (ψ) y phi (ϕ) energéticamente permitidos y no permitidos de un aminoácido, donde el porcentaje de residuos de aminoácidos debe ser mayor al 90%, además de indicar el factor G (factor de geometría global) que proporciona información sobre cuán “normal-inusual” es una propiedad esteroquímica con una puntuación de probabilidades logarítmicas que debe estar en el rango de 0 a -0.50 (Devi, A. & Chaitanya, N., 2021, Lavadié-González, C. *et al.*, 2021). Cabe mencionar que la plataforma gratuita SAVES fue utilizado recientemente para evaluar la calidad estereoquímica de metaloproteasas de la familia M4 de distintas especies bacterianas mediante los servidores ERRAT, Verify 3D y PROCHECK (Hasan, R., *et al.*, 2021), y en la validación del modelado molecular de la proteína S del SARS-CoV-2 (Devi, A. & Chaitanya, N., 2021).

Una vez validadas las estructuras modeladas, se puede predecir la probabilidad de interacción de la proteína blanco con una molécula de ARN, es decir, con un aptámero, mediante servidores como: RNA Bricks2, NPInter, snoDB, PNRD, TarBase, PRD, RNAInter, RIscooper, IntaRNA, PRIdictor, DeepBind, POSTAR, doRiNA, PRIDB, RPIseq y Patch Finder (Baltoumas, F. A., *et al.*, 2021; Zagrovic, B., *et al.*, 2018; Di Salvo,

T. G., 2015). En nuestra investigación utilizamos dos servidores RPIseq y Patch Finder, para poder obtener información sobre la predicción de interacción a partir de las secuencias y por su estructura 3D, respectivamente. El servidor Patch Finder permite visualizar las propiedades electrostáticas de las proteínas, primero se calcula el potencial electrostático de la proteína en una cuadrícula 3D, luego se definen los puntos que caen más cerca de la superficie de la proteína, se lleva a cabo la extracción de todos los parches, se elige el parche positivo más grande y se asignan los residuos de aminoácidos relacionados con el parche. Generalmente, estos parches están relacionados con la región funcional de las proteínas (Shazman, S., *et al.*, 2007). Otro servidor que puede predecir la interacción proteína-ARN es RPIseq mediante la puntuación de sus clasificadores que analizan redes de interacciones ARN-proteína de datos experimentales, donde los clasificadores SVM (support vector machine) y RF (random forest) apuntan hacia una interacción positiva cuando sus puntuaciones son ≥ 0.8 y ≥ 0.5 , respectivamente (Muppirala, U. K., *et al.*, 2011).

En el análisis de estructuras 2D y 3D de aptámeros según la tubería clásica *in silico*, implica una evaluación de estabilidad termodinámica 2D que puede ser proporcionada por los servidores: ProbKnot, ThreshKnot, DotKnot, IPknot, CONTRAfold y Vienna RNAfold, entre otros (Zhang, H., *et al.*, 2020). RNAfold predice la estructura 2D a partir de la secuencia del aptámero mediante la partición lineal de energía de los apareamientos canónicos watson-crick y no canónicos, este servidor proporciona una puntuación de energía termodinámica del ensamblaje no mayor a -10Kcal/mol, la frecuencia de estructura de energía libre (MFE) $> 40\%$ y la diversidad del conjunto menor a 1, además de proporcionar el diagrama de montaña de cada aptámero que representa la estructura MFE, la estructura del centroide y las probabilidades de los pares, el diagrama de entropía, que brinda información de confiabilidad en términos de probabilidad de entropía posicional y su estructura secundaria en un código de colores que muestra en color anaranjado-rojo una probabilidad mayor de interacción entre las bases del aptámero (Gruber, A. *et al.*, 2008; Zhang, H., *et al.*, 2020).

Hoy en día es posible obtener la estructura de los aptámeros a partir de distintos servidores como: Rosetta, Rmdetect, JAR3D, RAGTOP, iFoldRNA y RNAComposer, este último servidor utiliza la secuencia del aptámero y su notación de puntos y paréntesis que proporciona RNAfold. La obtención de la estructura tridimensional (3D) de los aptámeros implica la división de la estructura 2D en tallos, bucles y hebras simples en el

servidor, luego los elementos de estructura 3D correspondientes a estas fragmentaciones se buscan en la base de datos RNA FRABASE, aquellas estructuras cuya desviación cuadrática media de la raíz atómica (RMSD) sea inferior a 1.0 Å son seleccionadas y fusionadas a una estructura 3D inicial. Finalmente, se refina la estructura obtenida mediante minimización de energía en el espacio del ángulo de torsión y el espacio de coordenadas del átomo cartesiano para obtener la estructura 3D final (Gong, S. *et al.*, 2017). Además, este servidor, se utilizó recientemente para modelar un aptámero conjugado con un ribointerruptor que funciona como biosensor sensible a concentraciones ambientales de hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), un químico que contamina el suelo y agua (Mayo, M. L., *et al.*, 2020).

Una vez que se ha obtenido las estructuras tridimensionales de la proteína objetivo y el aptámero, y han sido validadas, el siguiente paso de la asignación de un aptámero por métodos computacionales, implica el acoplamiento molecular, una herramienta que predice los modos y sitios de unión de la proteína con el ligando, es decir, el aptámero. Existe una variedad de softwares para el acoplamiento molecular, tales como: Vina, AutoDock4, Molegro/MolDock, Smina, Plants, ICM, GOLD, Dock6, GasDock, DockThor (Torres, P., *et al.*, 2019), y servidores como: ClusPro, HADDOCK, servidor RosettaDock, GRAMM-X, 3D-Garden, servidor HEX, SwarmDock, servidor ZDOCK, PatchDock, ATTRACT, pyDockSAXS, InterEvDock, NPDock y HDock (Yan, Y., *et al.*, 2017).

En nuestro estudio, utilizamos el servidor HDock, un servidor ya que proporciona acoplamientos moleculares proteína-ADN/ARN dentro de los estándares de la evaluación crítica de la predicción de interacciones (CAPRI). En primer lugar, el servidor toma muestras de los modos de unión putativos entre la proteína y el aptámero mediante la transformada rápida de Fourier, un método de búsqueda global; luego evalúa los modos de unión muestreados con una función de puntuación iterativa basada en el conocimiento para las interacciones proteína-ARN, y se eligen aquellas 10 poses con mejor puntuación (figura 22); proporciona también dos puntuaciones más: MaxSub y LG que determinan la calidad del acoplamiento y de las estructuras. Además, este servidor tiene la capacidad de seleccionar un rango de residuos de aminoácidos donde nos interesa se acople molecularmente el ligando, que en el estudio de la asignación de un aptámero por métodos computacionales implica el parche cargado electrostáticamente positivo de la proteína de interés (Yan, Y., *et al.*, 2017; Yan, Y., *et al.*, 2020).

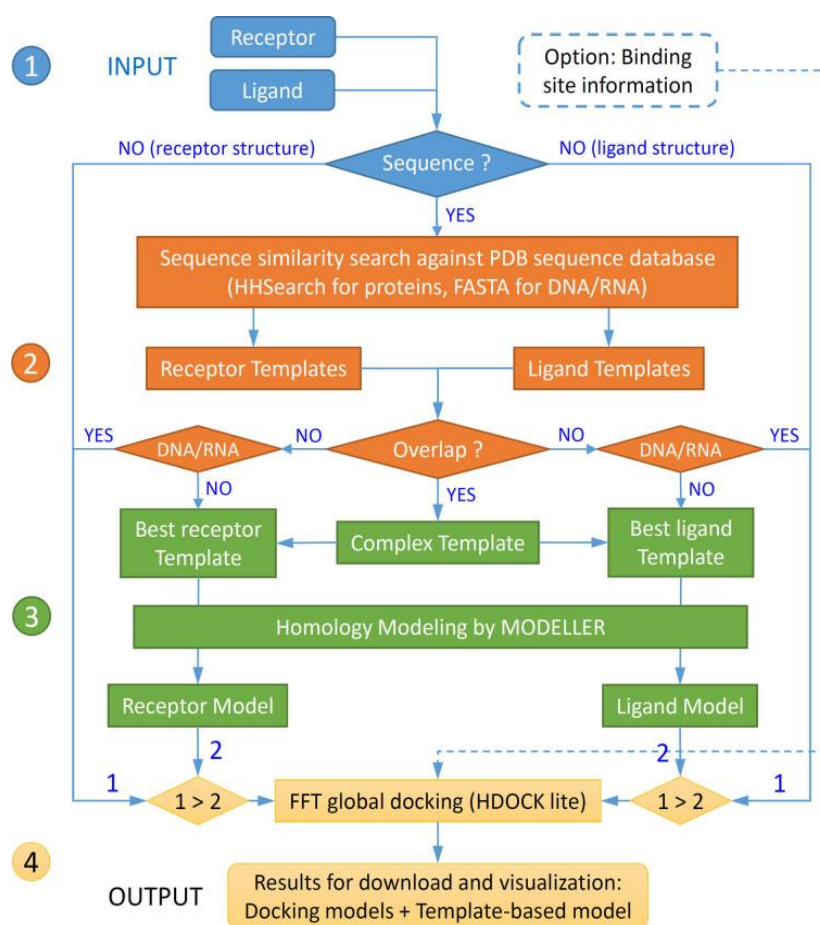


Figura 22. **Acoplamiento molecular en HDOCK**, tomado de Yan, Y., *et al.*, 2020. **1)** En el primer paso del flujo de trabajo se puede introducir las secuencias o estructuras que se van a acoplar, **2)** luego se realiza una búsqueda de similitud de secuencias en la base de datos de secuencias PDB para encontrar las secuencias homólogas para las moléculas de receptor y ligando. **3)** comparando dos conjuntos de plantillas para ver si tienen registros comunes con los mismos códigos PDB, se seleccionará una plantilla común tanto para el receptor como para el ligando. Si no hay superposición entre dos conjuntos de plantillas homólogas, se seleccionarán las mejores plantillas. **4)** Con las estructuras ya sea modeladas por el servidor o cargadas por los usuarios, se lleva a cabo el acoplamiento global mediante el muestreo de las orientaciones de enlace que incorpora la información vinculante del sitio si los usuarios proporcionaron dicha información en el momento del envío y en la página de resultados, los usuarios pueden ver los 10 mejores modelos de acoplamiento a través de una interfaz web de Jmol o USCf Chimera.

En este sentido, la inteligencia artificial como los métodos computacionales de aprendizaje automático/profundo, se han convertido en una alternativa para seleccionar candidatos potenciales de aptámeros con alta afinidad y especificidad para las moléculas blanco en el descubrimiento de fármacos a través de la información estructural (Chen, Z., *et al.*, 2021).

Hipótesis

Existe por lo menos un aptámero de ARN que se unirán específicamente a cada uno de los diferentes dominios de adhesión de las adhesinas de la familia *Hop* de *H. pylori*.

Justificación

Helicobacter pylori es un patógeno que infecta a más del 50% de la población mundial y en México su prevalencia es mayor al 70%, además de que este patógeno se ha vuelto resistente. Así mismo, la infección por *H. pylori* se ha considerado como un factor etiológico para el desarrollo de úlceras gástricas y duodenales, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa gástrica.

Por lo anterior, proponemos diseñar con un enfoque bioinformático, un aptámero de ARN que se acople molecularmente a las proteínas de la membrana externa de la familia *Hop* de *H. pylori* involucradas en el mecanismo de adhesión bacteriana; lo que conllevará a proponer nuevos esquemas de tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno que redunden en una mejor calidad de vida para el paciente.

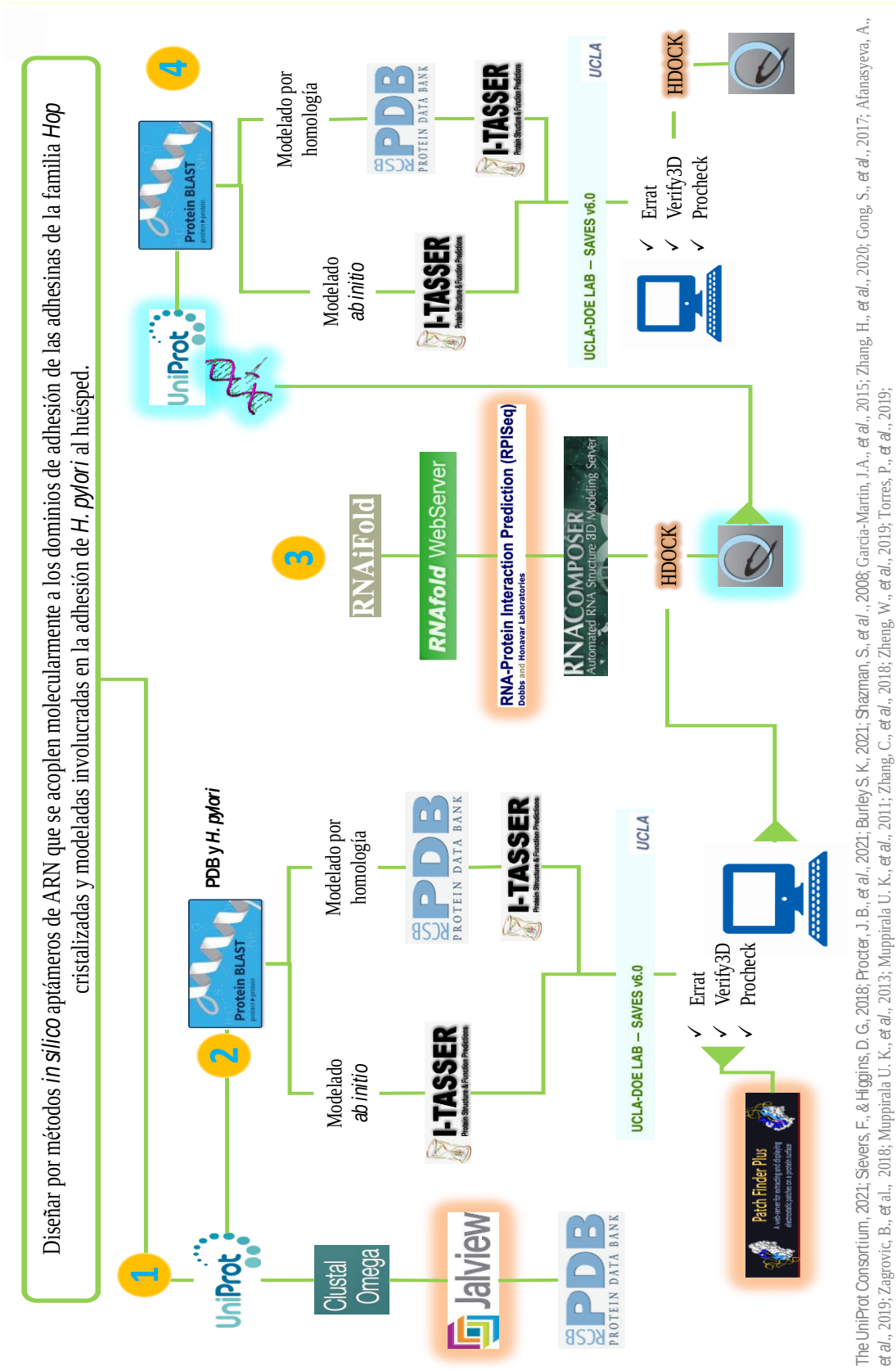
Objetivos

Objetivo general

Diseñar por métodos *in silico* aptámeros de ARN que se acoplen molecularmente a los dominios de adhesión de las adhesinas de la familia *Hop* cristalizadas y modeladas de las cepas de *H. pylori* involucradas en la adhesión bacteriana al huésped.

Objetivos particulares

1. Identificar los residuos de aminoácidos conservados en los dominios de las adhesinas de la familia *Hop* de las cepas de *H. pylori* que participan en el mecanismo de adhesión.
2. Modelar las adhesinas HopT (BabB), HopC (AlpA), AlpB (HopB), HopH, HopS y HopZ de *H. pylori* de las cuales no se ha determinado su estructura cristalina.
3. Seleccionar un aptámero de ARN que se una a cada dominio de adhesión de las adhesinas de *H. pylori*.
4. Demostrar la especificidad de acoplamiento del aptámero con las adhesinas de *H. pylori* mediante la mutación de los residuos de aminoácidos del área de interfaz del aptámero y el dominio de adhesión.



Metodología

Secuencias

La búsqueda e identificación de secuencias de aminoácidos de las cepas representantes de las principales poblaciones geográficas de *H. pylori*: hpAfrica1, hpAfrica2, hpEastAsia y hpEurope para las adhesinas de la familia *Hop*: AlpA, AlpB, BabA, BabB, LabA, OipA, SabA, HopQ y HopZ, se realizó considerando las secuencias anotadas y depositadas en el servidor Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) que es una base de datos integral y no redundante que contiene la mayoría de las secuencias de proteínas disponibles públicamente en el mundo.

Alineamiento Múltiple de Secuencias (MSA)

Las secuencias de aminoácidos obtenidas de cada adhesina de la familia *Hop* representantes de las principales poblaciones geográficas de *H. pylori*: hpAfrica1, hpAfrica2, hpEastAsia y hpEurope, en formato FASTA fueron comparadas mediante un alineamiento múltiple en la plataforma EMBL–EBI con el servidor Clustal Omega versión 1.2.4 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), este utiliza el algoritmo mBed para generar un árbol guía mediante la generación de una matriz de distancias con el cálculo de distancia por pares basado en el algoritmo de alineación de K-tuplas, que se utiliza para guiar la alineación progresiva. Su motor de alineación perfil-perfil, se basa en el software HHalign que utiliza el algoritmo de precisión máxima (MAC) para alinear perfiles. Se utilizó la penalización por gaps de forma predeterminada (Sievers, F. & Higgins, D.G., 2021). Los alineamientos se importaron, visualizaron y analizaron mediante el software JalView capturando información de la secuencia como son las regiones conservadas de residuos de aminoácidos con la selección de color por conservación, primero se seleccionó en el color a BLOSUM62 que colorea cada residuo en una escala de blanco a azul según la probabilidad de mutación de la secuencia de referencia o consenso para la vista de alineación, posteriormente se habilitó la coloración por conservación que colorea las columnas que exhiben un alto puntaje de conservación de propiedades fisicoquímicas donde el color más fuerte indica propiedades conservadas por arriba del 30% de las secuencias alineadas. Finalmente se habilitó la coloración por

porcentaje de identidad de secuencia que colorea los residuos de aminoácidos según su abundancia en cada columna de la alineación y fue seleccionado el sombreado por arriba del umbral de identidad, es decir, por arriba del 25% de identidad en una escala de amarillo a rojo (Procter, J. B., *et al.*, 2021).

Como control en el alineamiento se utilizó a la adhesina de la vaina flagelar HpaA de *H. pylori* que no pertenece a la familia *Hop* (Volland, P., *et al.*, 2003)

Estructuras

Se buscaron y descargaron las estructuras 3D en formato pdb de las adhesinas de la familia *Hop* de *H. pylori* en el Banco de Datos de Proteínas por sus siglas en inglés PDB (<https://www.rcsb.org/>).

Modelamiento molecular

Inicialmente se descargó en formato FASTA desde el servidor UniProt (<https://www.uniprot.org/>), las secuencia de las adhesinas para las que no se encontró su estructura 3D de la cepa de referencia de *H. pylori*: *Campylobacter pylori*, Marshall *et al.* Goodwin *et al.* ATCC700824, un aislado geográfico de Reino Unido (ATCC, 2021), que utilizamos como una cepa representante del estado actual de la distribución geográfica de *H. pylori* en el continente Americano.

Posteriormente se realizó la búsqueda de alineación local para cada adhesina mediante el servidor BLASTp (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) utilizando como parámetros de comparación las proteínas registradas en la base de datos PDB delimitándolo solo a la bacteria *H. pylori* para determinar si el modelado sería por homología (25% de ID) o *Ab initio*.

Aquellas secuencias que mostraron homología con una identidad de secuencia mayor al 25% fueron seleccionadas como plantillas para el modelado de las proteínas en el servidor I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) utilizándolo como parámetro

del modelado a la región de los residuos de aminoácidos que mostraron homología. Las que no mostraron homología con otras secuencias, fueron modeladas mediante el método *ab initio* en el mismo servidor.

Validación estereoquímica

Una vez obtenidas las estructuras 3D de las adhesinas modeladas, se consideró como mejor modelo de calidad a aquel que tuviera una puntuación del factor de confianza (C) dentro del rango de -5 a 2 con un valor $\leq 5\text{\AA}$ para la RMSD (desviación de la media cuadrática).

En la plataforma UCLA DOE Lab (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) se cargó cada modelado seleccionando los servidores de ERRAT, Verify3D y PROCHECK considerando para una buena calidad estereoquímica, aquellas estructuras que obtuvieron una puntuación del factor de calidad general mayor al 60%, una puntuación mayor al 50% de residuos de aminoácidos con una coincidencia media 3D-1D mayor o igual a 2.0, para los primeros dos servidores, respectivamente, y en los plot de ramachandran se verificó que más del 90% de residuos de aminoácidos estuvieran en las regiones de confianza con un factor G mayor que -0.50 .

Selección y asignación de aptámeros

A partir del servidor RNAiFold (<https://bioinformatics.bc.edu/clotelab/RNAiFold/>) que proporciona únicamente secuencias de RNA, se obtuvieron las secuencias aleatorias para generar las estructuras secundarias de los aptámeros con una longitud de 100 nucleótidos que con base en su energía termodinámica, se seleccionaron los 100 aptámeros más estables energéticamente en el servidor RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) con las siguientes características: frecuencia de la estructura de energía libre mayor que 60%, energía termodinámica del ensamblaje menor que o igual a -20Kcal/mol y la diversidad del conjunto menor que 2.

Posteriormente se introdujo la secuencia de cada uno de los 100 aptámeros estables termodinámicamente con cada una de las nueve adhesinas de la familia *Hop* en el servidor RPIseq (<http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/>) y se tomaron en cuenta aquellos que presentaron una predicción de interacción y precisión positiva mediante la puntuación del clasificador de máquinas de vectores de soporte (SVM) con un valor mayor que o igual a 0.8 y con una puntuación del clasificador de bosque aleatorio (RF) mayor que o igual a 0.5.

Luego, se obtuvieron las estructuras terciarias de los aptámeros que mostraron una predicción de interacción positiva en formato pdb mediante el servidor RNAComposer (<http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl/>) y se descargó su estructura.

Acoplamiento molecular

Inicialmente se llevó a cabo la predicción de interfaces de unión de ácidos nucleicos (parches electrostáticos en color azul) de todas las adhesinas en el servidor PatchFinder (<http://pfp.technion.ac.il/index.html>) y con las coordenadas del parche electrostático positivo de las adhesinas, se llevó a cabo el acoplamiento molecular dirigido mediante el servidor HDOCK (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) tomándo en cuenta las coordenadas del parche electrostático.

Además, se consideró para un buen acoplamiento molecular que los valores de puntuación de acoplamiento fueran menores que -100 Kcal/mol y que las puntuaciones de LG fueran de 1.5 a 5.0 o más y las de MaxSub de 0.1 a 0.8 o más, considerándo visualmente mediante el programa USCF Chimera que el aptámero se acoplara molecularmente a los dominios de adhesión de las adhesinas de la familia *Hop* de *H. pylori*.

Como control de reactividad cruzada se llevó a cabo el acoplamiento molecular de los aptámeros seleccionados con respecto a la adhesina FimH de *E. coli* (Le Trong, I., *et al.*, 2010); para el control de selectividad y especificidad, se llevó a cabo el acoplamiento molecular de los aptámeros seleccionados con respecto a la adhesina de la vaina flagelar HpaA de *H. pylori* que no pertenece a la familia *Hop* (Volland, P., *et al.*,

2003) y como control de unión negativa, se acopló molecularmente el aptámero Hp_control_Hop con las adhesinas (Gupta, A., *et al.*, 2021).

Comprobación de la especificidad, afinidad y selectividad

Se realizó la inspección visual en el programa USCF Chimera del área de interfás aptámero- adhesina ubicando al menos seis residuos de aminoácidos que comprobando con los MSA's estuvieran conservados por arriba del 70% en las secuencias de las adhesinas para mutarlos por glicinas.

Luego se llevó a cabo el mismo procedimiento de modelado molecular por el método de homología o *ab initio* antes mencionado, con su respectiva validación estereoquímica para las adhesinas mutadas.

Para el acoplamiento molecular en el servidor HDock (<http://hdock.phys.hust.edu.cn/>) se probaron los nueve aptámeros seleccionados con su respectiva adhesina tomando en cuenta los parámetros de puntuación de acoplamiento molecular, LG y MaxSub antes mencionados.

Resultados

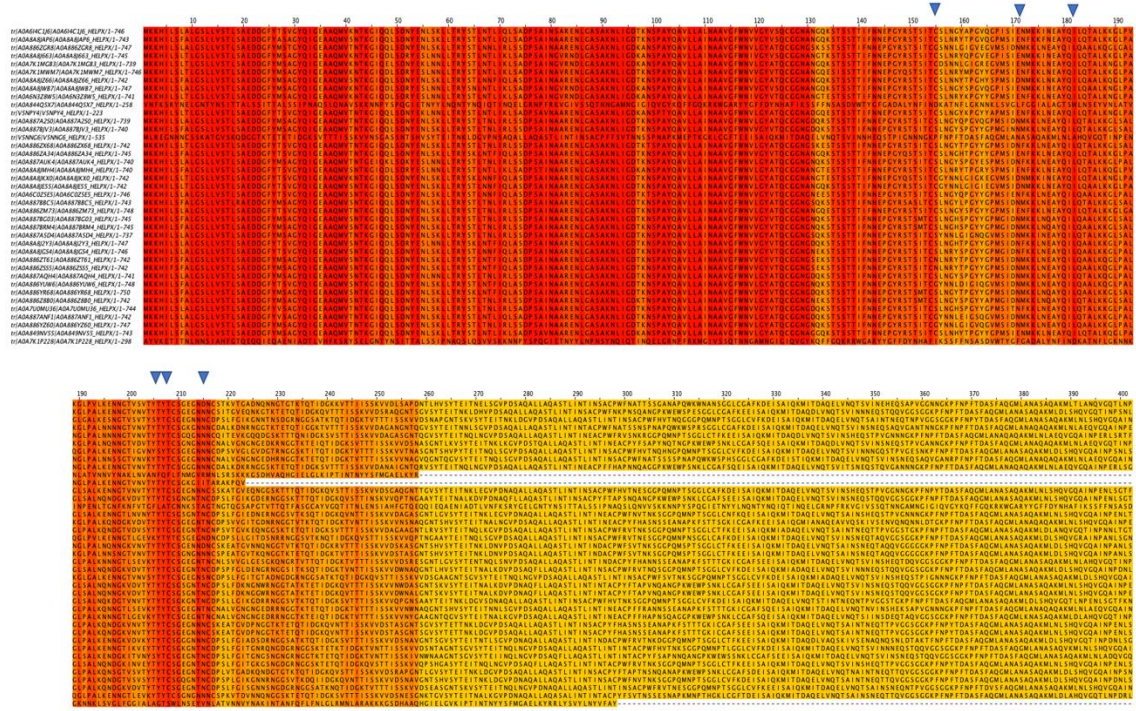
Residuos de aminoácidos conservados en los dominios de las adhesinas de la familia Hop de las cepas de *H. pylori* que participan en el mecanismo de adhesión.

Para identificar regiones de similitud que reflejan relaciones biológicas asociadas a una función potencial entre proteínas, en el presente trabajo de investigación, se muestran los MSA's de la región N-terminal (residuos 1 al 400) de las secuencias de las adhesinas representantes de las principales poblaciones geográficas (hpAfrica1, hpAfrica2, hpEastAsia y hpEurope) de varias cepas de *H. pylori*: BabA, SabA, LabA, HopQ, AlpA, AlpB, BabB, OipA y HopZ (Wang, Y., *et al.*, 2018; Nute, M., *et al.*, 2019; Falush, D., *et al.*, 2003).

Así mismo, cabe destacar que las secuencias de las adhesinas de las distintas cepas y aislados bacterianos de *H. pylori* depositadas en UniProt/GenBank y utilizadas en los MSA's de nuestro trabajo de investigación, están dentro de un rango de tiempo de 1991 hasta 2019 (GenBank, 2022).

El código de colores de los MSA's está dado por la identidad de secuencia (mayor al 25%) y la conservación de residuos de aminoácidos por arriba del 30% hasta 100% que va de amarillo a rojo, respectivamente (Procter, J., *et al.*, 2021), donde se identificaron regiones de similitud en el extremo N-terminal de residuos de aminoácidos conservados por arriba del 70% (anaranjado a rojo) en donde se ubica el exodominio de adhesión (Procter, J., *et al.*, 2021; Coppens, F., *et al.*, 2018), de tal manera que podemos observar la concordancia existente entre la relación biológica de la secuencia, su función de adhesión al epitelio gástrico y la estructura de mango-cabeza-corona que da lugar al exodominio de adhesión (Nute, M., *et al.*, 2019; Procter, J., *et al.*, 2021).

Además, los residuos de aminoácidos mutados que están conservados por arriba del 70% y ubicados en el área de interfás aptámero-adhesina para evaluar posteriormente su especificidad y selectividad, están señalados con triángulos azules en la parte superior de los MSA's.



30% 100%
Conservación

Figura 23. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas BabA (HopS) de *H. pylori* (39 Secuencias). Muestra una conservación predominante del 80-100% (anaranjado a rojo) de los residuos de aminoácidos 1 al 220 en la región de cabeza-corona del dominio de adhesión, y una conservación predominante del 30% al 60% (amarillo a anaranjado) de los residuos de aminoácidos 221 al 400 en la región de mango. Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en un rango de 90% al 100% (anaranjado a rojo) y corresponden al área de interfaz aptámero-adhesina.

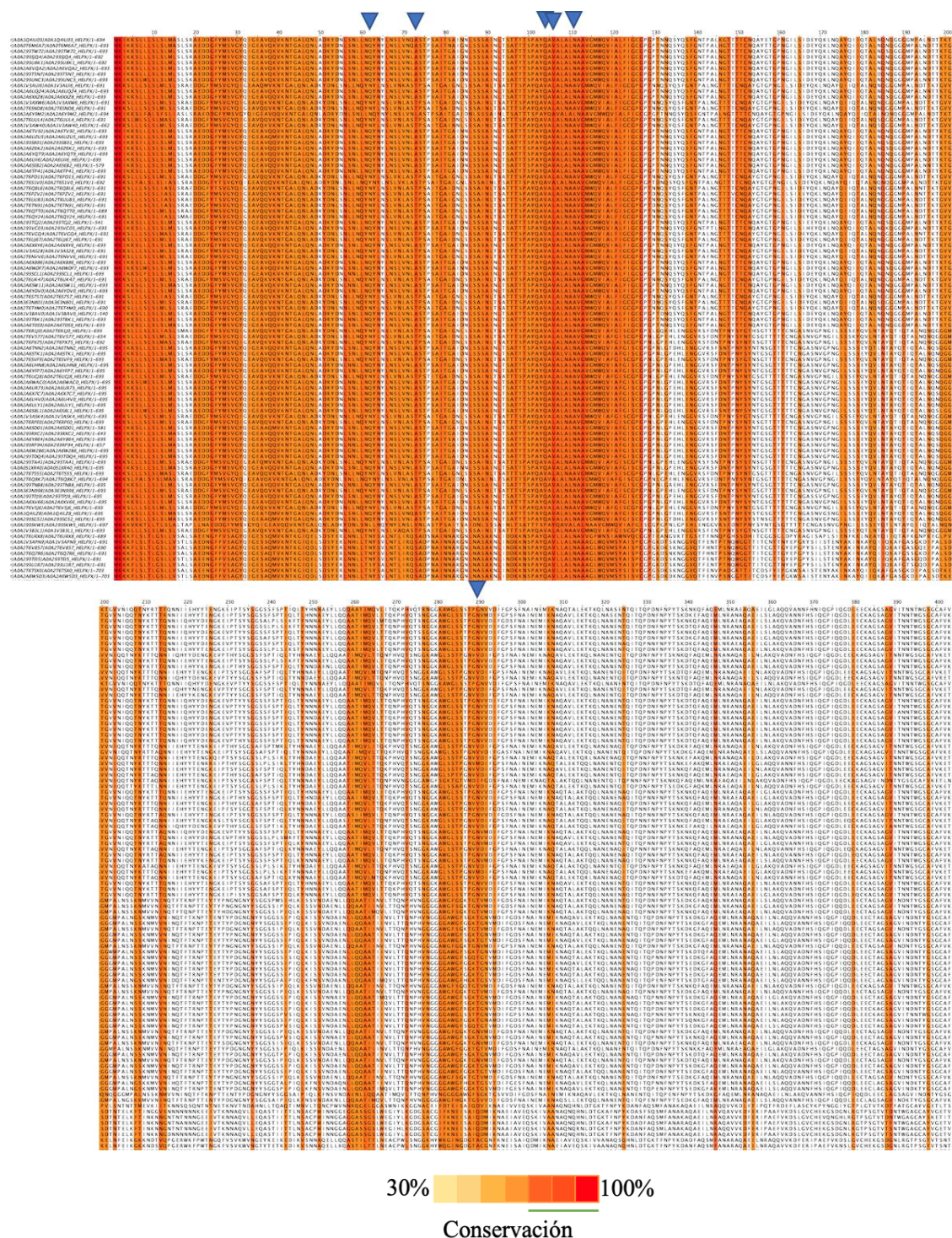


Figura 24. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas SabA (HopP) de *H. pylori* (se muestran 100 secuencias de 2,282). Muestra una conservación del 70-90% (anaranjado) de residuos de aminoácidos en la región de mango-cabeza-corona (residuos 1 al 300) del dominio de adhesión y la conservación de algunos residuos de aminoácidos en un 70% (anaranjado) en la región de mango (residuos 1 al 400). Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en un rango de 80% al 90% a lo largo de las secuencias y corresponden al área de interfaz aptámero-adhesina.

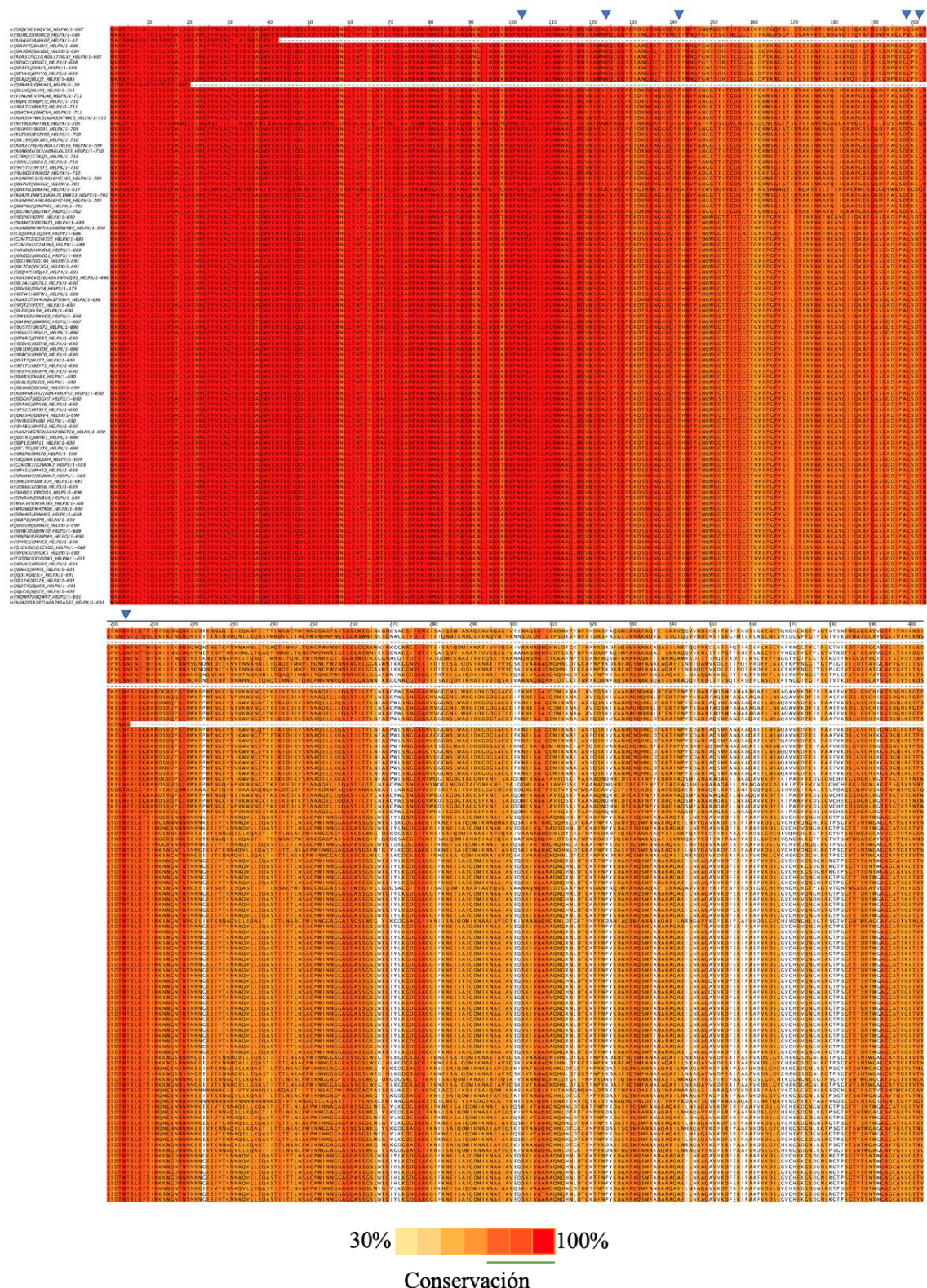


Figura 25. MSA del extremo N-terminal (residuos1-400) de las adhesinas LabA (HopD) de *H. pylori* (105 Secuencias). Muestra una conservación del 80-100% (anaranjado a rojo) de residuos de aminoácidos predominate en la región de mango-cabeza-corona. Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), estan conservados en un rango del 90% al 100% (anaranjado a rojo) y corresponden al área de interfáz aptámero-adhesina.

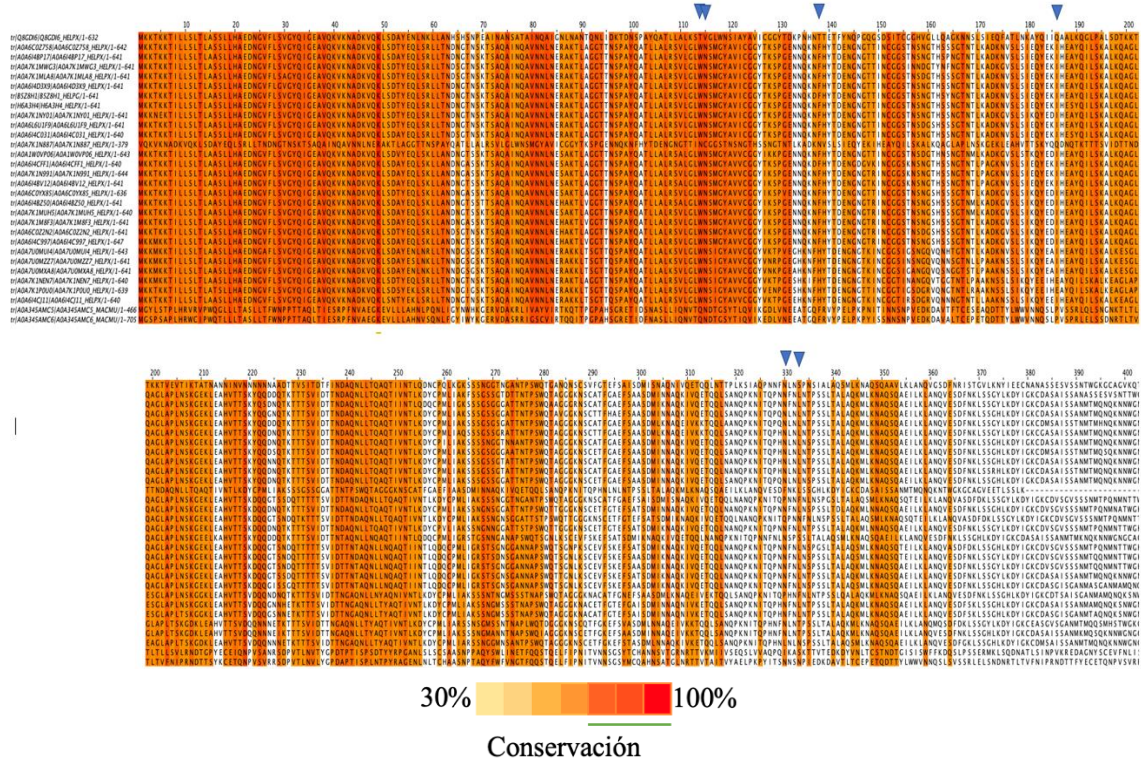


Figura 26. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas HopQ de *H. pylori* (30 Secuencias). Muestra una conservación del 70-100% (anaranjado a rojo) de residuos de aminoácidos en la región de mango-cabeza-corona. Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en un rango del 80% al 100% (anaranjado a rojo) y corresponden al área de interfáz aptámero-adhesina.

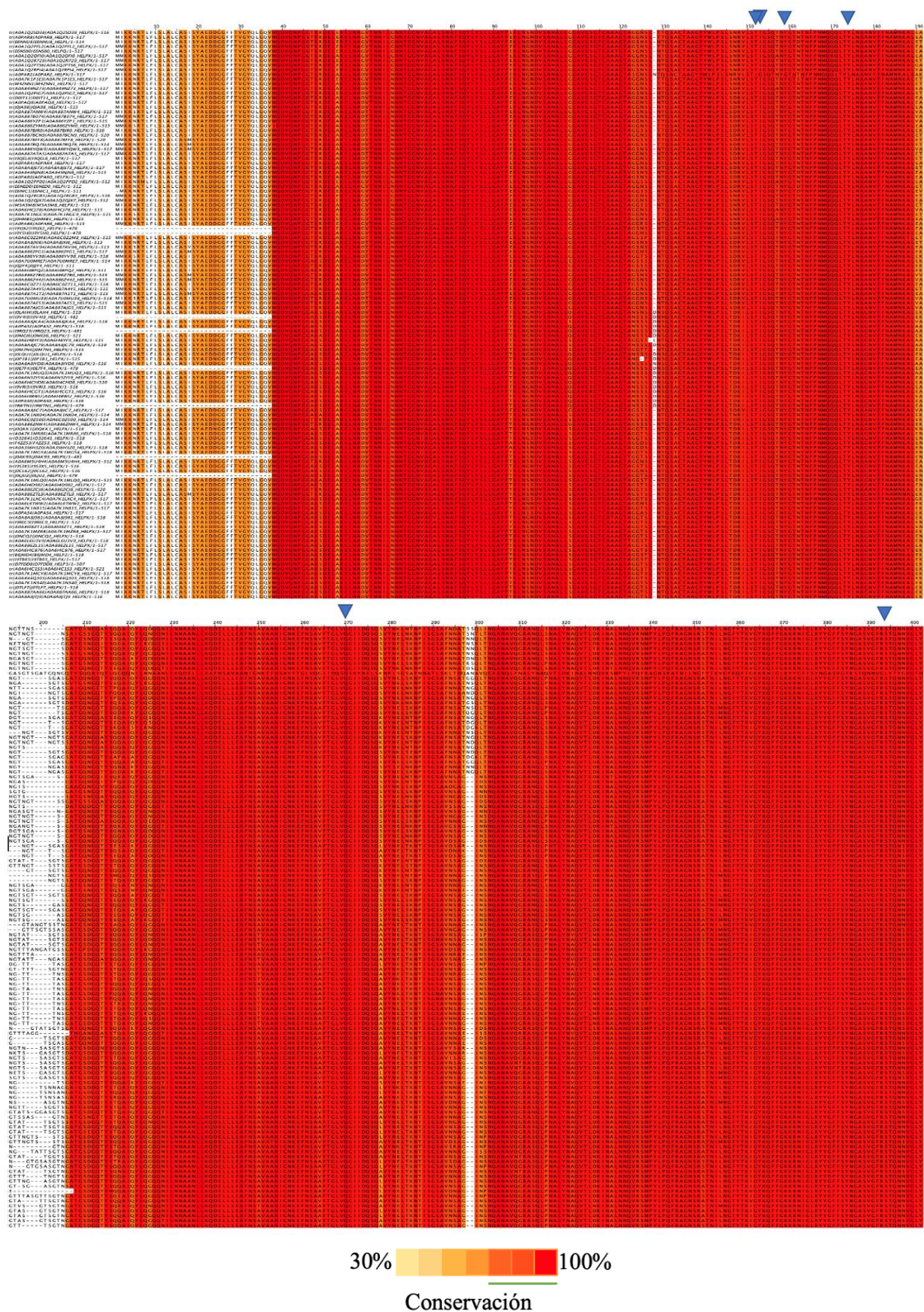


Figura 27. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas Alpa (HopC) de *H. pylori* (122 Secuencias). Muestra una conservación predominante del 80-100% (anaranjado a rojo) de residuos de aminoácidos en la región de mango-cabeza-corona. Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en un 100% (rojo) y corresponden al área de interfaz aptámero-adhesina.

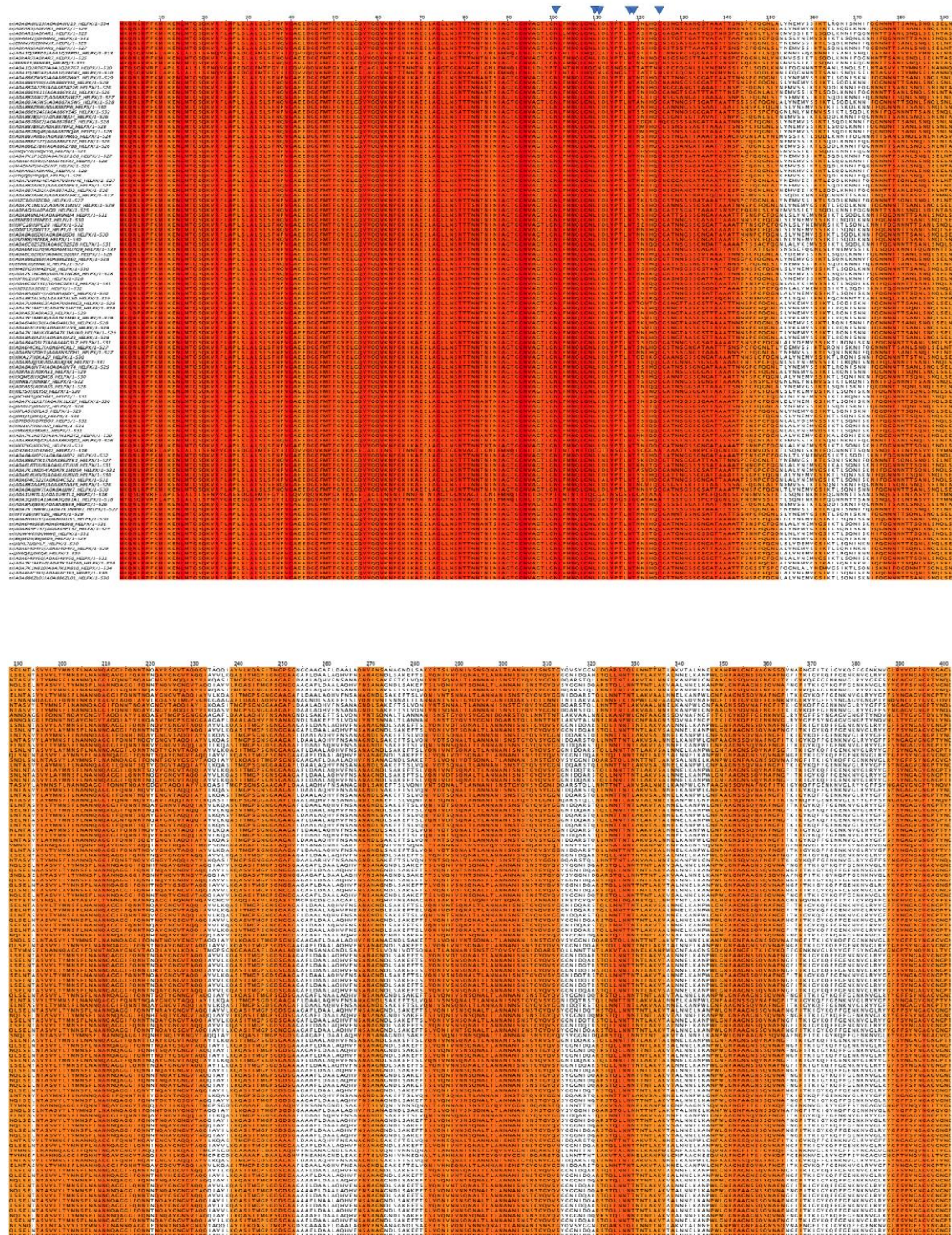


Figura 28. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas AlpB (HopB) de *H. pylori* (114 Secuencias). Muestra una conservación del 70-100% (anaranjado a rojo) de residuos de aminoácidos en la región de mango-cabeza-corona. Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados al 100% (rojo) y corresponden al área de interfáz aptámero-adhesina.

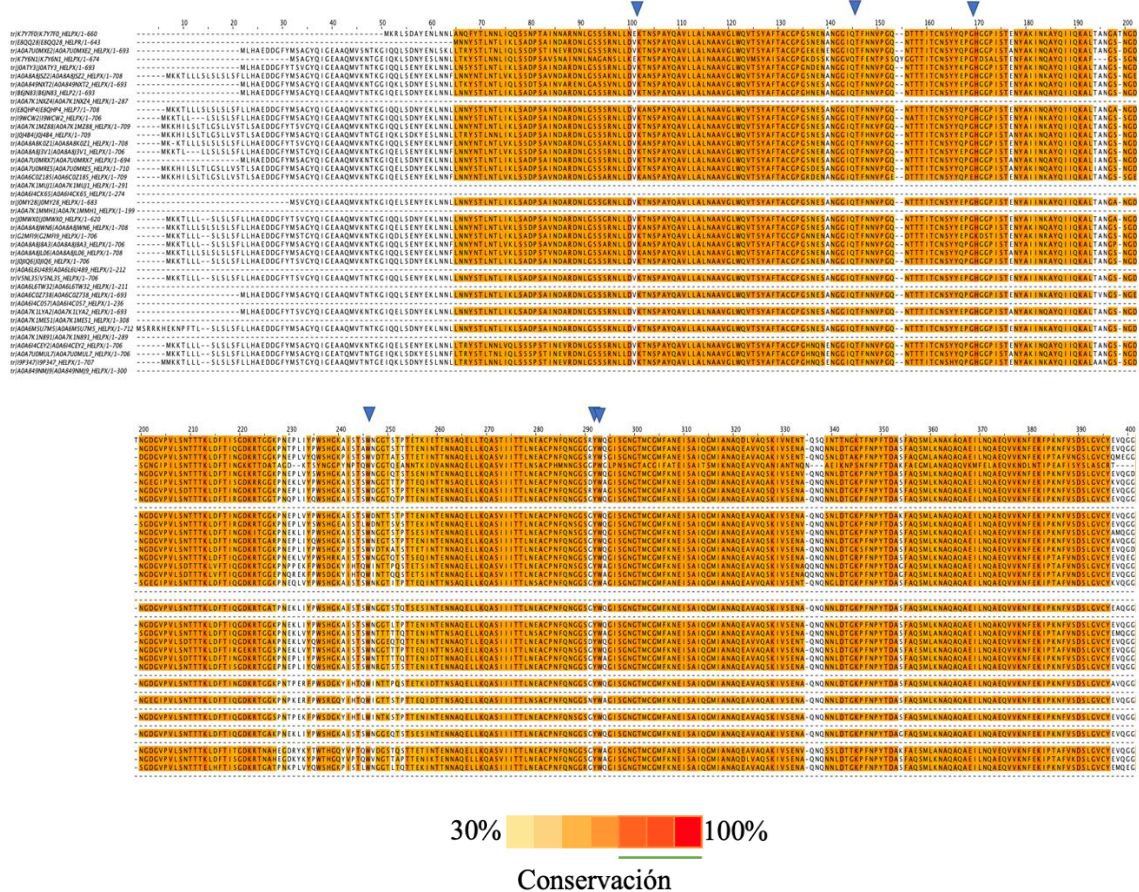


Figura 29. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-400) de las adhesinas BabB (HopT) de *H. pylori* (41 Secuencias). Muestra una conservación del 60-80% de residuos de aminoácidos en la región de mango-cabeza-corona. Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en 80% (anaranjado) y corresponden al área de interfaz aptámero-adhesina.

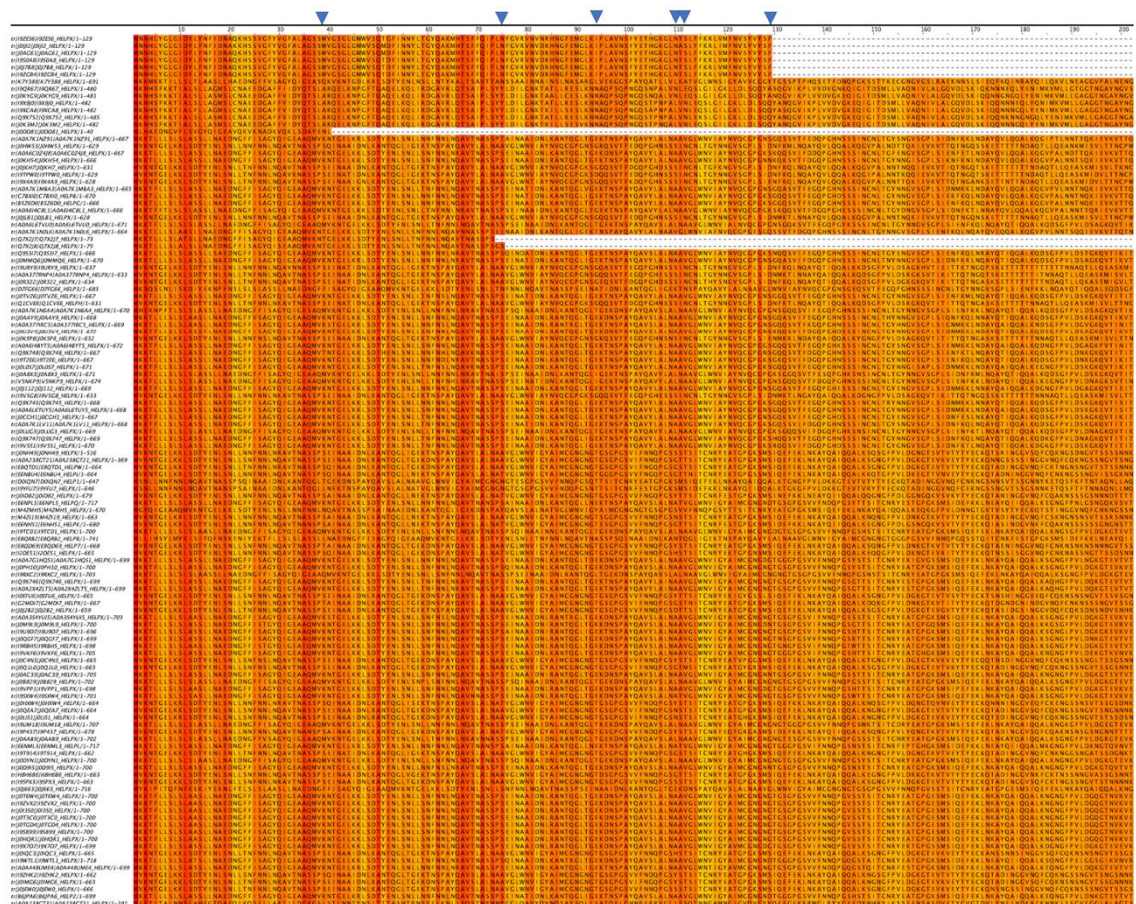


Figura 30. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-203) de las adhesinas HopZ de *H. pylori* (125 Secuencias). Muestra una conservación del predominantemente 60-80% (anaranjado) de residuos de aminoácidos en la región de cabeza-corona (residuos 1 al 200) y en menor presencia residuos de aminoácidos conservados al 100%. Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en un rango del 70% al 80% (anaranjado) y corresponden al área de interfáz aptámero-adhesina.

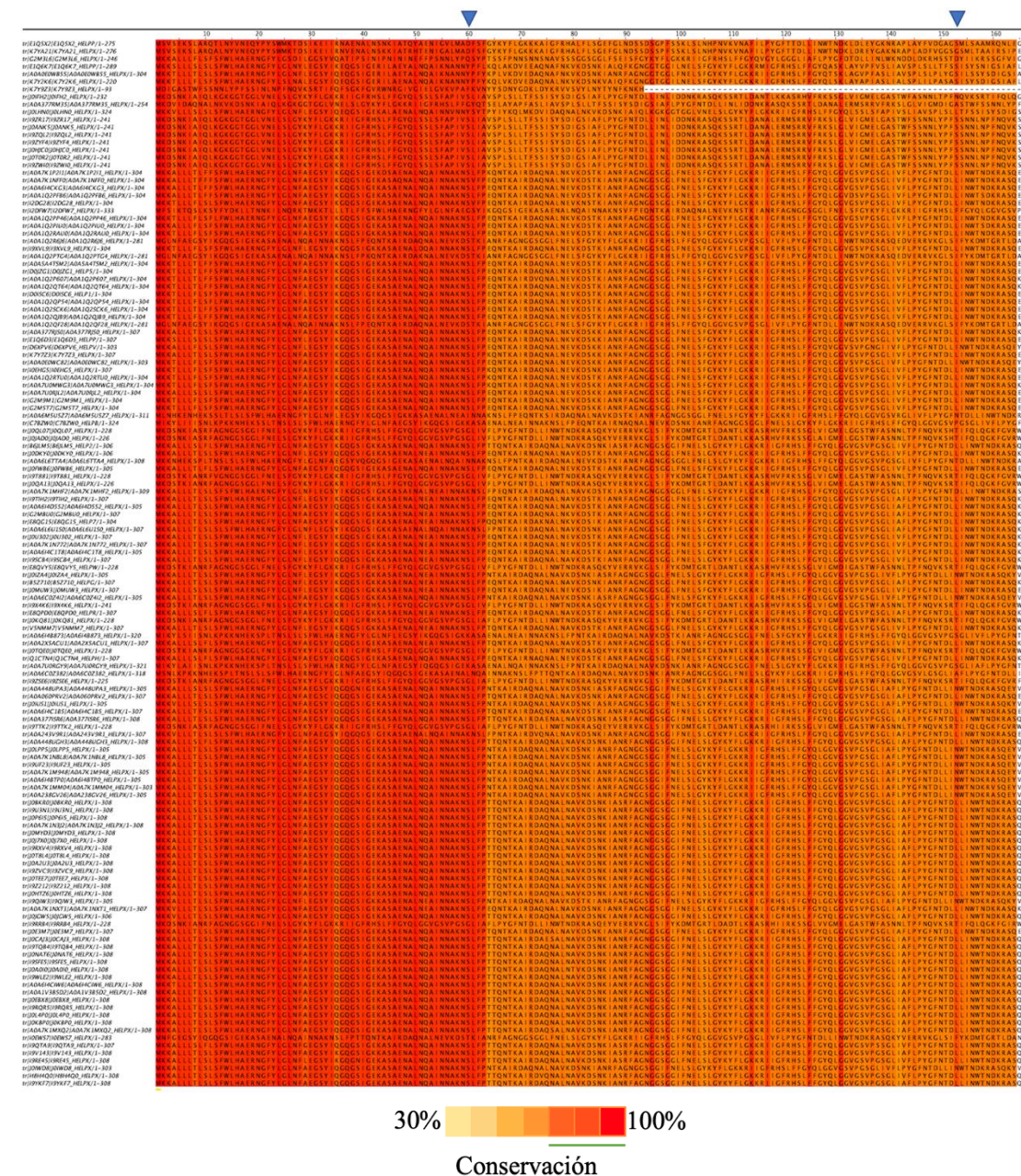


Figura 31. **Panel A. MSA del extremo N-terminal (residuos 1-160) de las adhesinas OipA(HopH) de *H. pylori* (138 Secuencias).** Muestra una conservación del 70-100% (anaranjado a rojo) de residuos de aminoácidos en la región de cabeza-corona (residuos del 1 al 160). Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en un rango del 90% al 100% (anaranjado a rojo) y corresponden al área de interfaz aptámero-adhesina.

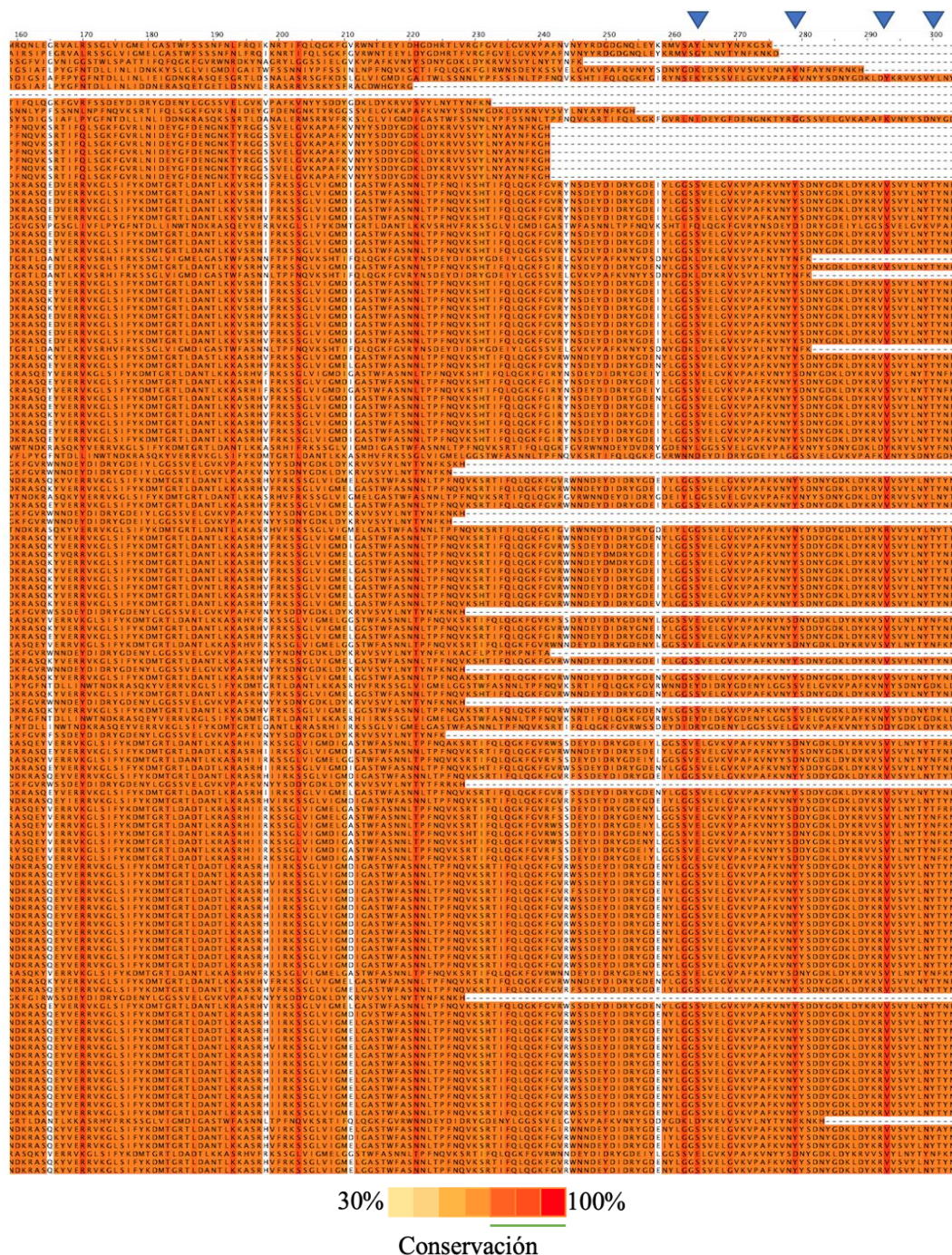


Figura 31. Panel B. MSA del extremo N-terminal (residuos 160-300) de las adhesinas OipA (HopH) de *H. pylori* (138 Secuencias). Muestra una conservación de residuos de aminoácidos en la región de cabeza-corona (residuos del 160 al 300) predominante del 70% (anaranjado) y menor proporción residuos de aminoácidos al 100% (rojo). Los residuos de aminoácidos mutados (triángulos azules), están conservados en un rango del 80% al 100% (anaranjado a rojo) y corresponden al área de interfáz aptámero-adhesina.

Adhesinas modeladas: HopT (BabB), HopC (AlpA), AlpB (HopB), OipA (HopH) y HopZ de *H. pylori* de las cuales no se ha determinado su estructura cristalina.

Las adhesinas AlpA, AlpB, BabB, OipA, y HopZ fueron modeladas utilizando las secuencias de la cepa certificada *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*) ATCC 26695, un aislado geográfico de Reino Unido (ATCC, 2021), que utilizamos como una cepa representante del estado actual de la distribución geográfica de *H. pylori* en el continente Americano (Falush, D., *et al.*, 2003).

Por el método de homología se modelaron las adhesinas BabB y HopZ, y por el método *Ab initio* las adhesinas AlpA, AlpB y OipA, que muestran parámetros dentro de los estándares de calidad estereoquímica, así como la estructura de mango-cabeza-corona reportada para otras adhesinas de la familia *Hop*, excepto en OipA que muestra la estructura de porina característica de las proteínas de la familia Hop (Tiwari, A., *et al.*, 2020; Alm, R. A., *et al.*, 2000).

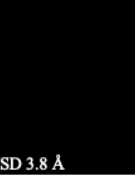
Estructura de referencia: BabA (HopS)			
			
AlpA (HopC) modelado <i>Ab initio</i>			
 RMSD 2.3 Å	I-TASSER	-4.15	
	ERRAT	81.42 %	
	Verify 3D	72.26%	
	PROCHECK	98.6%	-0.50
Alp B (HopB) modelado <i>Ab initio</i>			
 RMSD 4.1 Å	I-TASSER	-3.89	
	ERRAT	70.31%	
	Verify 3D	56.11%	
	PROCHECK	97.1%	-0.50
OipA (HopH) modelada <i>Ab initio</i>			
 RMSD 3.8 Å	I-TASSER	-4.37	
	ERRAT	61.34%	
	Verify 3D	60%	
	PROCHECK	95.18%	-0.50

Tabla 3. **Modelado *Ab initio* de las adhesinas AlpA, AlpB y OipA.** Estructura 3D de referencia (BabA) y las adhesinas modeladas resaltando la región de mango (café), cabeza (verde) y corona (magenta). Servidores de evaluación estereoquímica de los modelados: I-TASSER (Factor de confianza) [-5 a 2] y una RMSD [$\leq 5\text{\AA}$], ERRAT (Factor de calidad) [$>60\%$], Verify3D (residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2.) [$>50\%$], PROCHECK (residuos de aminoácidos ubicados en regiones favorables [$>90\%$]/factor G [≥ -0.50]). ***Anexo 1. Gráficos de calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas.**

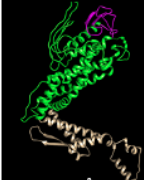
Estructura de referencia: BabA (HopS)			
			
BabB (HopT) modelado por homología con BabA con un 54.84% de ID			
 RMSD 2.3 Å	I-TASSER	-3.93	
	ERRAT	81.42%	
	Verify 3D	72.26%	
	PROCHECK	98.6%	-0.50
HopZ modelado por homología con BabA con un 41.25% de ID			
 RMSD 3.9 Å	I-TASSER	-3.02	
	ERRAT	61.77%	
	Verify 3D	86.04%	
	PROCHECK	96%	-0.41

Tabla 4. **Modelado por homología de las adhesinas BabB y HopZ.** Estructura 3D de referencia (BabA) y las adhesinas modeladas resaltando la región de mango (café), cabeza (verde) y corona (magenta). Servidores de evaluación estereoquímica de los modelados: I-TASSER (Factor de confianza) [-5 a 2] y una RMSD [$\leq 5\text{\AA}$], ERRAT (Factor de calidad) [$>60\%$], Verify3D (residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2.) [$>50\%$], PROCHECK (residuos de aminoácidos ubicados en regiones favorables [$>90\%$]/factor G [≥ -0.50]). ***Anexo 1. Gráficos de calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas.**

Selección y asignación de aptámeros que se unen a los dominios de adhesión de las adhesinas de *H. pylori*.

De la biblioteca generada de 100 aptámeros estables termodinámicamente, se probó cada uno de ellos para predecir su interacción con las adhesinas de la familia *Hop*. Los que mostraron resultados favorables se pueden observar en las tablas 5 y 6, es decir, valores de frecuencia de la estructura de energía libre mayor que 60%, energía termodinámica del ensamblaje menor que o igual a -20Kcal/mol y una diversidad del conjunto menor que 2 (Gruber, A.*et al.*, 2008; Zhang, H., *et al.*, 2020).

Los acoplamientos moleculares con los aptámeros seleccionados se muestran en la tabla 7 con puntuaciones que indican un buen acoplamiento molecular con puntuaciones LG de 1.5 a 5.0 o más, de MaxSub de 0.1 a 0.8 o más y de acoplamiento

menores que -100 Kcal/mol (Yan, Y., *et al.*, 2020), consistentes con el parche electrostático y la predicción de interacción de interacción positiva con valores SVM iguales o mayores que 0.8 y de RF igual o mayor a 0.6 (tabla 6) (Muppirala, U. K., *et al.*, 2011; Shazman, S., *et al.*, 2007).

a) Aptámeros seleccionados para cada adhesina

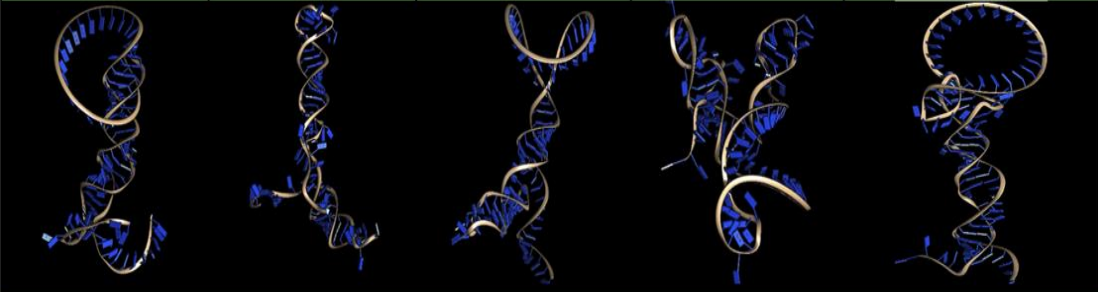
Hp_AlpA_82	Hp_AlpB_11	Hp_BabA_20	Hp_BabB_64	Hp_LabA_24
				
Estabilidad termodinámica				
-67.37 Kcal/mol	-49.45 Kcal/mol	-68.12 Kcal/mol	-33.30 Kcal/mol	-51.74 Kcal/mol
75.45 %	78.38 %	97.50 %	84.43 %	94.17 %
0.84	0.94	0.05	1.73	0.41
Hp_OipA_92	Hp_SabA_71	Hp_HopQ_73	Hp_HopZ_21	Hp_Control_Negativo_Hop
				
Estabilidad termodinámica				
-34.30 Kcal/mol	-61.54 Kcal/mol	-31.43 Kcal/mol	-27.57 Kcal/mol	-21.73 Kcal/mol
84.58 %	80.17 %	95.66 %	88.86 %	-94.94 %
0.53	1.29	0.56	0.56	0.33

Tabla 5. Aptámeros seleccionados para cada adhesina de la familia Hop de *H. pylori*. La estabilidad termodinámica se define por los valores obtenidos para la energía termodinámica del ensamblaje (verde) [≤ -20 Kcal/mol], la frecuencia de energía libre de la estructura (anaranjado) [$> 60\%$] y la diversidad del conjunto (azul) [< 2]. ***Anexo 2. Estructura secundaria, diagramas de montaña, entropía posicional de los aptámeros seleccionados por cada adhesina.**

b) Predicción de interacción adhesina-aptámero seleccionado.

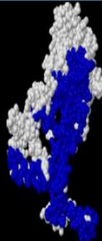
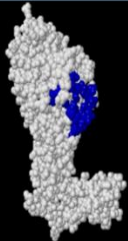
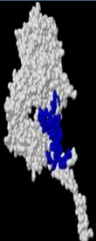
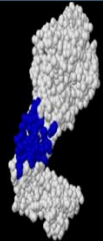
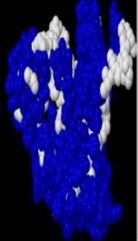
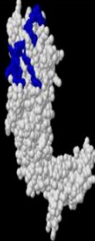
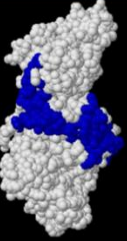
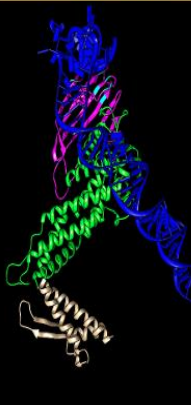
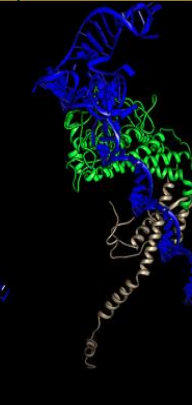
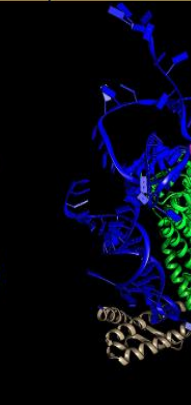
Parche electrostático positivo de las adhesinas									
AlpA		AlpB		BabA		BabB		LabA	
									
Predicción de interacción adhesina/aptámero seleccionado									
Hp_AlpA_82		Hp_AlpB_11		Hp_BabA_20		Hp_BabB_64		Hp_LabA_24	
SVM	RF	SVM	RF	SVM	RF	SVM	RF	SVM	RF
0.94	0.55	0.85	0.5	0.89	0.65	0.85	0.6	0.92	0.6
Parche electrostático positivo de las adhesinas									
OipA		SabA		HopQ		HopZ			
									
Hp_OipA_92		Hp_SabA_71		Hp_HopQ_73		Hp_HopZ_21			
SVM	RF	SVM	RF	SVM	RF	SVM	RF		
0.98	0.5	0.94	0.6	0.93	0.65	0.96	0.7		

Tabla 6. Predicción de interacción adhesina- aptámero seleccionado. La estructura 3D de las adhesinas muestra el parche electrostático positivo en color azul. Los clasificadores de predicción de interacción de máquina de soporte de vectores (SVM) [≥ 0.8] y bosque aleatorio (RF) [≥ 0.5].

c) Acoplamiento molecular adhesina-aptámero seleccionado.

Acoplamiento molecular adhesina-aptámero seleccionado				
AlpA	AlpB	BabA	BabB	LabA
Hp_AlpA_82	Hp_AlpB_11	Hp_BabA_20	Hp_BabB_64	Hp_LabA_24
				
-384.37	-328.18	-396.10	-371.39	-355.81
2.305	1.565	5.415	4.3	6.048
0.276	0.124	0.319	0.271	0.382

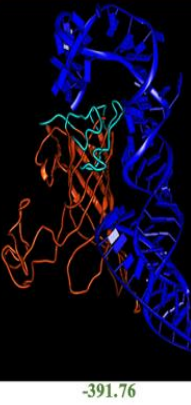
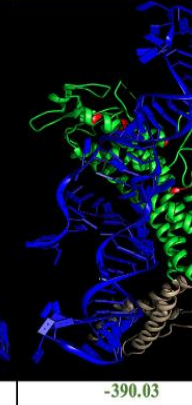
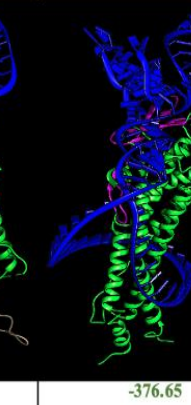
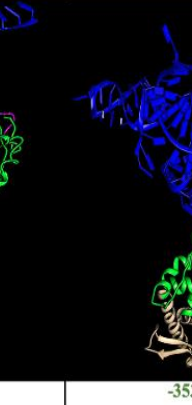
Acoplamiento molecular adhesina-aptámero seleccionado			
OipA	SabA	HopQ	HopZ
Hp_OipA_92	Hp_SabA_71	Hp_HopQ_73	Hp_HopZ_21
			
-391.76	-390.03	-376.65	-353.96
2.906	5.084	4.302	2.848
0.530	0.425	0.619	0.580

Tabla 7. Acoplamiento molecular adhesina-aptámero seleccionado. La estructura 3D del acoplamiento entre el aptámero (azul) y las adhesinas con su dominio de cabeza (verde) y corona (magenta). En color magenta se muestran los residuos o regiones implicados en la adhesión con su receptor en la célula huésped, excepto en SabA, que están marcados con color rojo para poder observarse mejor. La puntuación de acoplamiento molecular (verde) [< -100 Kcal/mol], la puntuación LG (azul) [1.5 a 5 o más] y la puntuación MaxSub (anaranjado) [0.1 a 0.8 o más], muestran la calidad y confiabilidad del acoplamiento.

d) Acoplamiento molecular de los controles.

Se utilizaron 3 controles, el primero de ellos muestra un aptámero que no es específico para los dominios de cabeza-corona de las adhesinas de la familia *Hop* (tabla 8). El segundo control, muestra el acoplamiento molecular negativo de los aptámeros seleccionados con la adhesina HpaA que no pertenece a la familia *Hop* de *H. pylori* (tabla 9). El tercero, muestra el acoplamiento molecular negativo de los aptámeros seleccionados con la adhesina FimH de *E. coli* (tabla10). Todos ellos consistentes con la predicción de interacción del servidor RPIseq y de un buen acoplamiento molecular, antes mencionados (Yan, Y., *et al.*, 2020; Muppirala, U. K.,*et al.*, 2011).

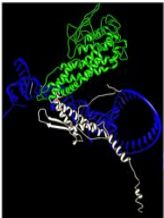
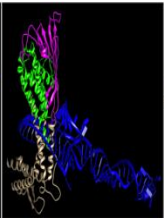
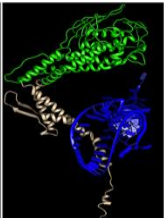
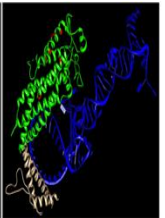
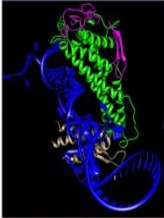
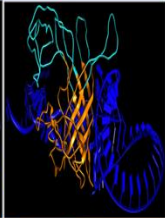
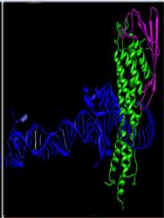
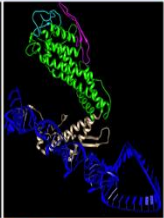
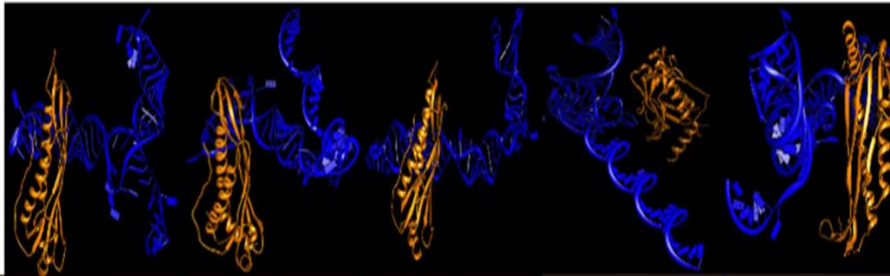
						
Servidor	Valores	HopC (AlpA)	HopB (AlpB)	HopS (BabA)	HopT (BabB)	HopP (SabA)
RPIseq	SVM	0.98	0.94	0.97	0.95	0.96
	RF	0.55	0.5	0.45	0.7	0.45
HDOCK	Puntuación de acoplamiento (Kcal/mol)	-3.89	-4.59	-6.95	-3.89	-8.58
	Puntuación LG	2.343	4.776	5.415	3.240	5.084
	Puntuación MaxSub	0.187	0.641	0.319	0.267	0.425
						
Servidor	Valores	HopD (LabA)	HopH (OipA)	HopQ	HopZ	
RPIseq	SVM	0.96	0.98	0.95	0.98	
	RF	0.65	0.35	0.6	0.65	
HDOCK	Puntuación de acoplamiento (Kcal/mol)	-4.05	-9.06	-9.80	-9.41	
	Puntuación LG	6.048	4.511	3.952	2.848	
	Puntuación MaxSub	0.382	0.294	0.487	0.580	

Tabla 8. Aptámero seleccionado como control de unión negativa a la región de cabeza (verde) y corona (magenta) de todas las adhesinas de la familia *Hop* de *H. pylori*. Estructura 3D del acoplamiento molecular de cada una de las adhesinas con el mismo aptámero Hp_Control_Negativo_Hop (azul). *En cian se muestra los bucles externos de OipA. *En rojo se muestran los residuos de interacción con su ligando para SabA. Los valores de predicción de interacción adhesina-aptámero por el servidor RPIseq mediante los clasificadores SVM [≥ 0.8] y RF [≥ 0.5] (anaranjado). Las puntuaciones de acoplamiento molecular y calidad de acoplamiento (azul) entre el aptámero control y las adhesinas.

						
RPI Seq	SVM	0.72	0.78	0.5	0.67	0.56
	RF	0.4	0.4	0.3	0.46	0.2
HDOCK	Puntuación de acoplamiento (Kcal/mol)	-12.09	-9.14	-6.89	-6.44	-10.32
	Puntuación LG	5.483	5.483	5.483	5.483	5.483
	Puntuación MaxSub	0.276	0.124	0.319	0.271	0.425

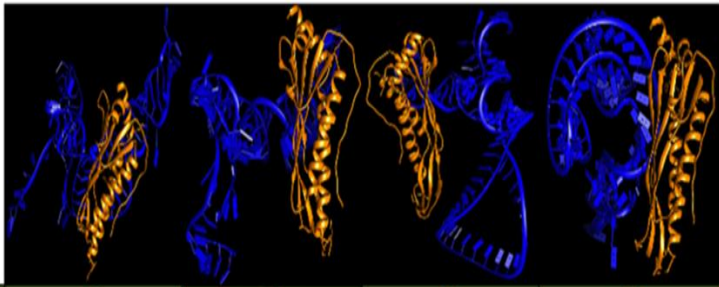
					
RPI Seq	SVM	0.71	0.63	0.72	0.72
	RF	0.5	0.37	0.48	0.5
HDOCK	Puntuación de acoplamiento (Kcal/mol)	-7.11	-9.15	-11.16	-12.97
	Puntuación LG	5.483	5.483	5.483	5.483
	Puntuación MaxSub	0.382	0.530	0.619	0.580

Tabla 9. Aptámero seleccionado como control de unión negativa a la adhesina HpaA de *H. pylori*. Estructura 3D del acoplamiento molecular de cada uno de los aptámeros seleccionados (azul) para las adhesinas de la familia *Hop* contra la adhesina HpaA (anaranjado) de *H. pylori*. Se muestran los valores de predicción de interacción adhesina-aptámeros (tabla anaranjada) y los valores de acoplamiento molecular y calidad de acoplamiento (tabla azul).

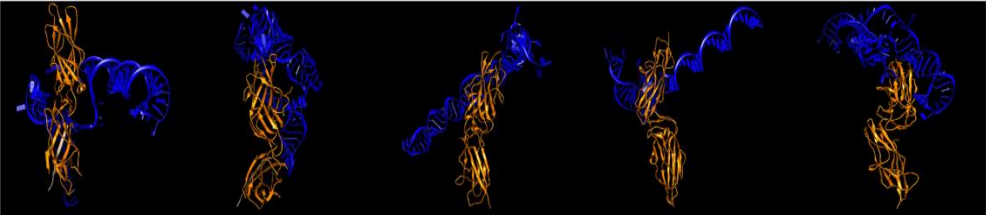
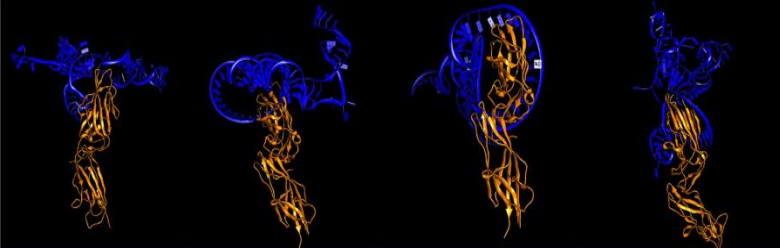
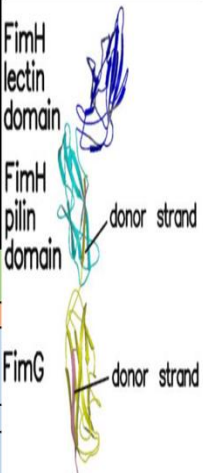
					
FimH/aptámeros seleccionados	Hp_AlpA_82	Hp_AlpB_11	Hp_BabA_20	Hp_BabB_64	Hp_SabA_71
RPiSeq: SVM/RF	0.8/0.5	0.9/0.6	0.69/0.46	0.84/0.55	0.75/0.48
H Puntuación de acoplamiento (Kcal/mol)	-309.76	-313.91	-12.204	-287.34	-17.38
Puntuación LG	6.148	6.148	6.148	6.148	6.148
Puntuación MaxSub	0.276	0.124	0.319	0.271	0.425
					
FimH/aptámeros seleccionados	Hp_LabA_24	Hp_OipA_92	Hp_HopQ_73	Hp_HopZ_21	
RPiSeq: SVM/RF	0.73/0.38	0.7/0.4	0.91/0.57	0.93/0.62	
Puntuación de acoplamiento (Kcal/mol)	-14.267	-12.114	-317.84	-306.02	
Puntuación LG	6.148	6.148	6.148	6.148	
Puntuación MaxSub	0.382	0.530	0.619	0.580	

Tabla 10. Control de especificidad. Adhesina FimH (anaranjado) de *E. coli* acoplada molecularmente con cada uno de los aptámeros seleccionados (azul) para cada adhesina *Hop* de *H. pylori*. Se muestran los valores obtenidos para RPiSeq (tabla anaranjada) y HDOOCK (tabla azul).

Especificidad, selectividad y afinidad de los aptámeros seleccionados mediante su acoplamiento molecular con el dominio de adhesión de las adhesinas mutadas

Fueron seleccionados al menos seis residuos de aminoácidos que se ubicaran dentro del área de interfase aptámero-adhesina (tabla 11) y que estuvieran conservados por arriba del 70% en los MSA's (figuras 23-32) para mutarlos por glicinas.

Estas mutaciones se llevaron a cabo en las secuencias de las adhesinas de la cepa de referencia de *H. pylori*: *campylobacter pylori*, Marshall., *et al.* Goodwin., *et al.* ATCC700824, un aislado geográfico de Reino Unido (ATCC, 2021) que utilizamos como una cepa representante del estado actual de la distribución geográfica de *H. pylori* en el continente Americano (tabla 12).

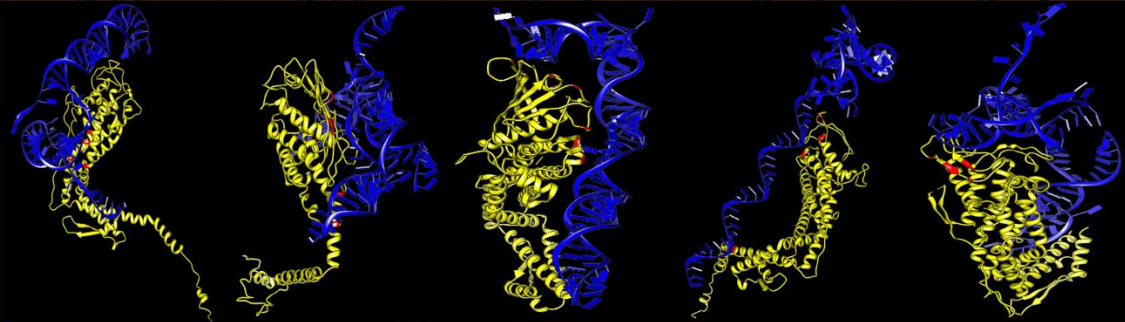
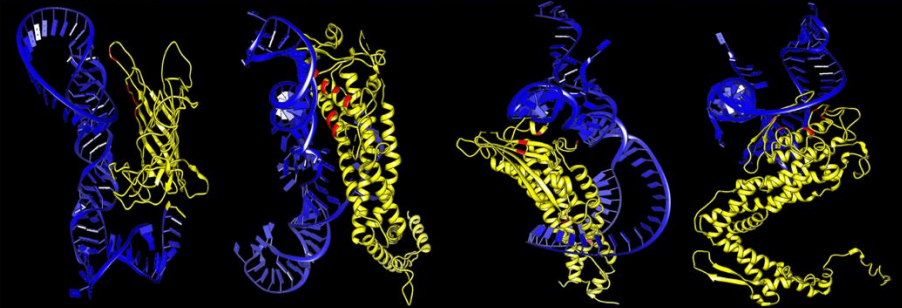
Mutaciones por glicina en el área de interfaz aptámero-adhesina				
AlpA	AlpB	BabA	BabB	LabA
Hp_AlpA_82	Hp_AlpB_11	Hp_BabA_20	Hp_BabB_64	Hp_LabA_24
				
Residuos de aminoácidos mutados por glicina				
T152,I153,Y155, Y156,Q270,S394	L110,I111,Q179, N180,T232,A283	C155,N172,T209, D216,T252,S257	K102,H170,T144, W146,Y292,H436	N137,F143,T143, N145, T155, I156
OipA	SabA	HopQ	HopZ	
Hp_OipA_92	Hp_SabA_71	Hp_HopQ_73	Hp_HopZ_21	
				
Residuos de aminoácidos mutados por glicina				
Y160,I200,F202, L203,N279,L289	Q83,V85,Q92, A81,N102, N302	W123,F158,I196, N388,S389,T419	V232,T240,T293, T309,S378,Y396	

Tabla 11. **Mutaciones por glicina en la interfaz aptámero-adhesina.** Las adhesinas (amarillo) muestran las mutaciones (rojo) dentro del área de contacto con el aptámero seleccionado (azul). Las posiciones de los residuos de aminoácidos mutados se muestran en la parte inferior de cada acoplamiento molecular.

Secuencia	ID de proteína en UniProt	Mutaciones de residuos de aminoácidos por glicinas
HopC (AlpA)	A0A6I4BYF9_HELPX	T152,I153, Y155, Y156, Q270, S394
HopB (AlpB)	A0A7K1N810_HELPX	L110, I111, Q179, N180, T232, A283
HopS (BabA)	A0A6N3Z8W5_HELPX	C155, N172, T209, D216, T252, S257
HopT (BabB)	A0A6C0Z185_HELPX	K102, H 170, T144, W146, Y292, H436
HopP (SabA)	A0A1Q2QJX8_HELPX	Q83, V85, Q92, A81, N102, N302
HopD (LabA)	A0A6I4C498_HELPX	N137, F143, T143, N145, T155, I156
HopH (OipA)	A0A6C0Z382_HELPX	Y160, I200, F202, L203, N279, L289
HopQ	A0A7K1MUH5_HELPX	W123, F158, I196, N388, S389, T419
HopZ	Q9S3I7_HELPX	V232, T240, T293, T309, S378, Y396

Tabla 12. **ID de proteína en UniProt y residuos de aminoácidos que fueron mutados.** Los residuos de aminoácidos mutados están conservados por arriba del 70% en el MSA y que se encuentran en el área de interfaz adhesina/aptámero seleccionado.

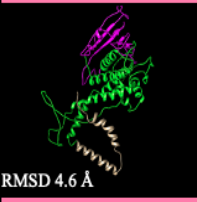
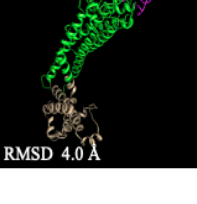
AlpA mutada modelada por homología con BabA con un 39.02% de ID			
 RMSD 4.5 Å	I-TASSER	-1.72	
	ERRAT	81.81%	
	Verify 3D	63.30 %	
	PROCHECK	97.3%	-0.46
Alp B mutada modelada <i>ab initio</i>			
 RMSD 4.6 Å	I-TASSER	-0.94	
	ERRAT	75.75%	
	Verify 3D	65.44%	
	PROCHECK	96.6%	-0.33
BabA mutada modelada por homología con BabA con un 98.46% de ID			
 RMSD 4.3 Å	I-TASSER	-1.46	
	ERRAT	65.98%	
	Verify 3D	84.41%	
	PROCHECK	95.7%	-0.30
BabB mutada modelado por homología con LabA con un 55.11% de ID			
 RMSD 4.1 Å	I-TASSER	-1.82	
	ERRAT	76.12%	
	Verify 3D	75.50%	
	PROCHECK	96.6%	-0.49
SabA mutada modelada por homología con HopQ con un 81.35% de ID			
 RMSD 4.2 Å	I-TASSER	-2.08	
	ERRAT	90.67%	
	Verify 3D	75.59%	
	PROCHECK	98.2%	-0.45
LabA mutada modelada por homología con LabA con un 74.84% de ID			
 RMSD 4.0 Å	I-TASSER	-1.97	
	ERRAT	91.06%	
	Verify 3D	80.63%	
	PROCHECK	98.9%	-0.40

Tabla 13 A. **Modelado de las adhesinas mutadas AlpA, AlpB, BabA, BabB, SabA y LabA.** Estructura 3D de referencia (BabA) y las adhesinas modeladas realtando la región de mango (café), cabeza (verde) y corona (magenta). Servidores de evaluación estereoquímica de los modelados: I-TASSER (Factor de confianza) [-5 a 2] y una RMSD [$\leq 5\text{\AA}$], ERRAT (Factor de calidad) [$> 60\%$], Verify3D (residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2.) [$> 50\%$], PROCHECK (residuos de aminoácidos ubicados en regiones favorables [$> 90\%$]/factor G [≥ -0.50]). ***Anexo 3. Gráficos de calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas.**

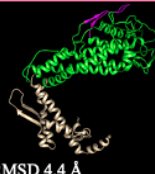
OipA mutada modelada por homología con OipA con un 98.05% de ID			
 RMSD 2.9 Å	I-TASSER	-4.12	
	ERRAT	59.23%	
	Verify 3D	67.53%	
	PROCHECK	94.6%	-0.47
HopQ mutada modelada por homología con HopQ con un 98.89% de ID			
 RMSD 4.3 Å	I-TASSER	-1.92	
	ERRAT	86.99%	
	Verify 3D	68.09%	
	PROCHECK	98.1%	-0.50
HopZ modelada por homología con HopZ con un 99.10% de ID			
 RMSD 4.4 Å	I-TASSER	-1.72	
	ERRAT	77.69%	
	Verify 3D	81.53%	
	PROCHECK	96.6%	-0.47

Tabla 13 B. **Modelado de las adhesinas mutadas OipA, HopQ y HopZ.** Estructura 3D de referencia (BabA) y las adhesinas modeladas realtando la región de mango (café), cabeza (verde) y corona (magenta). Servidores de evaluación estereoquímica de los modelados: I-TASSER (Factor de confianza) [-5 a 2] y una RMSD [$\leq 5\text{\AA}$], ERRAT (Factor de calidad) [$>60\%$], Verify3D (residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2.) [$>50\%$], PROCHECK (residuos de aminoácidos ubicados en regiones favorables [$>90\%$]/factor G [≥ -0.50]). ***Anexo 3. Gráficos de calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas.**

Adhesina mutada/aptámero seleccionado	HopB (AlpB)	HopC (AlpA)	HopD (LabA)	HopH (OipA)
Docking Score	-8.652	-7.439	-3.817	-13.429
LG score	3.518	1.780	1.561	2.076
MaxSub score	0.641	0.187	0.382	0.294

HopS (BabA)	HopT (BabB)	HopP (SabA)	HopQ	HopZ
-7.753	-2.042	-3.430	-3.849	-5.736
2.72	3.651	2.411	4.097	1.608
0.425	0.267	0.425	0.487	0.580

Tabla 14. **Acoplamiento molecular de las adhesinas mutadas de la familia *Hop* de *H. pylori* con su aptámero seleccionado.** Al mutar las adhesinas, el área de interfaz de los aptámeros seleccionados (azul) ha perdido su especificidad por la región de cabeza (verde) y corona (magenta) de acuerdo con las bajas puntuaciones de docking. Las estructuras del acoplamiento molecular se encuentran dentro de los parámetros de calidad por sus puntuaciones LG (anaranjado) y MaxSub (azul) de 1.5 a 5.0 o más y 0.1 a 0.8 o más, respectivamente.

Discusión

Las estructuras 3D del dominio de adhesión de las adhesinas HopD (LabA), HopP (SabA), HopS (BabA) y HopQ de *H. pylori* han mostrado una homología estructural de mango-cabeza-corona donde predominan las hélices α conformadas por la región N-terminal (residuos 1 al 400) (Pang, S. S., *et al.*, 2014; Hage, N., *et al.*, 2015; Moonens, K., *et al.*, 2017; Paraskevopoulou, V. *et al.*, 2021, Javaheri, A. *et al.*, 2016; Bonsor, D. A., *et al.*, 2018; Paraskevopoulou, V. *et al.*, 2020; Rossez, Y., *et al.*, 2014). De acuerdo con la arquitectura del exodominio α -hélice reportada por Coppens y col. para las adhesinas de la familia *Hop* (Coppens, F., *et al.*, 2018). Por esta razón, la relación biológica entre las secuencias, su función y estructura (Nute, M., *et al.*, 2019; Procter, J., *et al.*, 2021), es un objeto de estudio en los MSA's del presente trabajo de investigación, donde se puede observar que existen grandes regiones de homología por su identidad de secuencia mayor al 30 % (Chen, T., *et al.*, 2021) conservadas por arriba del 70%, según el código de colores (Procter, J., *et al.*, 2021), en el extremo N-terminal que codifica para la estructura de mango-cabeza-corona entre las adhesinas de distintas cepas de *H. pylori* (figuras 23-32), denotando que la función de adhesión está relacionada no solo con la conservación de residuos de aminoácidos en la secuencia de las adhesinas, sino también con su homología estructural.

Las adhesinas más caracterizadas son BabA y SabA por su asociación con la inflamación crónica en el desarrollo de cáncer de estómago. Los MSA's solo de la estructura de corona de la adhesina BabA de 21 cepas de *H. pylori* muestra la conservación de residuos de aminoácidos de las posiciones 245 a la 253, y de manera particular los residuos de aminoácidos C189, G191, N194, N206, D233, S244 y T246 implicados en la interacción con su receptor (antígenos de Lewis^b) en la célula huésped (Hage, N., *et al.*, 2015). De acuerdo con estos resultados, en nuestro MSA de las 39 secuencias para la adhesina BabA registradas en UniProt, podemos observar una homología en su secuencia mayor al 30 % (Chen, T., *et al.*, 2021) con una conservación mayor al 80% de residuos de aminoácidos de las posiciones 1 a la 217 y en menor porcentaje pero mayor al 50% (Procter, J., *et al.*, 2021), la conservación de residuos de aminoácidos de las posiciones 218 a 400 de su secuencia N-terminal que da lugar al exodominio de adhesión en las adhesinas de la familia *Hop* (figura 23).

En otro estudio, se llevó a cabo un MSA de 33 secuencias de SabA y 41 de BabB de varias cepas de *H. pylori* donde se observó la conservación de cisteínas en las posiciones Cys-135/Cys -141 y Cys-173/Cys-178 espaciadas entre cuatro y cinco residuos de aminoácidos, que dan lugar a la formación de puentes disulfuros importantes en la formación de la estructura del exodominio de adhesión, lo que sugiere estructuras funcionalmente conservadas (Pang, S. *et al.*, 2014). Acorde con lo anterior, el MSA de las 2,282 secuencias de la adhesina SabA observamos además, una homología mayor al 30% (Chen, T., *et al.*, 2021) en regiones de aminoácidos conservadas por arriba del 80% (Procter, J., *et al.*, 2021) en las posiciones 1 al 220 predominantemente del extremo N-terminal (figura 24) que dan lugar a la formación del exodominio de adhesión de mango-cabeza en SabA involucrado en la interacción con su receptor (antígeno de Lewis^x) en las células epiteliales gástricas. En este sentido, tanto BabA como SabA muestran una alta conservación de residuos de aminoácidos en su secuencia correspondiente al extremo N-terminal que da lugar al exodominio de adhesión.

No obstante, en este primer objetivo de nuestro trabajo de investigación, estamos reportando por primera vez una homología mayor al 30% (Chen, T., *et al.*, 2021) con una conservación mayor al 70% (Procter, J., *et al.*, 2021) de regiones de residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de las adhesinas AlpA, AlpB, BabB, LabA, OipA, HopQ y HopZ que da lugar a la estructura de mango-cabeza-corona en donde se ubica el sitio de adhesión característico de las adhesinas de la familia *Hop* ya cristalizadas, lo que nos proporciona información valiosa sobre la relación de las secuencias con su función biológica de adhesión y la estructura de mango-cabeza-corona a lo largo del tiempo, según los registros de depósito de secuencias en GenBank.

Aunque los genes que codifican las proteínas de la membrana externa (OMP) parecen evolucionar más rápido que los genes de otras categorías funcionales, lo que sugiere una adaptación al huésped (Ailloud, F., *et al.*, 2019). La conservación estructural del exodominio de adhesión, confiere una gran ventaja para los aptámeros que se diseñaron, ya que se acoplan molecularmente en su blanco por la estructura tridimensional definida a la que dan lugar (Yu, W., & MacKerell, A. 2017), es decir, que la conservación de la estructura de mango-cabeza-corona del exodominio de adhesión en cada adhesina es un blanco potencial de unión con el aptámero que se puede predecir inhibirá la adhesión bacteriana.

Contrastando los resultados de conservación con las adhesinas de la familia *Hop* modeladas, se observa la estructura del dominio de mango-cabeza-corona ya sea modeladas por el método *ab initio* de AlpA y AlpB (tabla 3) o por homología con una identidad de secuencia con BabA del 54.84% para BabB y con un 41.25% para HopZ (tabla 4) con otras adhesinas de *H. pylori* ya cristalizadas, excepto en el modelado *Ab initio* de OipA que muestra una estructura de porina (tabla 3), característica de la familia *Hop* (Tiwari, A., *et al.*, 2020; Alm, R. A., *et al.*, 2000). Esto manifiesta la estrecha relación de la conservación de la secuencia N-terminal de las adhesinas en los MSA's, la función y homología estructural antes mencionada. Además, todos los modelados de las adhesinas de la familia *Hop*, fueron validados estereoquímicamente, denotando puntuaciones dentro de los rangos de confianza de los servidores I-TASSER, ERRAT, Verify3D y PROCHECK, lo que resalta una buena calidad estructural de cada uno de los modelados moleculares (Tabla 3 y 4, Anexo 1), para utilizarlos como objetivos de calidad, según nuestro segundo objetivo de investigación y así probar a los aptámeros seleccionados (Zheng, W., *et al.*, 2019; Devi, A., & Chaitanya, N. 2021; Aprahamian, M. L., & Lindert, S., 2019), como se ha reportado en el modelamiento molecular I-TASSER para obtener estructuras de alta calidad para proteínas de la membrana externa de *E. coli* como NfrA (receptor del bacteriófago N4) y FlgH (proteína del anillo L flagelar) modeladas por el método de homología y las proteínas BamA (subunidad central de BAM que contiene el barril β) y LptD (Proteína de ensamblaje LPS) modeladas *ab initio* (Horne, J.E., *et al.*, 2020) y en la reciente validación estereoquímica del modelado molecular de la proteína S del SARS-CoV-2 con valores similares a los que obtuvimos en nuestros resultados (Devi, A. & Chaitanya, N., 2021).

Una forma de complementar la metodología de la asignación de aptámeros *in silico*, es el análisis tridimensional de los objetivos moleculares como se lleva a cabo en la asignación de fármacos asistido por computadora, para identificar sitios clave e interacciones que son importantes para sus respectivas funciones biológicas y así poder establecer su relación estructura-actividad (Yu, W., & MacKerell, A. 2017).

En nuestros resultados, todas las adhesinas mostraron parches electrostáticos positivos que denotan un sitio clave de interacción de las adhesinas con secuencias de ARN, en otras palabras, la superficie de los dominos de adhesión contiene una distribución de cargas positivas en la región de mango-cabeza-corona a donde potencialmente se predice que el aptámero de ARN diseñado se unirá. No obstante, para

ser más específicos, se evaluó la probabilidad de interacción entre cada una de las adhesinas con su aptámero seleccionado mediante los clasificadores SVM y RF, corroborando con el parche electrostático, una predicción de interacción positiva (tabla 6, Anexo 2: figuras S6-S15, panel A) (Shazman, S., *et al.*, 2007).

Además, se evaluó la estabilidad termodinámica y estructura de los aptámeros seleccionados para cada adhesina. La estructura secundaria de energía libre mínima que se obtuvo a partir de la secuencia de ribonucleótidos en color rojo denota que la probabilidad de interacción entre pares de base es 1 (Figuras suplementarias S6-S15, panel B) (Gruber, A. *et al.*, 2008), es decir, una buena medida de confiabilidad donde los aptámeros seleccionados tienen la capacidad con base en sus secuencia de formar una estructura tridimensional definida conformada por tallos-bucles, horquillas, protuberancias, pseudonudos y G-cuádruplex (Ospina, J. 2020). En conjunto con los parámetros de energía termodinámica del ensamblaje, la frecuencia de estructura de energía libre (MFE) y la diversidad del conjunto, todos los aptámeros se posicionaron dentro de las medidas de estabilidad termodinámica y estructura (tabla 5). En apoyo a estos resultados, se muestra el diagrama de montaña de cada aptámero, la estructura MFE, la estructura del centroide, las probabilidades de los pares, y el diagrama de entropía, que brinda información de confiabilidad en términos de probabilidad de entropía posicional (Figuras suplementarias S6-S15, panel B) (Gruber, A. *et al.*, 2008), que muestra parámetros termodinámicos similares al aptámero que funciona como biosensor sensible a concentraciones ambientales de hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), un químico que contamina el suelo y agua (Mayo, M. L., *et al.*, 2020), es por esto que la confiabilidad termodinámica y estructural de los aptámeros seleccionados para las adhesinas de nuestro trabajo, permitió continuar con el estudio, obteniendo su estructura tridimensional (3D) mediante el modelamiento computacional basado en el conocimiento del servidor RNAComposer que utiliza la secuencia de ARN y la topología de estructura 2D en notación de paréntesis como entrada para la predicción de estructura 3D a partir de la salida del servidor RNAfold vienna (Anexo 4).

Una comprensión crítica de la función del aptámero implica conocer su estructura 3D ya que estos pueden reconocer y unirse a grandes superficies en su blanco molecular con gran afinidad mediante enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, interacciones de van der Waals y apilamiento aromático (Ospina, J. 2020). En la asignación de aptámeros *in silico* y el diseño de fármacos asistido por computadora, el

acoplamiento molecular es un método ampliamente utilizado que analiza la conformación y la orientación de las moléculas en el sitio de unión de un objetivo molecular a partir de las bases de datos experimentales (Torres, P., *et al.*, 2019).

En nuestro trabajo de investigación, el acoplamiento molecular de las adhesinas de la familia *Hop* con su aptámero seleccionado, se observaron valores de puntuación LG y MaxSub, así como de acoplamiento molecular que se encuentran dentro de los parámetros de calidad de las estructuras y confiabilidad de acoplamiento respectivamente (tabla 7) (Yan Y., *et al.*, 2020), concordando con las predicciones de interacción adhesina-aptámero por su parche electrostático con características hidrofóbicas, similares al sitio de unión al ribosoma bacteriano del Factor desencadenante (TF) de la chaperona de *E. coli* predicho por el servidor PatchFinder (Martinez-Hackert, E., & Hendrickson, W., 2009). De igual manera, la predicción de interacción positiva de las adhesinas con sus aptámeros seleccionados mediante los clasificadores SVM y RF concordaron con el acoplamiento molecular, las puntuaciones de los clasificadores muestran puntuaciones similares a las predichas y probadas experimentalmente para la unión de cuatro RNAs no codificantes intergénicos largos (LincRNAs) con BRAC1 y BRAC2 (Ding, X., *et al.*, 2014).

Parte de la metodología SELEX para el descubrimiento de aptámeros que se unen a su molécula blanco, es importante la selección de alguno que no reconozca los blancos de estudio como control de unión negativa (Kim, T. & Lee, S. 2021; Gong, S., *et al.*, 2017). En el presente trabajo, se seleccionó al aptámero Hp_Control_Negativo_Hop, el cual mostró confiabilidad termodinámica y estructural (tabla 5), sin embargo, los valores de acoplamiento molecular hacia la región de cabeza-corona de las adhesinas están por debajo del umbral considerado para un acoplamiento molecular positivo, por lo tanto es un buen control de unión negativa hacia el objetivo seleccionado (tabla 8, Anexo 2: Figura S15) (Yan Y, *et al.*, 2020).

Otro de los controles comúnmente utilizados en el proceso de SELEX, es la elección de una molécula blanco con una función similar del mismo microorganismo de estudio, así como una molécula blanco con la misma función de otro microorganismo que se encuentre dentro del mismo nicho ecológico que *H. pylori* (Kim, T. & Lee, S. 2021). En nuestro trabajo, utilizamos la adhesina HpaA de *H. pylori*, una proteína de la membrana externa de la bacteria que no pertenece a la familia *Hop* (Volland, P., *et al.*, 2003) y la adhesina de FimH de *E. coli* (Le Trong, I., *et al.*, 2010) para probarlas contra

los aptámeros seleccionados, esto para demostrar que el aptámero no reconoce de forma cruzada ninguna otra molécula presente en la muestra, ni en el mismo organismo de estudio (Kalra, P., *et al.*, 2018).

De acuerdo con la metodología de SELEX aplicada *in silico*, el acoplamiento molecular de la adhesina HpaA de *H. pylori* con cada uno de los aptámeros seleccionados para las adhesinas de la familia *Hop*, mostró valores LG y Max sub que muestran una buena calidad de las estructuras utilizadas, sin embargo, las puntuaciones de acoplamiento molecular están por debajo de los parámetros para la predicción de unión, acorde con las predicciones de interacción de HpaA con los aptámeros seleccionados por los clasificadores SVM y RF (tabla 9) (Shazman, S., *et al.*, 2007; Yan Y, *et al.*, 2020).

En el control de reactividad cruzada, es decir, al probar los aptámeros seleccionados contra la adhesina de otro microorganismo que se encuentre dentro de la muestra, FimH de *E. coli*, encontramos que todas las estructuras utilizadas se encontraban dentro de los parámetros de calidad dados por los servidores LG y MaxSub. Los clasificadores SVM y RF mostraron predicciones de interacción negativa entre los aptámeros seleccionados y la adhesina FimH, excepto con los aptámeros: Hp_Alpa_82, Hp_Alpb_11, Hp_BabB_64, Hp_HopQ_73 y Hp_HopZ_21 consistente con la puntuación de acoplamiento molecular mayor -100 Kcal/mol. Al analizar el sitio de unión de estos aptámeros con la adhesina FimH, observamos que se unen al dominio de lectina de la adhesina, este dominio es transmembranal y por lo tanto no se encuentra disponible en *E. coli* para que el aptámero pueda unirse a ella, por esta razón, aunque los clasificadores y la puntuación de acoplamiento mostraron una interacción positiva para algunos, no existe la disponibilidad del dominio de lectina en FimH para que el aptámero pueda unirse a ella (tabla 10) (Le Trong, I., *et al.*, 2010), de acuerdo con los estándares de la evaluación crítica de la predicción de interacciones (CAPRI) para HDOCK (Yan, Y., *et al.*, 2017; Yan, Y., *et al.*, 2020). Por esta razón, los controles utilizados muestran que los aptámeros seleccionados no son selectivos para otras adhesinas como HpaA y FimH, es decir, son específicos para la región de cabeza-corona de cada una de las adhesinas de la familia *Hop*, por lo que dichos controles son funcionales para este trabajo.

En la tubería clásica de asignación de aptámeros *in silico*, uno de los objetivos se muta para observar la selectividad de los aptámeros seleccionados (Chen, Z., *et al.*, 2021). Además, en la asignación de fármacos por métodos computacionales, esto puede evaluarse mediante el acoplamiento molecular (Torres, P., *et al.*, 2019).

Al mutar por glicina, simultáneamente 6 residuos de aminoácidos altamente conservados (figuras 23-32: triángulos azules), ubicados en el área de interfaz del acoplamiento molecular (tabla 11), modelar las adhesinas utilizando las secuencias de la cepa de referencia ATTCC 26695 (tabla 12) y validar estereoquímicamente las adhesinas (Zheng, W., *et al*, 2019; Devi, A., & Chaitanya, N. 2021), observamos curiosamente que las adhesinas mutadas: AlpA, BabA, BabB SabA, OipA, LabA, HopQ y HopZ mostraron una identidad de secuencia mayor al 30% con adhesinas de la familia *Hop*, conservando la estructura de mango-cabeza-corona y porina, característico de dicha familia. Sin embargo, la adhesina AlpB que se modelo *ab initio*, mostró también la arquitectura del exodominio de adhesión, y al llevar a cabo la validación estereoquímica, todas ellas se encontraban dentro de los parámetros de confianza de calidad estereoquímica (tabla 13 A y B, anexo 3: figura S16-S32).

Al evaluar su selectividad, especificidad y afinidad, en el acoplamiento molecular se puede observar que los aptámeros seleccionados para cada adhesina al mutarla en el área de interfaz, han perdido su especificidad y selectividad por el exodominio de adhesión: mango-cabeza-corona, así como su afinidad dada por los valores bajos de acoplamiento molecular (tabla 14) (Yan Y, *et al.*, 2020). Esto indica que los residuos de aminoácidos que mutamos por glicinas, tienen un papel importante en la interacción aptámero-adhesina. Como son residuos altamente conservados, es decir por arriba del 70% de conservación en las secuencias depositadas de las adhesinas desde 1991 hasta 2019, la probabilidad de que muten de forma natural con el tiempo es mínima, es decir la tasa de cambio de estos residuos de aminoácidos es baja (Robinson, S., *et al.*, 2014), por lo que cada uno de los aptámero seleccionados podrán unirse a las adhesinas de la familia *Hop* a pesar de que estas evolucionen con respecto a su huésped.

Los métodos basados en estructuras para el diseño de fármacos asistido por computadora son los más utilizados. El aprendizaje automático/profundo ha resultado exitoso en la predicción de unión entre objetivos (adhesinas) y ligandos (aptámeros) en el descubrimiento de aptámeros, lo que ofrece un enfoque sólido y preciso para la selección de aptámeros *in silico* (Chen, Z., 2021).

No obstante, esta metodología *in silico*, ha demostrado su efectividad en otros estudios probados experimentalmente como el aptámero diseñado para el receptor de estrógeno alfa (Ahirwar, R., *et al.*, 2016), y más recientemente en el diseño *in silico* de una vacuna multiepítipo contra las infecciones por coronavirus humano (Devi, A., &

Chaitanya, N. 2021), en los cuales, utilizaron los mismos servidores que en nuestro trabajo de investigación.

Es importante destacar que las predicciones *in silico* deben confirmarse *in vitro* dando la oportunidad de aumentar la afinidad de los aptámeros en relación con sus objetivos, así como asegurar la estabilización de las conformaciones requeridas (Buglak, A., et al., 2020), y una de las ventajas que confiere el modelado molecular es que permite diseñar aptámeros con afinidad mejorada por el objetivo e identificar patrones estructurales responsables de la interacción aptámero/objetivo (Buglak, A., et al., 2020). Así como el enfoque de este proyecto, que toma la información del exodominio de adhesión de las adhesinas de la familia *Hop*.

No lejos de la realidad, la inteligencia artificial se ha utilizado en mayor proporción en los últimos años; se han propuesto el uso de servidores que brindan información estructural como RNAfold, RNAComposer y acoplamiento molecular de HDock, utilizados en la selección de aptámeros para proteínas por la información estructural que brindan y han demostrado ser aptos para la selección de aptámeros *in silico* al probarse experimentalmente en otros trabajos de investigación que incluyen desde el cáncer de mama hasta la infección por SARS-CoV-2 (Ding, X., et al., 2014; Rybarczyk, A., et al., 2015; Xu, X., & Chen, S. J. 2018; Calcagnile, M., et al., 2021; Buglak, A., et al., 2020). Incluso, el uso de modelados moleculares de proteínas que implica una metodología *Ab initio*, ha mostrado ser eficiente como los modelados por homología, como son las OMP's modeladas para *E. coli* con ambos métodos (Horne, J.E., et al., 2020). Que como se propone en este trabajo, el uso de las secuencias de las adhesinas de las cepas de *H. pylori* de los principales grupos de poblaciones geográficas y de manera particular de la cepa certificada *H. pylori* (*Campylobacter pylori*) ATCC 26695 (subpoblación hspAmerind) (Falush, D., et al., 2003), permiten que el alcance de nuestra investigación sea competente para estudios posteriores que demarcan la distribución geográfica de *H. pylori* en América con información actualizada. Además, el uso del conjunto de herramientas bioinformáticas validadas experimentalmente en nuestro trabajo pueden ofrecer una predicción potencial para la asignación y selección de aptámeros *in silico* con mayor precisión y confiabilidad para su uso posterior en ensayos *in vitro* que permitan evaluar cómo se afecta la adhesión del patógeno al epitelio gástrico y redundar en una nueva alternativa terapéutica ante la resistencia de *H. pylori* a los fármacos establecidos para su erradicación.

1. La alta conservación de residuos de aminoácidos observada en el extremo N-terminal de las adhesinas de la familia *Hop* en los alineamientos de secuencias múltiple, muestra claramente la estrecha relación entre la conservación de las secuencias y su función, así como una baja tasa de cambio de los residuos de aminoácidos mutados.
2. Los modelamientos moleculares de las adhesinas validadas estereoquímicamente, muestran el exodominio de adhesión conservado con estructura mango-cabeza y mango-cabeza-corona tal como en las adhesinas de las cuales se cuenta con su estructura cristalizada. Aunque OipA no presentó la estructura del exodominio conservado, muestra una estructura de porina, característica de las adhesinas de la familia *Hop*.
3. El acoplamiento molecular de cada uno de los nueve aptámeros seleccionados muestra no solo la selectividad de los aptámeros por el exodominio de adhesión con respecto de la adhesina HpaA de *H. pylori* y la adhesina FimH de *E. coli*, sino también su especificidad solo por la región de cabeza-corona donde se ubica el sitio de adhesión de las adhesinas de la familia *Hop* de acuerdo con los controles utilizados y consistente con los predictores de interacción y el parche electrostático.
4. Las mutaciones por glicina de residuos de aminoácidos altamente conservados en el área de interfaz de las adhesinas con el aptámero seleccionado, mostró la pérdida de la selectividad, especificidad y afinidad por el exodominio de adhesión de las nueve adhesinas de la familia *Hop* de *H. pylori*.

La complementación de los métodos computacionales de la asignación de aptámeros *in silico* y la asignación y descubrimiento de fármacos utilizados en el presente trabajo de investigación, han sido exitosos para la selección *in silico* de los nueve aptámeros selectivos y específicos para el exodominio de adhesión de cada una de las adhesinas de la familia *Hop* de *H. pylori* ya que considera el análisis estructural no solo de los aptámeros sino también de las adhesinas; proponiendo su función como un inhibidor específico del reconocimiento de las adhesinas por su receptor en la célula huésped, lo que potencialmente estaría inhibiendo la adhesión bacteriana, redundando en una nueva alternativa de tratamiento ante la resistencia a los antibióticos de tratamiento para *H. pylori*.

- Realización de dinámica molecular para conocer con precisión la interacción fisicoquímica de los aptámeros con las adhesinas.
- Llevar a cabo estudios de inhibición de la adhesión bacteriana.
- Realizar estudios de competencia aptámero-adhesina-receptor del huésped.
- Los nueve aptámeros pueden probarse simultáneamente o de manera individual en la inhibición de la adhesión de *H. pylori* in vitro.
- A futuro, se podrían probar en conjunto con los fármacos establecidos para la erradicación de la infección *H. pylori*
- Además, pueden utilizarse a manera de microchip, para identificar cepas de *H. pylori* identificadas como agente etiológico del cáncer de estómago para proporcionar un tratamiento personalizado al paciente.

1. Abadi A. (2017). Strategies used by *helicobacter pylori* to establish persistent infection. World journal of gastroenterology, 23(16), 2870–2882. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i16.2870>
2. Ahirwar, R., Vellarikkal, S. K., Sett, A., Sivasubbu, S., Scaria, V., Bora, U., Borthakur, B. B., Kataki, A. C., Sharma, J. D., & Nahar, P. (2016). Aptamer-Assisted Detection of the Altered Expression of Estrogen Receptor Alpha in Human Breast Cancer. *PloS one*, 11(4), e0153001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153001>
3. Allemailem, K. S., Almatroudi, A., Alsahli, M. A., Basfar, G. T., Alrumaihi, F., Rahmani, A. H., & Khan, A. A. (2020). Recent advances in understanding oligonucleotide aptamers and their applications as therapeutic agents. *3 Biotech*, 10(12), 551. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02546-1>
4. Alm, R. A., Bina, J., Andrews, B. M., Doig, P., Hancock, R. E., & Trust, T. J. (2000). Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infection and immunity*, 68(7), 4155–4168. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.4155-4168.2000>
5. Ansari, S., & Yamaoka, Y. (2019). *Helicobacter pylori* Virulence Factors Exploiting Gastric Colonization and its Pathogenicity. *Toxins*, 11(11), 677. <https://doi.org/10.3390/toxins11110677>
6. Aprahamian, M. L., & Lindert, S. (2019). Utility of Covalent Labeling Mass Spectrometry Data in Protein Structure Prediction with Rosetta. *Journal of chemical theory and computation*, 15(5), 3410–3424. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b00101>
7. ATCC, 2021 <https://www.atcc.org/products/700392> consultado 22 de abril de 2022 a las 15:10 hrs.
8. Bachtiar, B. M., Srisawat, C., & Bachtiar, E. W. (2019). RNA aptamers selected against yeast cells inhibit *Candida albicans* biofilm formation in vitro. *MicrobiologyOpen*, 8(8), e00812. <https://doi.org/10.1002/mbo3.812>
9. Baj, J., Forma, A., Sitarz, M., Portincasa, P., Garruti, G., Krasowska, D., & Maciejewski, R. (2020). *Helicobacter pylori* Virulence Factors-Mechanisms of

- Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells*, 10(1), 27.
<https://doi.org/10.3390/cells10010027>
10. Baltoumas, F. A., Zafeiropoulou, S., Karatzas, E., Koutrouli, M., Thanati, F., Voutsadaki, K., Gkonta, M., Hotova, J., Kasionis, I., Hatzis, P., & Pavlopoulos, G. A. (2021). Biomolecule and Bioentity Interaction Databases in Systems Biology: A Comprehensive Review. *Biomolecules*, 11(8), 1245.
<https://doi.org/10.3390/biom11081245>
 11. Bauwens, E., Joosten, M., Taganna, J., Rossi, M., Debraekeleer, A., Tay, A., Peters, F., Backert, S., Fox, J., Ducatelle, R., Remaut, H., Haesebrouck, F., & Smet, A. (2018). In silico proteomic and phylogenetic analysis of the outer membrane protein repertoire of gastric *Helicobacter* species. *Scientific reports*, 8(1), 15453.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-32476-1>
 12. Bonsor, D. A., Zhao, Q., Schmidinger, B., Weiss, E., Wang, J., Deredge, D., Beadenkopf, R., Dow, B., Fischer, W., Beckett, D., Wintrode, P. L., Haas, R., & Sundberg, E. J. (2018). The *Helicobacter pylori* adhesin protein HopQ exploits the dimer interface of human CEACAMs to facilitate translocation of the oncoprotein CagA. *The EMBO journal*, 37(13), e98664.
<https://doi.org/10.15252/emboj.201798664>
 13. Bosques-Padilla, F. J., Remes-Troche, J. M., González-Huezo, M. S., Pérez-Pérez, G., Torres-López, J., Abdo-Francis, J. M., Bielsa-Fernandez, M. V., Camargo, M. C., Esquivel-Ayanegui, F., Garza-González, E., Hernández-Guerrero, A. I., Herrera-Goepfert, R., Huerta-Iga, F. M., Leal-Herrera, Y., López-Colombo, A., Ortiz-Olvera, N. X., Riquelme-Pérez, A., Sampieri, C. L., Uscanga-Domínguez, L. F., & Velarde-Ruiz Velasco, J. A. (2018). The fourth Mexican consensus on *Helicobacter pylori*. IV consenso mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Revista de gastroenterologia de Mexico (English)*, 83(3), 325–341.
<https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.05.003>
 14. Buglak, A. A., Samokhvalov, A. V., Zherdev, A. V., & Dzantiev, B. B. (2020). Methods and Applications of In Silico Aptamer Design and Modeling. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8420.
<https://doi.org/10.3390/ijms21228420>
 15. Calcagnile, M., Forgez, P., Iannelli, A., Bucci, C., Alifano, M., & Alifano, P. (2021). Molecular docking simulation reveals ACE2 polymorphisms that may

- increase the affinity of ACE2 with the SARS-CoV-2 Spike protein. *Biochimie*, 180, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.11.004>
16. Chen, TR, Lo, CH, Juan, SH y Lo, WC (2021). La influencia de la homología del conjunto de datos y una estrategia de evaluación rigurosa en la predicción de la estructura secundaria de proteínas. *PloS uno* , 16 (7), e0254555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0254555>
 17. Chen, Z., Hu, L., Zhang, B. T., Lu, A., Wang, Y., Yu, Y., & Zhang, G. (2021). Artificial Intelligence in Aptamer-Target Binding Prediction. *International journal of molecular sciences*, 22(7), 3605. <https://doi.org/10.3390/ijms22073605>
 18. Coppens, F., Castaldo, G., Debraekeleer, A., Subedi, S., Moonens, K., Lo, A., & Remaut, H. (2018). Hop-family Helicobacter outer membrane adhesins form a novel class of Type 5-like secretion proteins with an interrupted β -barrel domain. *Molecular microbiology*, 110(1), 33–46. <https://doi.org/10.1111/mmi.14075>
 19. Cover, T. L., Lacy, D. B., & Ohi, M. D. (2020). The *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System. *Trends in microbiology*, 28(8), 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.02.004>
 20. Devi, A., & Chaitanya, N. (2021). *In silico* designing of multi-epitope vaccine construct against human coronavirus infections. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 39(18), 6903–6917. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1804460>
 21. Di Salvo, T. G., Guo, Y., Su, Y. R., Clark, T., Brittain, E., Absi, T., Maltais, S., & Hemnes, A. (2015). Right ventricular long noncoding RNA expression in human heart failure. *Pulmonary circulation*, 5(1), 135–161. <https://doi.org/10.1086/67972>
 22. Ding, X., Zhu, L., Ji, T., Zhang, X., Wang, F., Gan, S., Zhao, M., & Yang, H. (2014). Long intergenic non-coding RNAs (LincRNAs) identified by RNA-seq in breast cancer. *PloS one*, 9(8), e103270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103270>
 23. Ding S. Z. (2020). Global whole family based-*Helicobacter pylori* eradication strategy to prevent its related diseases and gastric cancer. *World journal of gastroenterology*, 26(10), 995–1004. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i10.995>
 24. Falush, D., Wirth, T., Linz, B., Pritchard, J. K., Stephens, M., Kidd, M., Blaser, M. J., Graham, D. Y., Vacher, S., Perez-Perez, G. I., Yamaoka, Y., Mégraud, F., Otto, K., Reichard, U., Katzowitsch, E., Wang, X., Achtman, M., & Suerbaum, S. (2003).

- Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5612), 1582–1585. <https://doi.org/10.1126/science.1080857>
25. Formento, M., Hernández, A. y Agustín Martínez Lozano. (2004). *Helicobacter pylori*: infección en la infancia. *OFFARM*. 23 (11): 104-107.
 26. GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> consultado el 22 de abril de 2022 a las 15:43 hrs.
 27. Gong, S., Wang, Y., Wang, Z., & Zhang, W. (2017). Computational Methods for Modeling Aptamers and Designing Riboswitches. *International journal of molecular sciences*, 18(11), 2442. <https://doi.org/10.3390/ijms18112442>
 28. Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), W70–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
 29. Hage, N., Howard, T., Phillips, C., Brassington, C., Overman, R., Debreczeni, J., Gellert, P., Stolnik, S., Winkler, G. S., & Falcone, F. H. (2015). Structural basis of Lewis(b) antigen binding by the *Helicobacter pylori* adhesin BabA. *Science advances*, 1(7), e1500315. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500315>
 30. Hasan, R., Rony, M., & Ahmed, R. (2021). In silico characterization and structural modeling of bacterial metalloprotease of family M4. *Journal, genetic engineering & biotechnology*, 19(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00105-y>
 31. Hooi, J., Lai, W. Y., Ng, W. K., Suen, M., Underwood, F. E., Tanyingoh, D., Malfertheiner, P., Graham, D. Y., Wong, V., Wu, J., Chan, F., Sung, J., Kaplan, G. G., & Ng, S. C. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153(2), 420–429. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>
 32. Horne, J. E., Brockwell, D. J., & Radford, S. E. (2020). Role of the lipid bilayer in outer membrane protein folding in Gram-negative bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 295(30), 10340–10367. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.011473>
 33. Javaheri, A., Kruse, T., Moonens, K., Mejías-Luque, R., Debraekeleer, A., Asche, C. I., Tegtmeyer, N., Kalali, B., Bach, N. C., Sieber, S. A., Hill, D. J., Königer, V., Hauck, C. R., Moskalenko, R., Haas, R., Busch, D. H., Klaile, E., Slevogt, H., Schmidt, A., Backert, S., ... Gerhard, M. (2016). *Helicobacter pylori* adhesin HopQ

- engages in a virulence-enhancing interaction with human CEACAMs. *Nature microbiology*, 2, 16189. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.189>
34. Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W. C., Bruno, J. G., & Sharma, T. K. (2018). Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Frontiers in molecular biosciences*, 5, 41. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00041>
 35. Kim, T. H., & Lee, S. W. (2021). Aptamers for Anti-Viral Therapeutics and Diagnostics. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4168. <https://doi.org/10.3390/ijms22084168>
 36. Kusters, J., Van Vliet, M. & Ernest J. Kuipers. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*. P. 449-490.
 37. Lara-Ramírez, E. E., Segura-Cabrera, A., Guo, X., Yu, G., García-Pérez, C. A., & Rodríguez-Pérez, M. A. (2011). New implications on genomic adaptation derived from the *Helicobacter pylori* genome comparison. *PloS one*, 6(2), e17300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017300>
 38. Lavadié-González, Carlos E., & Serrat-Díaz, Manuel de J., & Azcanio-Fuentes, Lisandra (2021). Homology modelling and in silico Structural characterization of lanosterol 14 α -demethylase from *Cryptococcus neoformans* var. *Grubii*. *Revista Cubana de Química*, 33(2), 198-226. [fecha de Consulta 9 de Marzo de 2022]. ISSN: 0258-5995. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443568186010>
 39. Le Trong, I., Aprikian, P., Kidd, B. A., Thomas, W. E., Sokurenko, E. V., & Stenkamp, R. E. (2010). Donor strand exchange and conformational changes during *E. coli* fimbrial formation. *Journal of structural biology*, 172(3), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.06.002>
 40. Mahtarin, R., Islam, S., Islam, M. J., Ullah, M. O., Ali, M. A., & Halim, M. A. (2020). Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 1–14. Advance online publication. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1861983>
 41. Matos, R., Amorim, I., Magalhães, A., Haesebrouck, F., Gärtner, F., & Reis, C. A. (2021). Adhesion of *Helicobacter* Species to the Human Gastric Mucosa: A Deep Look Into Glycans Role. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 656439. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.656439>

42. Martinez-Hackert, E., & Hendrickson, W. A. (2009). Promiscuous substrate recognition in folding and assembly activities of the trigger factor chaperone. *Cell*, 138(5), 923–934. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.044>
43. Matsuo, Y., Kido, Y., & Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins*, 9(3), 101. <https://doi.org/10.3390/toxins9030101>
44. Mayo, M. L., Eberly, J. O., Crocker, F. H., & Indest, K. J. (2020). Modeling a synthetic aptamer-based riboswitch biosensor sensitive to low hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) concentrations. *PloS one*, 15(11), e0241664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241664>
45. Messing, J., Thöle, C., Niehues, M., Shevtsova, A., Glocker, E., Borén, T., & Hensel, A. (2014). Antiadhesive properties of *Abelmoschus esculentus* (Okra) immature fruit extract against *Helicobacter pylori* adhesion. *PloS one*, 9(1), e84836. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084836>
46. Mishra, S., Kumar, S., Choudhuri, K., Longkumer, I., Koyyada, P., & Kharsyiemiong, E. T. (2021). Structural exploration with AlphaFold2-generated STAT3 α structure reveals selective elements in STAT3 α -GRIM-19 interactions involved in negative regulation. *Scientific reports*, 11(1), 23145. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01436-7>
47. Moonens, K., Gideonsson, P., Subedi, S., Bugaytsova, J., Romão, E., Mendez, M., Nordén, J., Fallah, M., Rakhimova, L., Shevtsova, A., Lahmann, M., Castaldo, G., Brännström, K., Coppens, F., Lo, A. W., Ny, T., Solnick, J. V., Vandenbussche, G., Oscarson, S., Hammarström, L., ... Remaut, H. (2016). Structural Insights into Polymorphic ABO Glycan Binding by *Helicobacter pylori*. *Cell host & microbe*, 19(1), 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.004>
48. Muppirala, U. K., Honavar, V. G., & Dobbs, D. (2011). Predicting RNA-protein interactions using only sequence information. *BMC bioinformatics*, 12, 489. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-489>
49. Nammi, D., Yarla, N. S., Chubarev, V. N., Tarasov, V. V., Barreto, G. E., Pasupulati, A., Aliev, G., & Neelapu, N. (2017). A Systematic In-silico Analysis of *Helicobacter pylori* Pathogenic Islands for Identification of Novel Drug Target Candidates. *Current genomics*, 18(5), 450–465. <https://doi.org/10.2174/1389202918666170705160615>

50. Ning, Y., Hu, J., & Lu, F. (2020). Aptamers used for biosensors and targeted therapy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 132, 110902. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110902>
51. Nute, M., Saleh, E., & Warnow, T. (2019). Evaluating Statistical Multiple Sequence Alignment in Comparison to Other Alignment Methods on Protein Data Sets. *Systematic biology*, 68(3), 396–411. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy068>
52. Organización Mundial de la Salud (OMS) <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (consultado: 25/10/2020 a las 17:30).
53. Ospina J. D. (2020). Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 40(Supl. 1), 148–165. <https://doi.org/10.7705/biomedica.4765>
54. Pan, Q., Luo, F., Liu, M., & Zhang, X. L. (2018). Oligonucleotide aptamers: promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *The Journal of infection*, 77(2), 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.04.007>
55. Pang, S. S., Nguyen, S. T., Perry, A. J., Day, C. J., Panjikar, S., Tiralongo, J., Whisstock, J. C., & Kwok, T. (2014). The three-dimensional structure of the extracellular adhesion domain of the sialic acid-binding adhesin SabA from *Helicobacter pylori*. *The Journal of biological chemistry*, 289(10), 6332–6340. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.513135>
56. Paraskevopoulou, V., Schimpl, M., Overman, R. C., Stolnik, S., Chen, Y., Nguyen, L., Winkler, G. S., Gellert, P., Klassen, J. S., & Falcone, F. H. (2021). Structural and binding characterization of the LacdiNAc-specific adhesin (LabA; HopD) exodomain from *Helicobacter pylori*. *Current research in structural biology*, 3, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.12.004>
57. Paraskevopoulou, V., Schimpl, M., Overman, R. C., Stolnik, S., Chen, Y., Nguyen, L., Winkler, G. S., Gellert, P., Klassen, J. S., & Falcone, F. H. (2020). Structural and binding characterization of the LacdiNAc-specific adhesin (LabA; HopD) exodomain from *Helicobacter pylori*. *Current research in structural biology*, 3, 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.12.004>

58. Pohl, D., Keller, P. M., Bordier, V., & Wagner, K. (2019). Review of current diagnostic methods and advances in *Helicobacter pylori* diagnostics in the era of next generation sequencing. *World journal of gastroenterology*, 25(32), 4629–4660. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i32.4629>
59. Procter, J. B., Carstairs, G. M., Soares, B., Mourão, K., Ofoegbu, T. C., Barton, D., Lui, L., Menard, A., Sherstnev, N., Roldan-Martinez, D., Duce, S., Martin, D., & Barton, G. J. (2021). Alignment of Biological Sequences with Jalview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2231, 203–224. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_13
60. Rehman, A. (2018). Inside *Helicobacter pylori*: A Serious Threat to Humans. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 5, 60463–60463.
61. Robinson, S., Afzal, A. & Leader, David. (2014). Bioinformatics: Concepts, Methods, and Data. 10.1016/B978-0-12-386882-4.00013-X.
62. Rossez, Y., Gosset, P., Boneca, I. G., Magalhães, A., Ecobichon, C., Reis, C. A., Cieniewski-Bernard, C., Joncquel Chevalier Curt, M., Léonard, R., Maes, E., Sperandio, B., Slomianny, C., Sansonetti, P. J., Michalski, J. C., & Robbe-Masselot, C. (2014). The lacdiNAc-specific adhesin LabA mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. *The Journal of infectious diseases*, 210(8), 1286–1295. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu239>
63. Roszczenko-Jasińska, P., Wojtyś, M. I., & Jagusztyn-Krynicka, E. K. (2020). *Helicobacter pylori* treatment in the post-antibiotics era-searching for new drug targets. *Applied microbiology and biotechnology*, 104(23), 9891–9905. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10945-w>
64. Rybarczyk, A., Szostak, N., Antczak, M., Zok, T., Popenda, M., Adamiak, R., Blazewicz, J., & Szachniuk, M. (2015). New in silico approach to assessing RNA secondary structures with non-canonical base pairs. *BMC bioinformatics*, 16(1), 276. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0718-6>
65. Senkovich, O. A., Yin, J., Ekshyyan, V., Conant, C., Traylor, J., Adegboyega, P., McGee, D. J., Rhoads, R. E., Slepnev, S., & Testerman, T. L. (2011). *Helicobacter pylori* AlpA and AlpB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infection and immunity*, 79(8), 3106–3116. <https://doi.org/10.1128/IAI.01275-10>

66. Sharndama, H. C., & Mba, I. E. (2022). *Helicobacter pylori*: an up-to-date overview on the virulence and pathogenesis mechanisms. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 1–18. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00675-0>
67. Shazman, S., Celniker, G., Haber, O., Glaser, F., & Mandel-Gutfreund, Y. (2007). Patch Finder Plus (PFplus): a web server for extracting and displaying positive electrostatic patches on protein surfaces. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W526–W530. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm401>
68. Shazman, S., Celniker, G., Haber, O., Glaser, F., & Mandel-Gutfreund, Y. (2007). Patch Finder Plus (PFplus): a web server for extracting and displaying positive electrostatic patches on protein surfaces. *Nucleic acids research*, 35(Web Server issue), W526–W530. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm401>
69. Sievers, F., Higgins, D.G. (2021). The Clustal Omega Multiple Alignment Package. In: Katoh, K. (eds) Multiple Sequence Alignment. Methods in Molecular Biology, vol 2231. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1036-7_1
70. Spiegel, M., Krzyżek, P., Dworniczek, E., Adamski, R., & Sroka, Z. (2021). In Silico Screening and In Vitro Assessment of Natural Products with Anti-Virulence Activity against *Helicobacter pylori*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(1), 20. <https://doi.org/10.3390/molecules27010020>
71. Šterbenc, A., Jarc, E., Poljak, M., & Homan, M. (2019). *Helicobacter pylori* virulence genes. *World journal of gastroenterology*, 25(33), 4870–4884. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i33.4870>
72. Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johner, N., & Schwede, T. (2021). ProMod3-A versatile homology modelling toolbox. *PLoS computational biology*, 17(1), e1008667. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008667>
73. Talarico, S., Whitefield, S. E., Fero, J., Haas, R., & Salama, N. R. (2012). Regulation of *Helicobacter pylori* adherence by gene conversion. *Molecular microbiology*, 84(6), 1050–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08073.x>
74. Testerman, T. L., & Morris, J. (2014). Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World journal of gastroenterology*, 20(36), 12781–12808. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12781>

75. Tiwari, A., Chauhan, R. P., Agarwal, A., & Ramteke, P. W. (2020). Molecular Modeling of Proteins: Methods, Recent Advances, and Future Prospects. *Computer-Aided Drug Design*, 23–47. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6815-2_2
76. Tiwari, Apoorv & Chauhan, Ravendra & Agarwal, Aparna & Ramteke, Pramod. (2020). Molecular Modeling of Proteins: Methods, Recent Advances, and Future Prospects. 10.1007/978-981-15-6815-2_2.
77. Torres, P., Sodero, A., Jofily, P., & Silva-Jr, F. P. (2019). Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4574. <https://doi.org/10.3390/ijms20184574>
78. Trunzo, N. E., & Hong, K. L. (2020). Recent Progress in the Identification of Aptamers Against Bacterial Origins and Their Diagnostic Applications. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5074. <https://doi.org/10.3390/ijms21145074>
79. Wan, Q., Liu, X., & Zu, Y. (2021). Oligonucleotide aptamers for pathogen detection and infectious disease control. *Theranostics*, 11(18), 9133–9161. <https://doi.org/10.7150/thno.61804>
80. Wang, Y., Wu, H., & Cai, Y. (2018). A benchmark study of sequence alignment methods for protein clustering. *BMC bioinformatics*, 19(Suppl 19), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2524-4>
81. WGO (Directrices mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología) <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/helicobacter-pylori-spanish-2021.pdf> (consultado: 17/02/2022 a las 16:06).
82. Xu, C., Soyfoo, D. M., Wu, Y., & Xu, S. (2020). Virulence of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins: an updated review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(10), 1821–1830. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03948-y>
83. Xu, X., & Chen, S. J. (2018). Hierarchical Assembly of RNA Three-Dimensional Structures Based on Loop Templates. *The journal of physical chemistry. B*, 122(21), 5327–5335. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b10102>

84. Yan, Y., Zhang, D., Zhou, P., Li, B., & Huang, S. Y. (2017). HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. *Nucleic acids research*, 45(W1), W365–W373. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx407>
85. Yan Y, Tao H, He J, Huang SY. (2020). The HDock server for integrated protein-protein docking. *Nat Protocols*.15(5):1829-1852. doi: 10.1038/s41596-020-0312-x.
86. Yan, W., Gu, L., Ren, W., Ma, X., Qin, M., Lyu, M., & Wang, S. (2019). Recognition of *Helicobacter pylori* by protein-targeting aptamers. *Helicobacter*, 24(3), e12577. <https://doi.org/10.1111/hel.12577>
87. Yu, W., & MacKerell, A. D., Jr (2017). Computer-Aided Drug Design Methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1520, 85–106. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6634-9_5
88. Zagrovic, B., Bartonek, L., & Polyansky, A. A. (2018). RNA-protein interactions in an unstructured context. *FEBS letters*, 592(17), 2901–2916. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13116>
89. Zhang, H., Zhang, L., Mathews, D. H., & Huang, L. (2020). LinearPartition: linear-time approximation of RNA folding partition function and base-pairing probabilities. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 36(Suppl_1), i258–i267. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa460>
90. Zheng, W., Zhang, C., Bell, E. W., & Zhang, Y. (2019). I-TASSER gateway: A protein structure and function prediction server powered by XSEDE. *Future generations computer systems : FGCS*, 99, 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.future.2019.04.011>

Anexo 1. Calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas

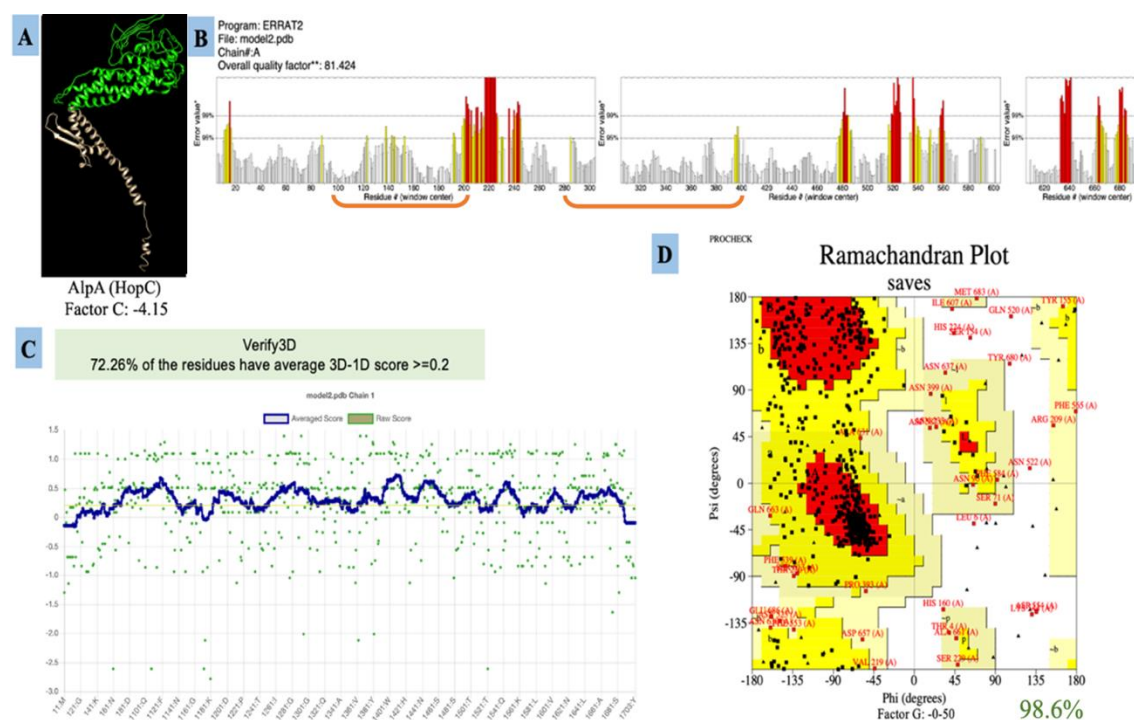


Figura S1. Validación de la estructura modelada *Ab initio* de la adhesina HopC (AlpA). **Panel A.** Estructura 3D del modelado *Ab initio* de la adhesina HopC (AlpA) por I-TASSER, región de cabeza (verde) y mango (café), con un factor de confianza de -4.15. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelado con el Gráfico ERRAT con un factor de calidad de 81.42. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra que más del 72.26% de los residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 98.6% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 2.4% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.50.

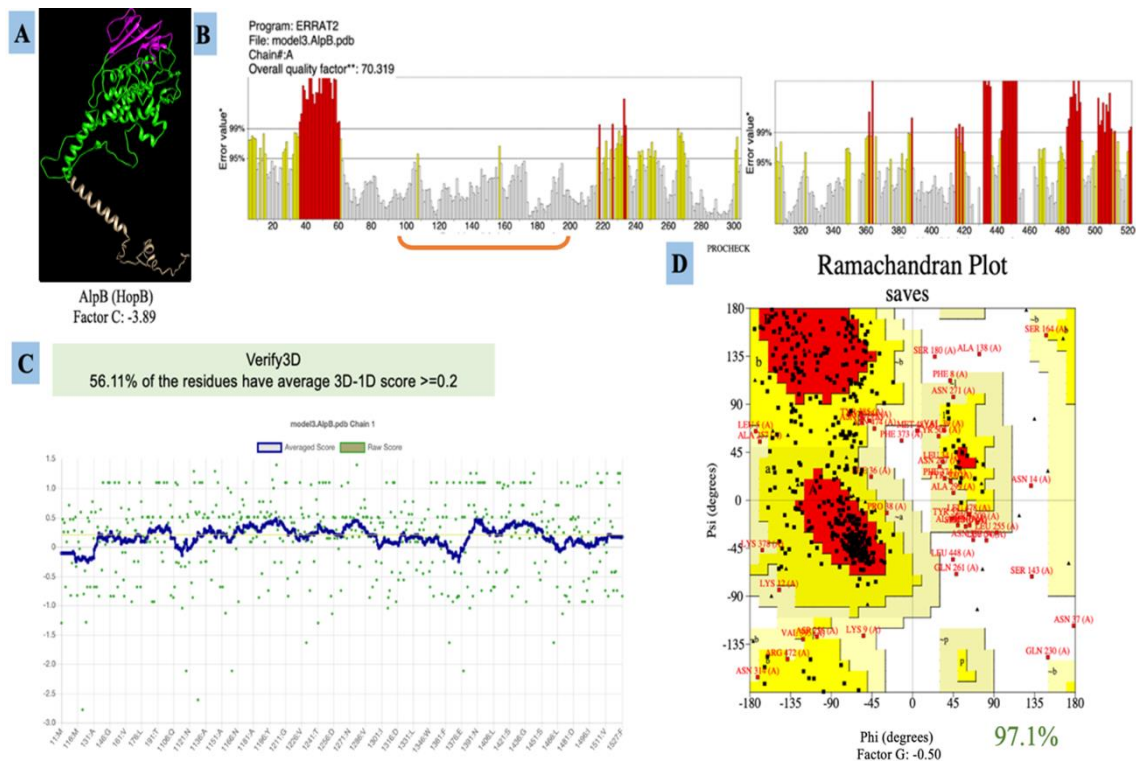


Figura S2. Validación de la estructura modelada por *Ab initio* de la adhesina HopB (AlpB). **Panel A.** Estructura 3D del modelado *Ab initio* de la adhesina HopB (AlpB) por I-TASSER, región de corona (cian), cabeza (verde) y mango (café), con un factor de confianza de -3.89. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo de la adhesina HopB (AlpB) con el Gráfico ERRAT con un factor de calidad de 70.31. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada de HopB (AlpB) por Verify3D que muestra que más del 56.11% de los residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran de HopB (AlpB) que muestra que el 97.1% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 2.9% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.50.

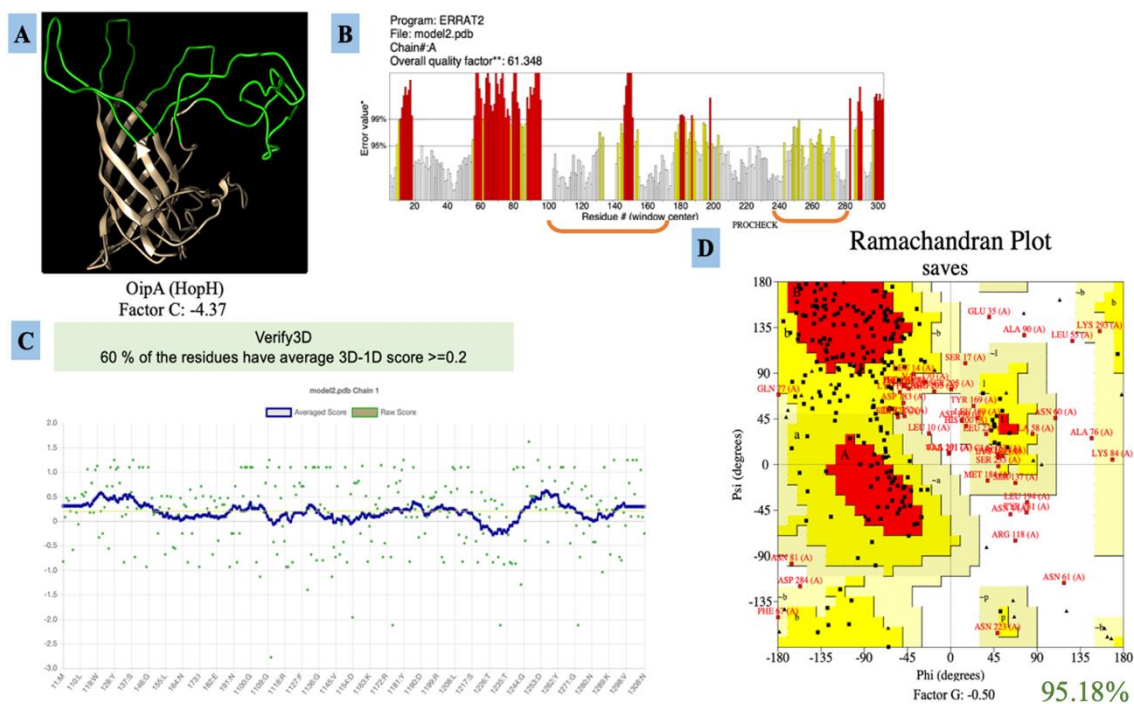


Figura S3. Validación de la estructura modelada *Ab initio* de la adhesina HopH (OipA). **Panel A.** Estructura 3D del modelado *Ab initio* de la adhesina HopH (OipA) por I-TASSER, región de adhesión (verde), con un factor de confianza de -4.37. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelado con el Gráfico ERRAT con un factor de calidad de 61.34. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra que más del 60% de los residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 95.18% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 4.82% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.50.

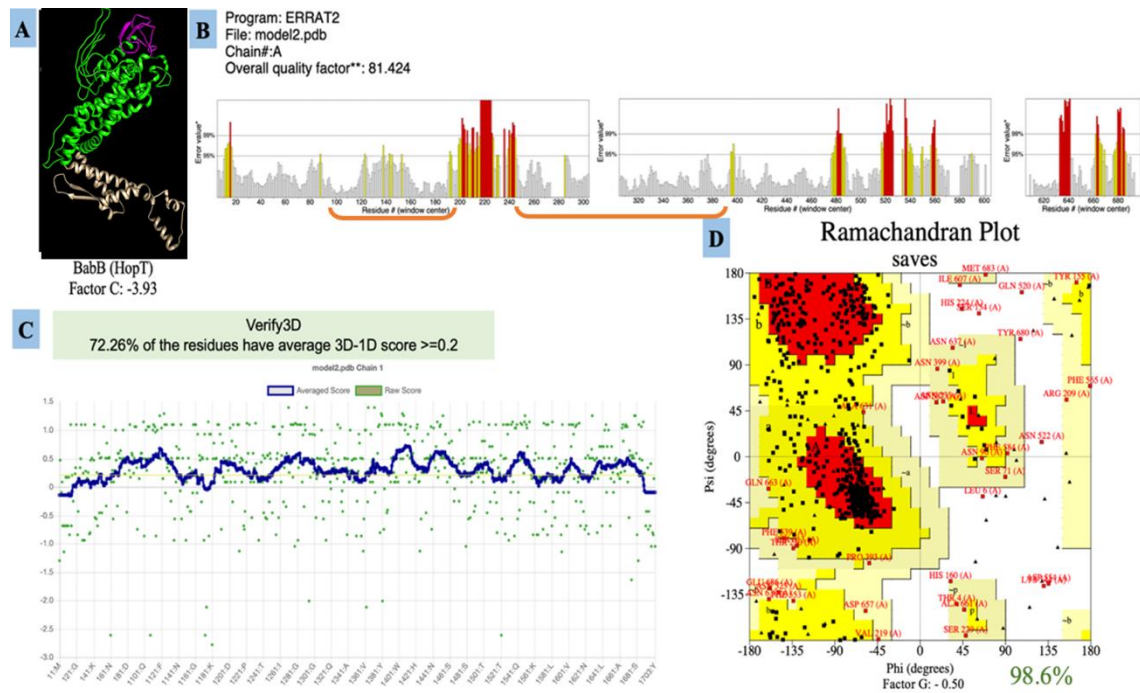


Figura S4. Validación de la estructura modelada por homología de la adhesina HopT (BabB). **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina HopT (BabB) por I-TASSER, región de corona (cian), cabeza (verde) y mango (café), con un factor de confianza de -3.93. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo con el Gráfico ERRAT con un factor de calidad de 81.42. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra que más del 72.26% de los residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 98.6% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 2.4% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.50.

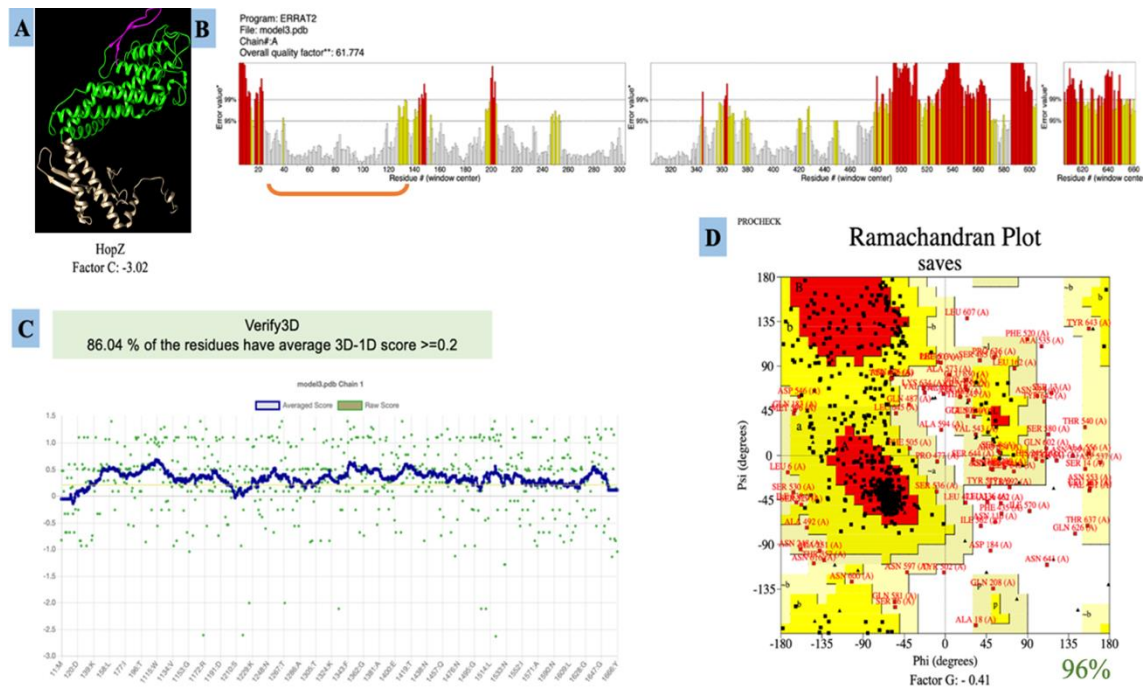


Figura S5. Validación de la estructura modelada por homología de la adhesina HopZ. **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina HopZ por I-TASSER, región de corona (cian), cabeza (verde) y mango (café), con un factor de confianza de -3.02. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo con el Gráfico con un factor de calidad de 61.77. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra que más del 86.04% de los residuos tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 96% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 4% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.41.

Anexo 2. Selección de los aptámeros para cada adhesina

a) Adhesinas con estructura cristalizada

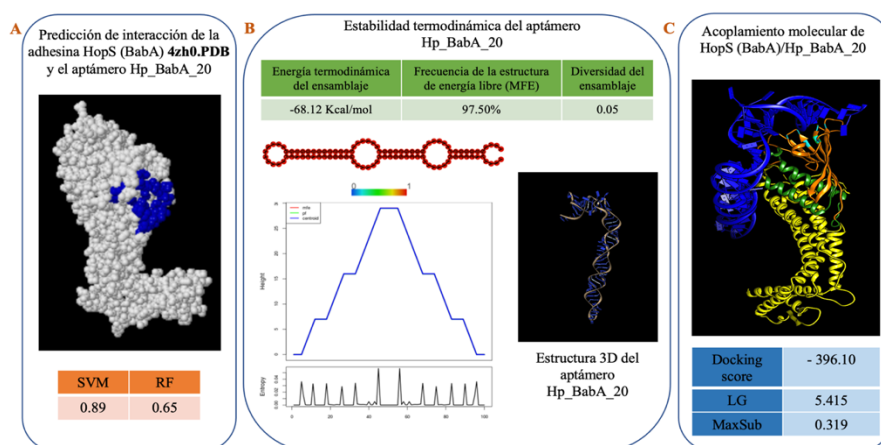


Figura S6. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina HopS (BabA). **Panel A.** Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopS (BabA) con el aptámero Hp_BabA_20 mediante los clasificadores SVM y RF. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_BabA_20 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_BabA_20 (azul) con la estructura de cabeza-corona (verde-anaranjado) de la adhesina HopS (BabA) y sus valores de calidad de acoplamiento.

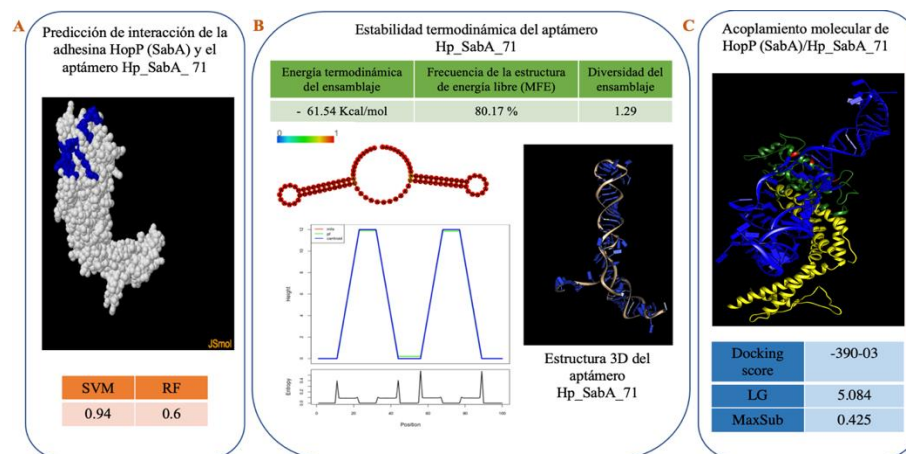


Figura S7. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina modelada HopP (SabA). **Panel A.** Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopP (SabA) con el aptámero Hp_SabA_71 mediante los clasificadores SVM y RF. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_SabA_71 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_SabA_71 (azul) con la estructura de cabeza (verde) de la adhesina HopP (SabA) y sus valores de calidad de acoplamiento.

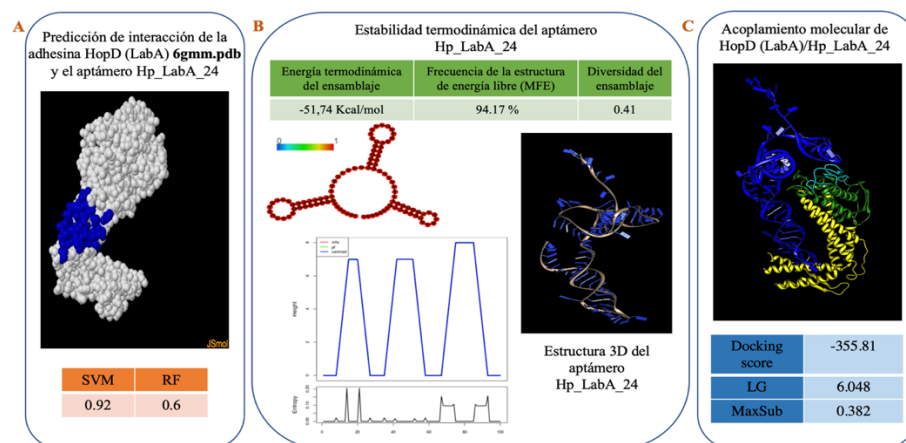


Figura S8. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina HopD (LabA). **Panel A.** Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopD (LabA) con el aptámero Hp_LabA_24 mediante los clasificadores SVM y RF. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_LabA_24 (tabla verde), predicción de la estructura

secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_LabA_24 (azul) con la estructura de cabeza (verde) de la adhesina HopD (LabA) y sus valores de calidad de acoplamiento.

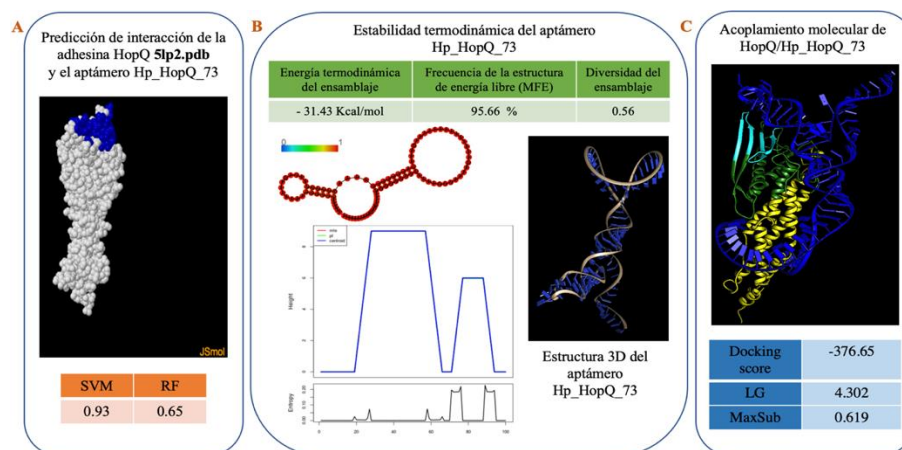


Figura S9. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina HopQ. Panel A. Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopQ con el aptámero Hp_HopQ_73 mediante los clasificadores SVM y RF. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_HopQ_73 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_HopQ_73 (azul) con la estructura de cabeza-corona (verde-cian) de la adhesina HopQ y sus valores de calidad de acoplamiento.

b) Adhesinas modeladas

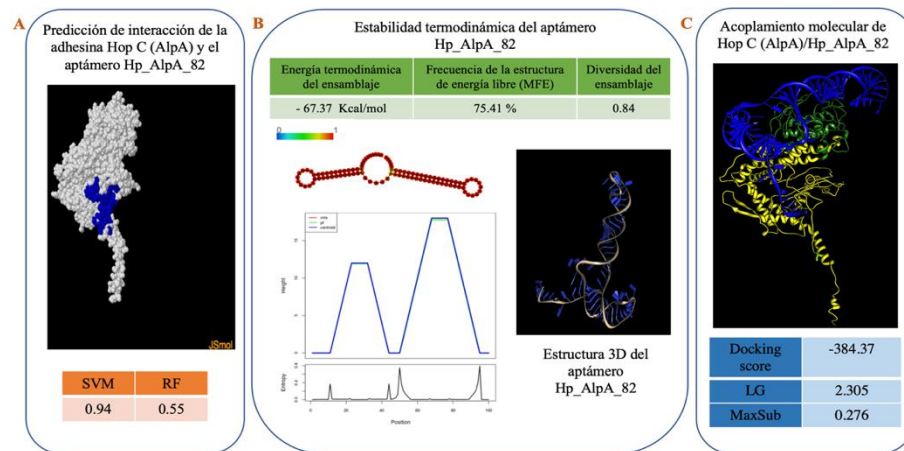


Figura S10. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina modelada HopC (AlpA). **Panel A.** Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopC (AlpA) con el aptámero Hp_Alpa_82 mediante los clasificadores SVM y RF. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_Alpa_82 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_Alpa_82 (azul) con la estructura de cabeza (verde) de la adhesina HopC (AlpA) y sus valores de calidad de acoplamiento.

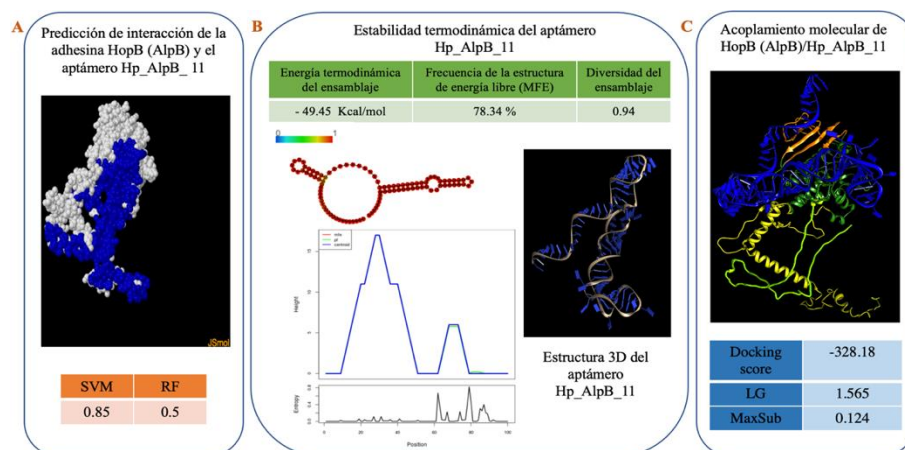


Figura S11. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina modelada HopB (AlpB). Panel A. Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopB (AlpB) con el aptámero Hp_AlPB_11 mediante los clasificadores SVM y RF. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_AlPB_11 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_AlPB_11 (azul) con la estructura de cabeza-corona (verde-anaranjado) de la adhesina HopB (AlpB) y sus valores de calidad de acoplamiento.

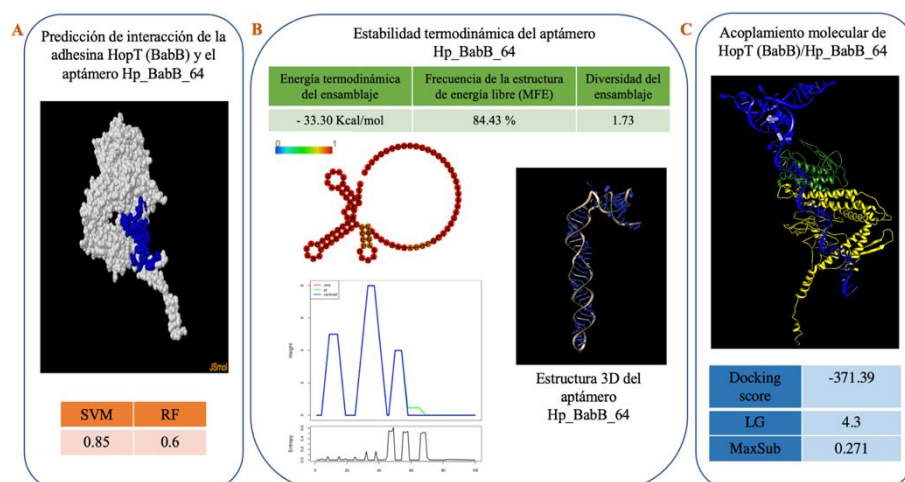


Figura S12. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina modelada HopT (BabB). Panel A. Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopT (BabB) con el aptámero Hp_BabB_64 mediante los clasificadores SVM y RF.

Panel B. Valores termodinámicos del aptámero Hp_BabB_64 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_BabB_64 (azul) con la estructura de cabeza (verde) de la adhesina HopT (BabB) y sus valores de calidad de acoplamiento.

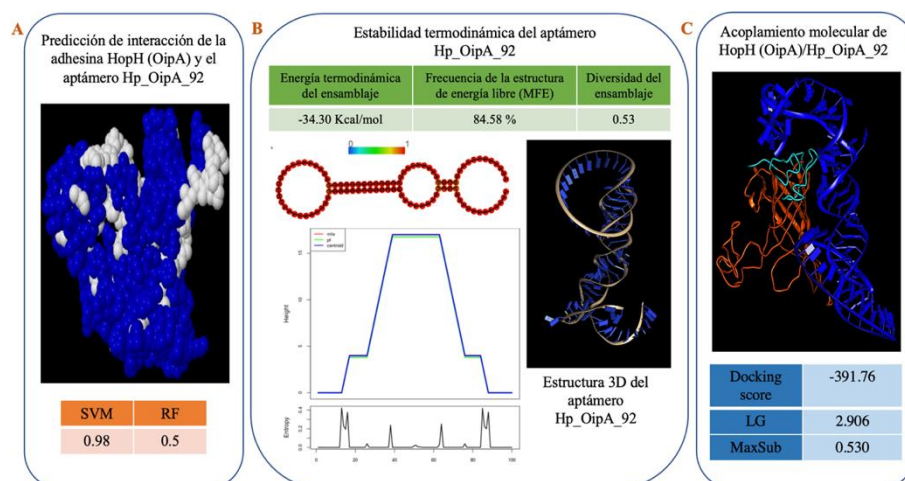


Figura S13. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina modelada HopH (OipA). **Panel A.** Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopH (OipA) con el aptámero Hp_OipA_92 mediante los clasificadores SVM y RF. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_OipA_92 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_OipA_92 (azul) con la estructura de cabeza (verde) de la adhesina HopH (OipA) y sus valores de calidad de acoplamiento.

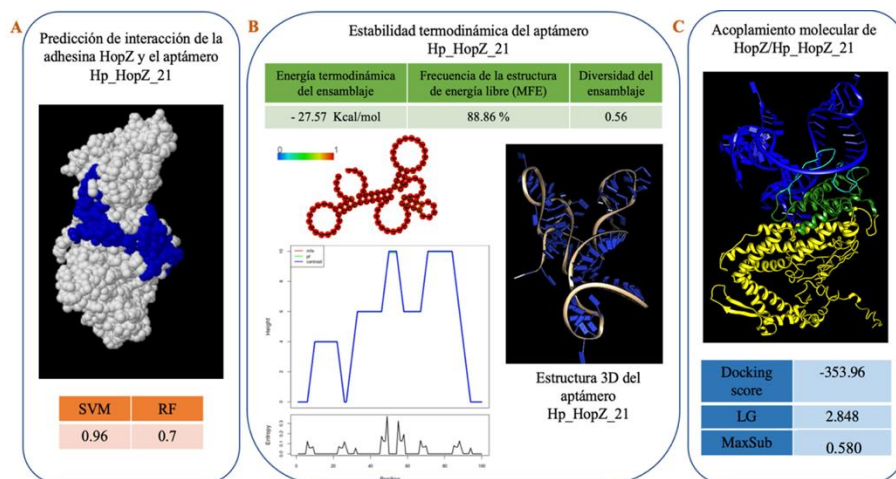


Figura S14. Selección y asignación de un aptámero que se una al dominio de adhesión de la adhesina modelada HopZ. Panel A. Parche electrostático cargado positivamente (azul) de la adhesina (gris) y su predicción de interacción adhesina HopZ con el aptámero Hp_HopZ_21 mediante los clasificadores SVM y RF, los valores SVM deben ser $\leq$ a 0.9 y RF $\leq$ a 0.5 para mostrar una predicción de interacción positiva. **Panel B.** Valores termodinámicos del aptámero Hp_HopZ_21 (tabla verde), predicción de la estructura secundaria del aptámero (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y su estructura 3D. **Panel C.** Estructura 3D del acoplamiento molecular del aptámero Hp_HopZ_21 (azul) con la estructura de cabeza-corona (verde-cian) de la adhesina HopZ y sus valores de calidad de acoplamiento.

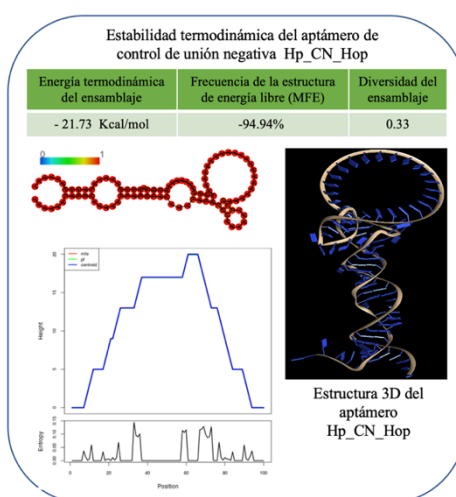


Figura S15. Estabilidad termodinámica del aptámero Hp_Control_Negativo_Hop. Valores termodinámicos del aptámero (tabla verde) muestran estabilidad energética (energía termodinámica del ensamblaje $\leq$ 20, MFE $>$ 60 y Diversidad del ensamblaje $<$ 2.0), estructura secundaria (rojo) con su diagrama de montaña, entropía y estructura 3D.

Anexo 3. Gráficos de calidad estereoquímica de las adhesinas modeladas.

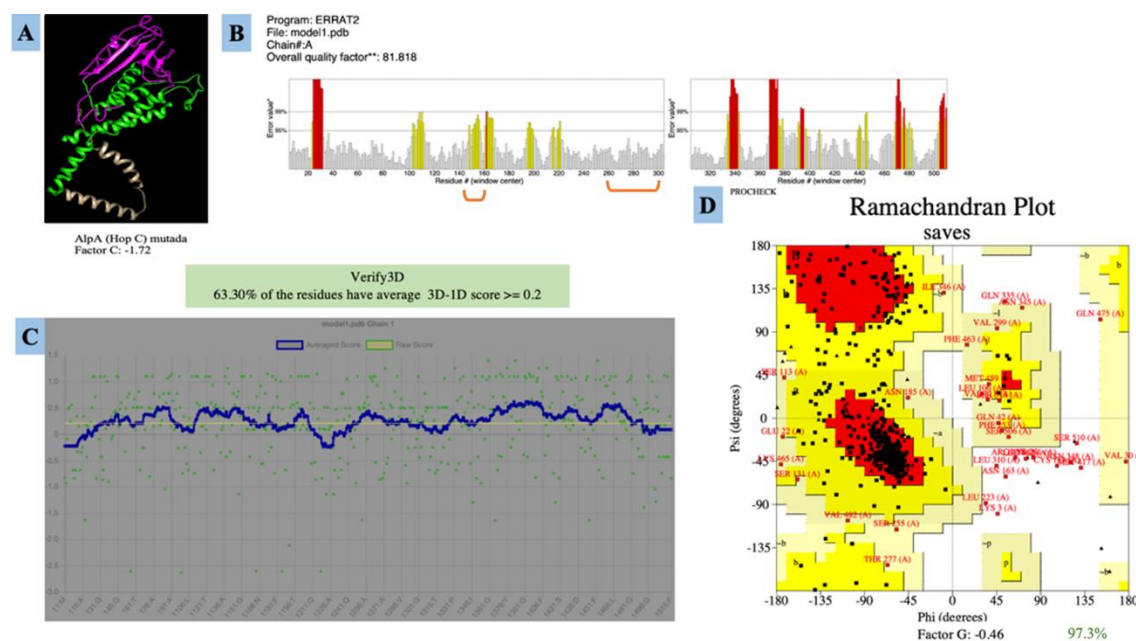


Figura S16. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopC (AlpA). **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopC (AlpA) por I-TASSER con un factor de confianza de -1.72. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado de la adhesina HopC (AlpA) con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 97.3% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 2.7% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.46.

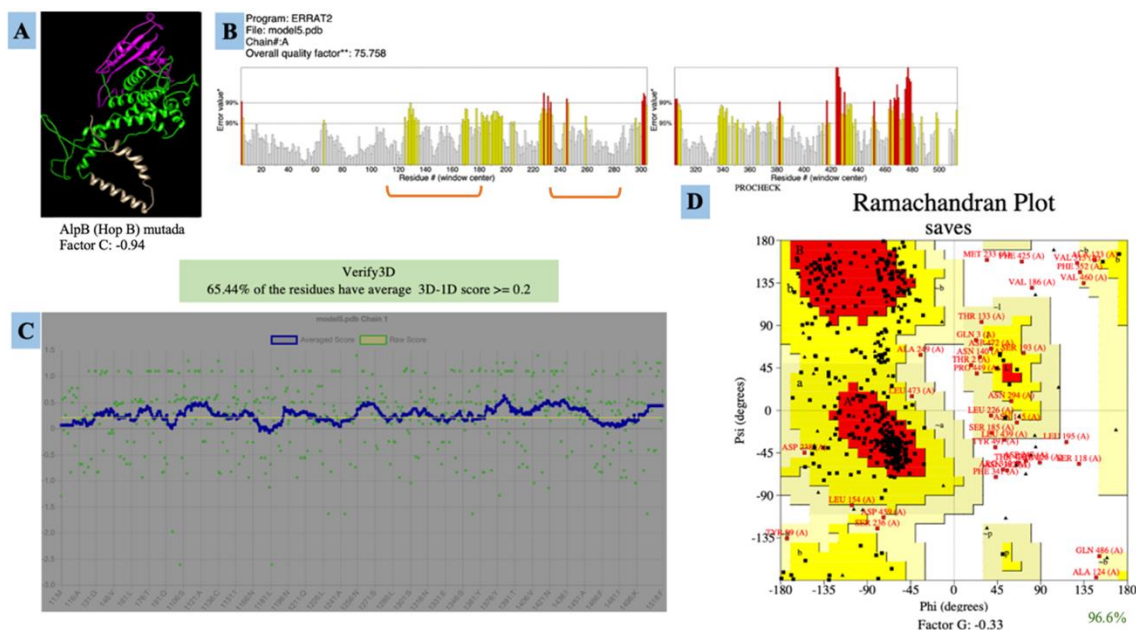


Figura S17. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopB (AlpB). **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopB (AlpB) por I-TASSER con un factor de confianza de -0.94. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 96.6% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 3.4% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.33.

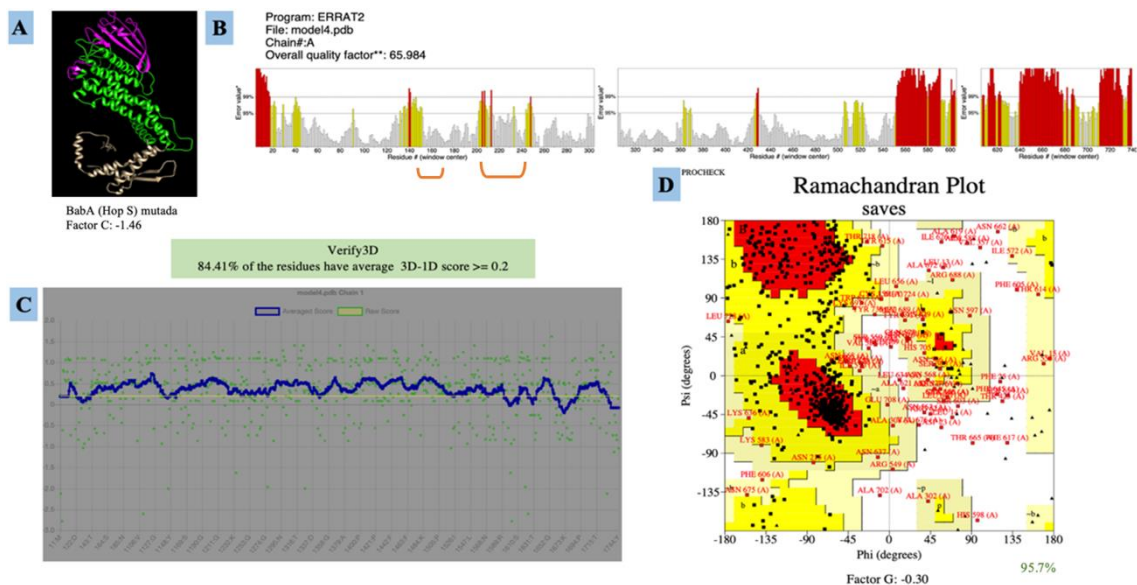


Figura S18. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopS (BabA) . **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopB (AlpB) por I-TASSER con un factor de confianza de -1.46. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 95.7% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 4.3% en las regiones no permitidas con u factor G de – 0.30.

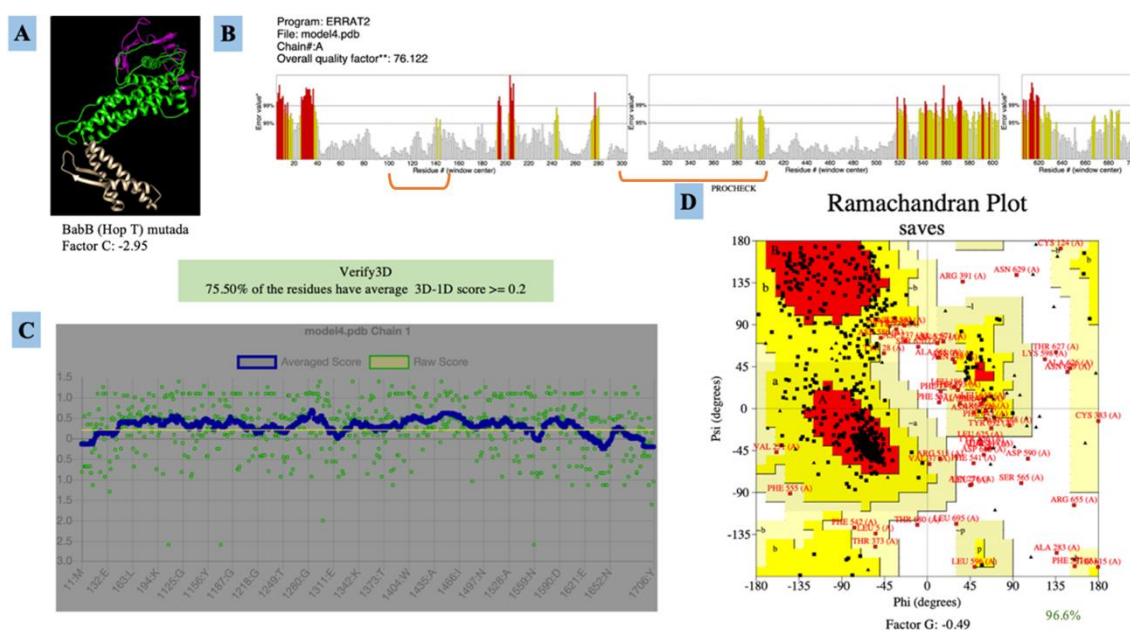


Figura S19. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopT (BabB) . **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopT (BabB) por I-TASSER con un factor de confianza de -2.95. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran que muestra que el 96.6% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 3.4% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.49.

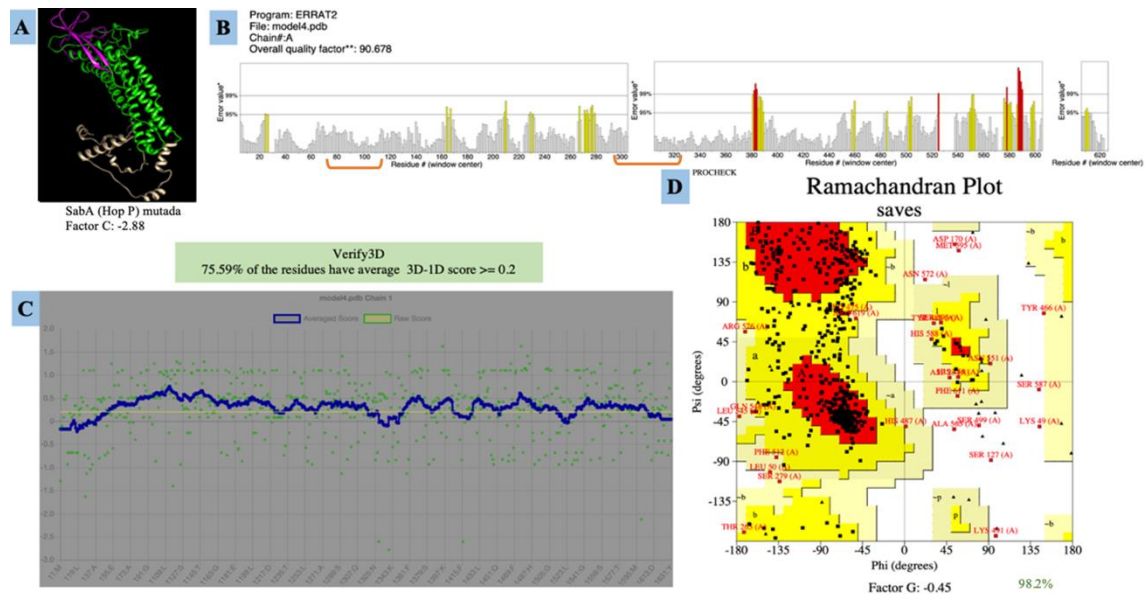


Figura S19. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopP (SabA) . **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopP (SabA) por I-TASSER con un factor de confianza de -2.88. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran de HopP (SabA) que muestra que el 98.2% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 1.8% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.45.

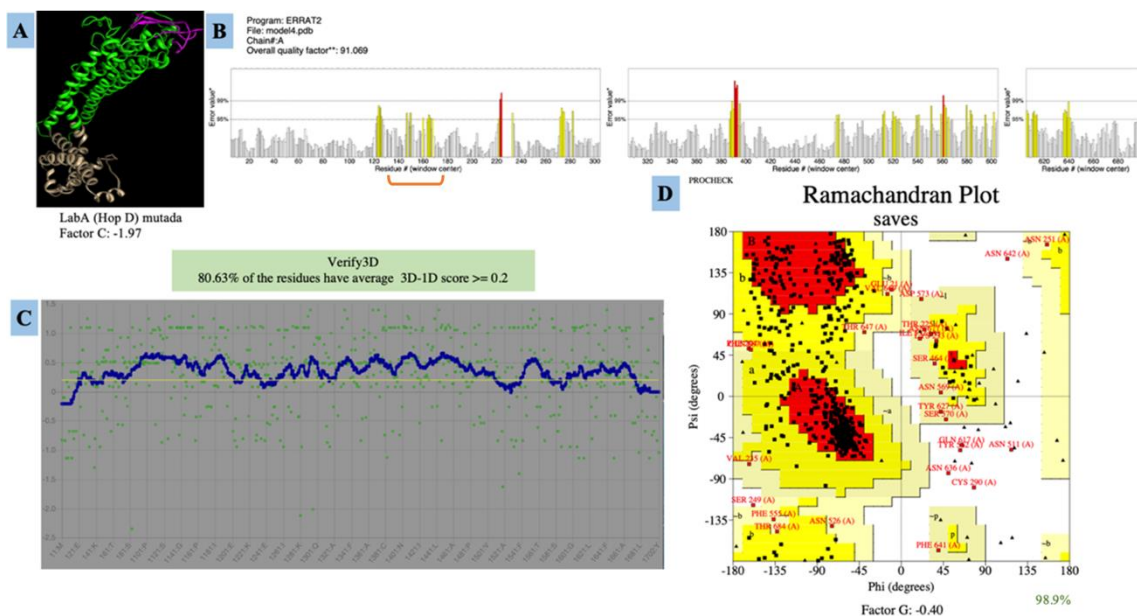


Figura S20. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopD (LabA) . Panel A. Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopD (LabA) por I-TASSER con un factor de confianza de -1.97. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran de HopD (LabA) que muestra que el 98.9% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 1.1% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.40.

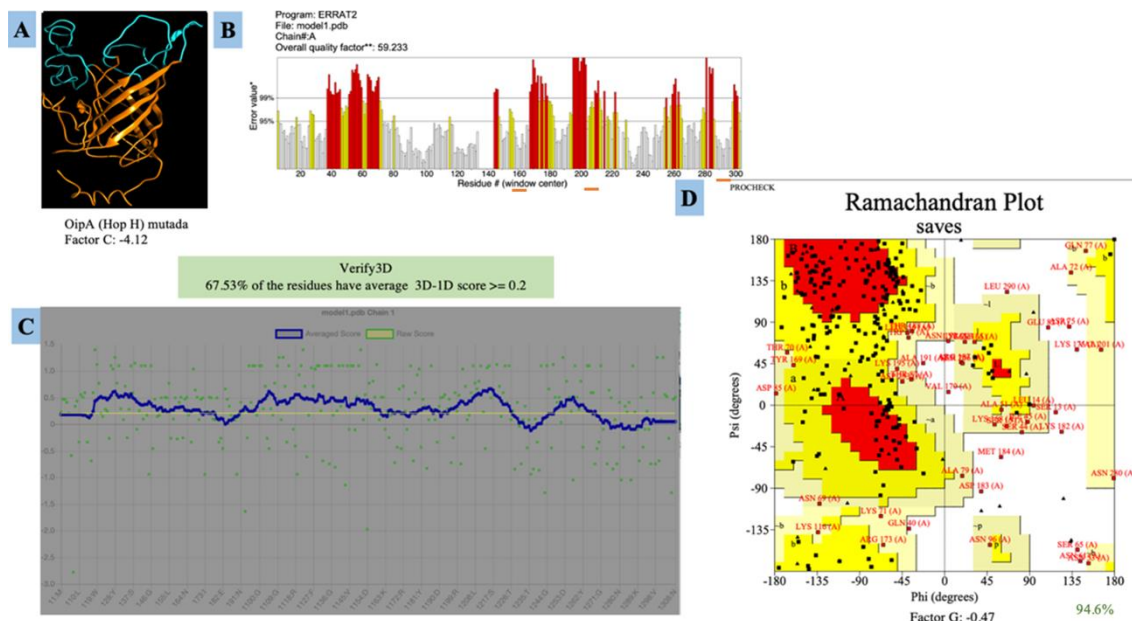


Figura S21. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopH (OipA). **Panel A.** Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopH (OipA) por I-TASSER con un factor de confianza de -4.12. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran de HopH (OipA) que muestra que el 94.6% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 5.4% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.47.

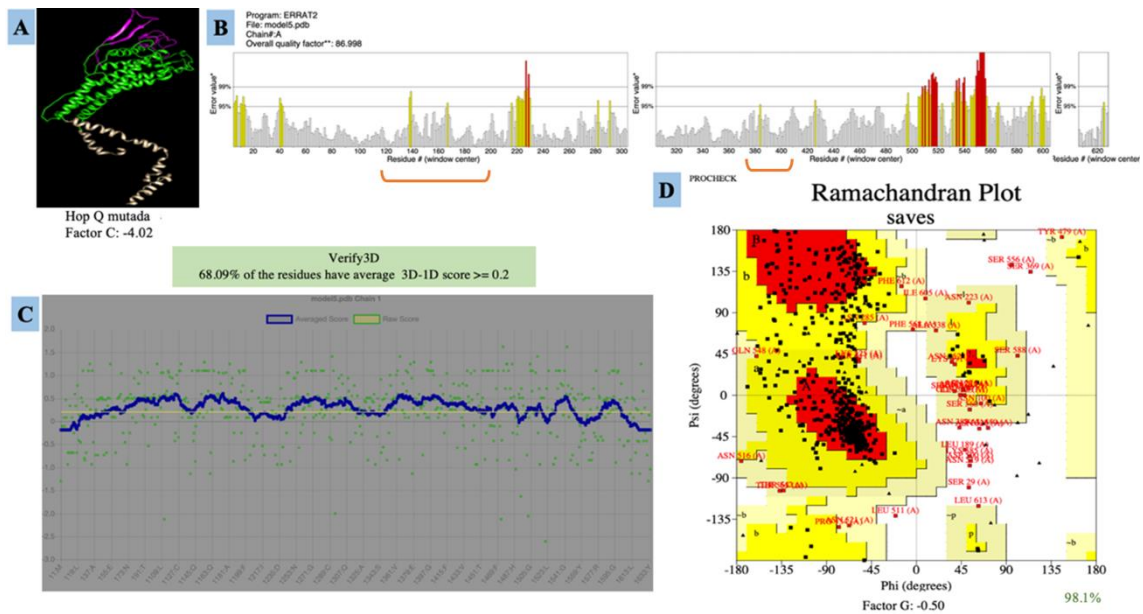


Figura S21. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopQ. Panel A. Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopQ por I-TASSER con un factor de confianza de -4.02. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran de HopQ que muestra que el 98.1% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 1.9% en las regiones no permitidas con un factor G de - 0.50.

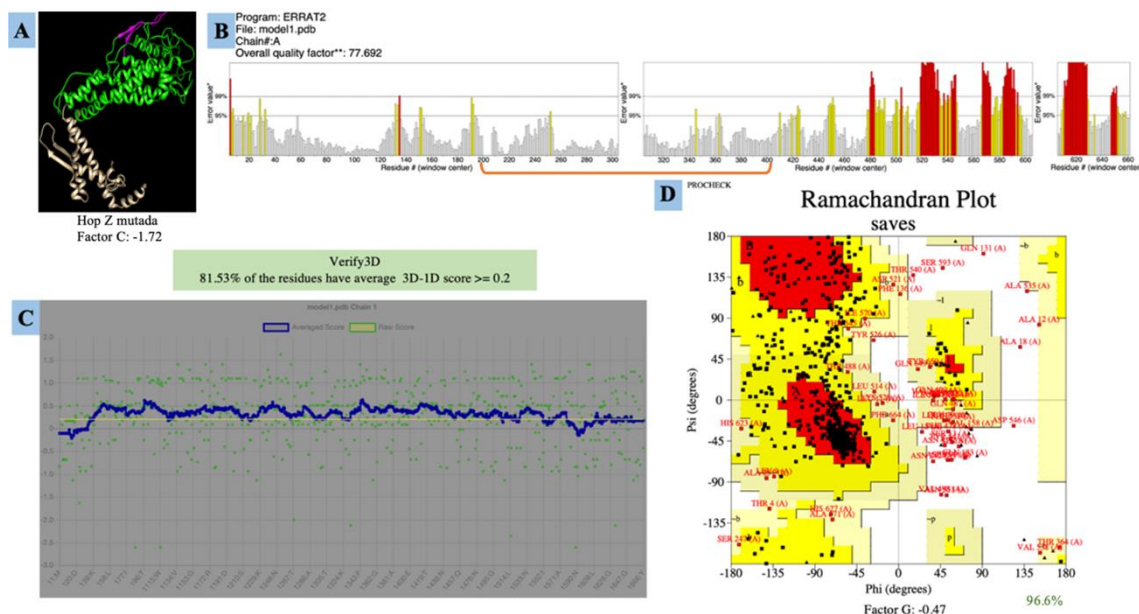


Figura 32. Validación de la estructura mutada de la adhesina HopZ. Panel A. Estructura 3D del modelado de la adhesina mutada HopZ por I-TASSER con un factor de confianza de -1.72. **Panel B.** Verificación de confiabilidad del modelo mutado con el Gráfico ERRAT. * En el eje de error, se dibujan dos líneas para indicar la confianza con la que es posible rechazar regiones que exceden ese valor de error. ** Expresado como el porcentaje de proteína para el cual el valor de error calculado cae por debajo del límite de rechazo del 95%. **Panel C.** Validación de la estructura modelada por Verify3D que muestra el porcentaje de residuos de aminoácidos que tienen una puntuación media 3D-1D mayor o igual a 0.2. **Panel D.** Gráfico de Ramachandran de HopZ que muestra que el 96.6% de los residuos se encuentran en las regiones más favorables y 3.4% en las regiones no permitidas con un factor G de -0.47 .

Anexo 4. Secuencias de los aptámeros seleccionados y su notación de paréntesis

Aptámero Hp_AlpA_82
AAAAAAAAAAACCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAGGGGGGGGGGGUAAAA AAAAAAAAUCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAGGGGGGGGGGGAUUUUUA AAAA
.....((((((((((.....))))))))....((((((((((((((((.....))))))))))))....
Aptámero Hp_AlpB_11
AAAAAAAAAGCCGGGGGAGACGGGGGCAAGCCCCAAAACUCCCCC GGCAAAAAAAAAAGCGGCGAAAACACGCCGUGAAAACACGCCCCAAAA AAAA
.....((((((((((.....))))))))....((((((((((((((((.....))))))))))))....
Aptámero Hp_BabA_20
AAAAGUGGGCCAAAAAAGGGGCCGCAAAAAACCCCCGUGGUGGAAA AAAAAACACCACCGGGGGAAGCCGGCCCCAAAAAAGGCCAC AAAA
....((((((((.....))))))))....((((((((((((((((.....))))))))))))....
Aptámero Hp_BabB_64
AAAGCCGGAACCGGCAAAAAGGCGCGCGAAAAACGCGCGCCGCC UGAAAAAGGCAAAAAAAGGCGCAAAAAAAGGGGGGGGGGGG GAAAA
...((((.....))))....((((((((.....))))))))....
Aptámero Hp_LabA_24
AAAAAAGCCCCGAAAUACGGGGGCAAAAAAGCCCCCAAAUAA AAAGGGGGGCAAAAAAACCCCCCAUAAAUAAGGGGGGGGAA AAAA
.....((((((((.....))))))))....((((((((((((((((.....))))))))))))....
Aptámero Hp_OipA_92
AAAAAAAAAAAGCGUAAAAAAACCGCCCGCCCCGAAAAAA GGUGUAAAAAAACGGGGGCGGGCGGAAAAAAGCGUAAAAAA AAAA
.....((((.....))))....((((((((((((((((.....))))))))))))....
Aptámero Hp_SabA_71
AAAAAAAAAAACCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAGGGGGGGGGGUAAAA AAAAAAUCCCCCCCCCCCCAAAAAAAAAAAGGGGGGGGGGAAAAAA AAAA
.....((((((((((.....))))))))....((((((((((((((((.....))))))))))))....
Aptámero Hp_HopQ_73
AAAAAAAAAAGAAUAAAAGGGGGGGUGAAAAGGGAAAAGAAAAAA AAAAAGAAACACCCCCCAAGGGGGGAUAGAAAAAACCCCCCA AAAA
.....((((((((.....))))))))....((((((((((((((((.....))))))))))))....
Aptámero Hp_HopZ_21
AAAAACCCCAAAAAAAAAAAAGGGGCCCGGAAAAAAACCC UAAAAAGGGAAAAAAACCCCAAAAAAAAAAAGGGGCCGGGAA AAAA
....((((.....))))....((((((((.....))))))))....