

# UACM

Universidad Autónoma  
de la Ciudad de México

---

*Nada humano me es ajeno*

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

LICENCIATURA EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Caracterización de la chaperonina GroEL de *Helicobacter pylori***

TRABAJO RECEPCIONAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A  
**SELENE BECERRIL HUESCA**

DIRECTOR  
**Dr. José de Jesús Olivares Trejo**

Ciudad de México, Abril 2019

## SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

### RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

### DERECHOS RESERVADOS<sup>©</sup>

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.

# COMITÉ TUTORIAL

## **Director**

Dr. José de Jesús Olivares Trejo

Profesor investigador. Posgrado en ciencias genómicas

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

## **Lectores**

Dra. Lilia López Cánovas

Dr. Mario César López Camarillo

Dr. Marco Antonio González López

El presente proyecto de investigación fue realizado en las instalaciones del Posgrado en Ciencias Genómicas (laboratorio 4) de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

La realización del presente trabajo contó con el apoyo financiero de CONACYT con número de convenio CB-222180 y número de beca: 25986.

A la beca de titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

La impresión y empastado de ésta tesis se logró gracias al apoyo otorgado por la Universidad Autónoma de México y la Coordinación de Servicios Estudiantiles.

# AGRADECIMIENTOS

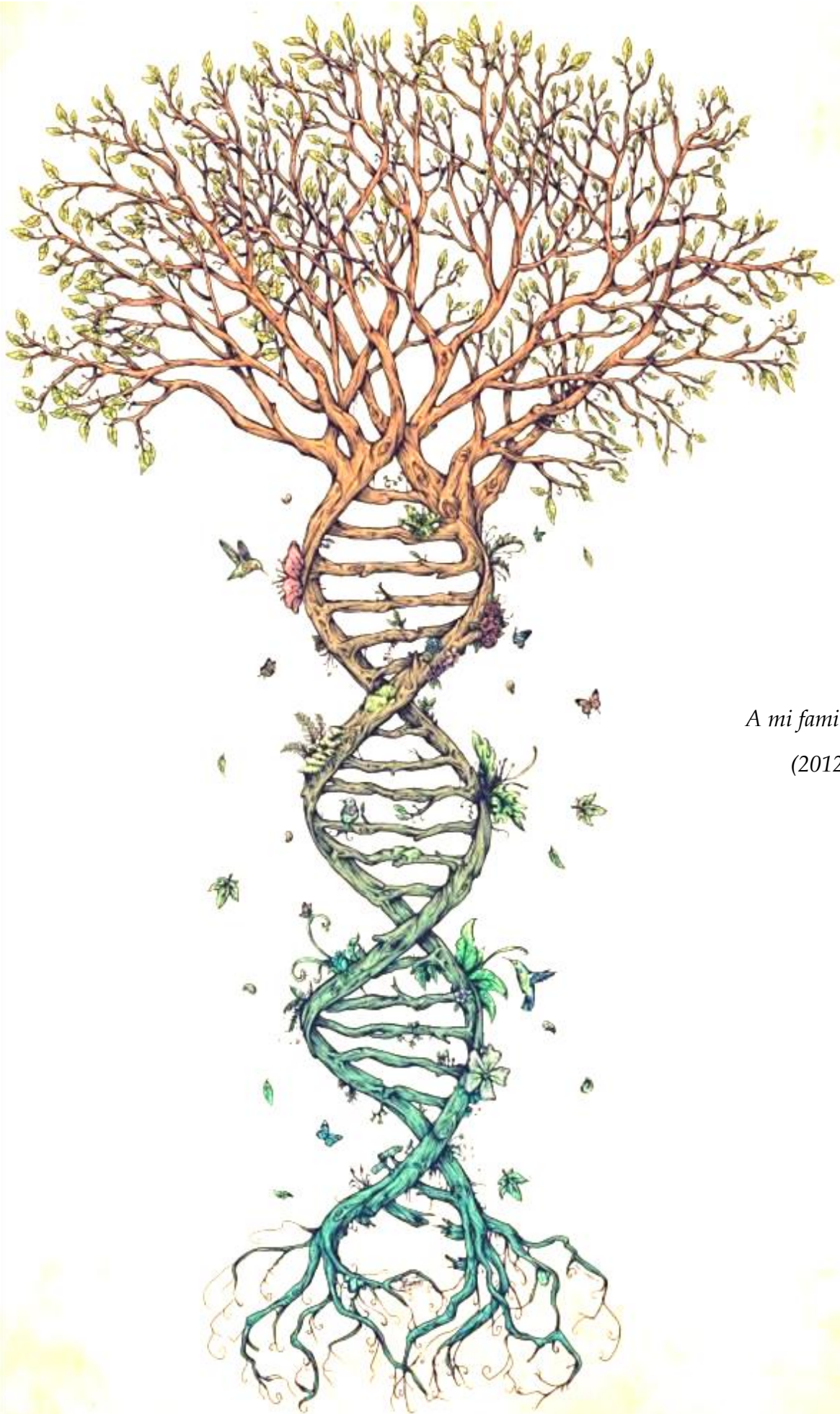
A mi casa de estudios la UACM por todas las oportunidades incomparables que me brindó

A CONACYT por darme el apoyo económico para la realización de esta tesis.

Gracias a mis compañeros de laboratorio Cristhian y Laura que siempre estuvieron apoyándome en cada una de mis dudas, en lo teórico y práctico.

Gracias a la Dra. Lilia, Dr. Camarillo y Dr. Marco por sus valiosas aportaciones a esta tesis, sin ustedes no hubiera sido la misma.

Un agradecimiento especial a mi director de tesis, Dr. José de Jesús Olivares Trejo, gracias por haberme facilitado siempre los medios para llevar a cabo todas las actividades propuestas en el desarrollo de esta tesis, pero sobre todo por saberme transmitir la pasión por el mundo de la investigación.



*A mi familia y amigos  
(2012-2019)*

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
LISTA DE FIGURAS .....	5
LISTA DE TABLAS .....	6
ABREVIATURAS .....	7
RESUMEN .....	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Antecedentes del descubrimiento de <i>Helicobacter pylori</i> ( <i>H. pylori</i> ) .....	10
1.2 Microbiología .....	12
1.3 Epidemiología .....	13
1.4 Clínica de la infección.....	15
1.4.1 Manifestaciones digestivas .....	16
1.4.1.1 Gastritis.....	16
1.4.2 Manifestaciones extradigestivas .....	18
1.4.2.1 Anemia ferropénica refractaria.....	18
1.4.3 Otras manifestaciones extradigestivas.....	20
1.5 Diagnóstico de la infección por <i>H. pylori</i> .....	20
1.6 Pruebas invasivas .....	20
1.6.1 Cultivos.....	20
1.7 Métodos no invasivos.....	22
1.7.1 Prueba del aliento (Urea Breath Test: UBT).....	22
1.8 Tratamiento .....	24
1.9 Pautas de tratamiento.....	24
1.10 Antiácidos.....	25
1.10.1 Compuestos de bismuto .....	25
1.11 Antimicrobianos .....	25
1.11.1 Amoxicilina .....	25
1.12 Tratamientos para alérgicos a la penicilina .....	26
1.13 Causas del fracaso en los tratamientos .....	27
1.14 Patogenia .....	27

1.15 Factores de patogenicidad implicados en la colonización de la mucosa gástrica.....	27
1.15.1 Actividad ureasa.....	28
1.15.2 Sistemas antioxidantes.....	28
1.15.3 Flagelos.....	29
1.15.4 Adhesinas.....	29
1.16 Factores implicados en el daño de la mucosa gástrica .....	31
1.16.1 <i>VacA</i> (vacuolating citotoxin).....	31
1.17 Otros factores .....	34
1.17.1 Tip $\alpha$ (TNF- $\alpha$ inducing protein).....	34
1.18 EL hierro .....	35
1.18.1 Adquisición de hierro en <i>H. pylori</i> .....	35
1.18.2 Almacenaje de hierro en <i>H. pylori</i> .....	38
1.19 Chaperonina GroEL.....	38
1.19.1 Chaperonina GroES.....	39
1.19.2 GroEL es una proteína moon lighting .....	41
II. JUSTIFICACIÓN .....	42
III. HIPÓTESIS.....	43
IV. OBJETIVOS.....	44
OBJETIVO GENERAL.....	44
OBJETIVOS PARTICULARES.....	44
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	45
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
1. Cepas bacterianas .....	46
2. Condiciones de crecimiento bacteriano.....	46
2.1 <i>H. pylori</i> crecida en ayuno de hierro, hemina o hemoglobina.....	46
3. Visualización microscópica de <i>H. pylori</i> y <i>E. coli</i> por tinción de Gram.....	46
4. Obtención de proteínas .....	47
4.1 Proteínas secretadas de <i>H. pylori</i> .....	47
4.1.2. Proteínas secretadas de <i>E. coli</i> .....	47
4.2 Proteínas totales .....	47

4.2.1. <i>H. pylori</i> .....	47
4.2.2. <i>E. coli</i> .....	48
5. Determinación de la concentración de proteínas.....	48
6. Resolución de las proteínas en geles SDS-PAGE.....	48
7. Tinción de proteínas con azul de Coomassie.....	48
8. Western Blot.....	49
8.1 .1. Transferencia.....	49
8.1.2. Inmunodetección.....	49
8.1.3. Cuantificación de intensidad de señal por densitometría.....	50
9. Actividad de plegamiento.....	50
9.1. Preparación de la rodanasa.....	50
9.2. Desnaturalización de la rodanasa.....	50
9.3. Ensayo de replegamiento de la rodanasa.....	50
10. Ensayo de actividad de la rodanasa.....	51
11. Actividad de plegamiento a diferentes pH.....	51
12. Análisis estadístico.....	51
VII. RESULTADOS.....	52
1. Crecimiento de <i>H. pylori</i> en diferentes fuentes de hierro.....	52
2. Visualización microscópica de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> por tinción de Gram.....	53
3. Obtención de proteínas secretadas y totales.....	54
4. Geles de poliacrilamida SDS-PAGE.....	54
5. Los anticuerpos anti-GroEL y anti- $\beta$ galactosidasa de <i>E. coli</i> tienen reacción cruzada con las proteínas homólogas de <i>H. pylori</i> .....	57
6. Inmunodetección de HpGroEL en diferentes fuentes de hierro.....	57
7. HpGroEL tiene actividad de chaperonina.....	61
8. Actividad de plegamiento de HpGroEL a diferentes valores de pH.....	64
8.1.1. HpGroEL no mostró actividad de plegamiento a pH 2.....	64
8.1.2. HpGroEL mostró actividad de chaperonina a pH 4.....	67
8.1.3. HpGroEL mostró actividad de plegamiento a pH 7.....	70
8.1.4. HpGroEL no mostró actividad de plegamiento a pH 8.....	73
9. ANOVA.....	76

VII. DISCUSIÓN .....	77
IX. CONCLUSIONES.....	79
X. BIBLIOGRAFÍA .....	80
XI. ANEXOS .....	91
Soluciones.....	91
Congresos.....	97

# LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** La estructura de *Helicobacter pylori*.

**Figura 2.** Prevalencia mundial de la infección por *H. pylori*.

**Figura 3.** Estructura y diversidad alélica de *vacA*.

**Figura 4.** Adquisición de hierro en *H. pylori*.

**Figura 5.** Arquitectura típica de las chaperoninas de tipo I.

**Figura 6.** Vista lateral del complejo asimétrico que forman GroEL–GroES.

**Figura 7.** Cultivos de *H. pylori* bajo diferentes fuentes de hierro.

**Figura 8.** Tinción de Gram.

**Figura 9.** Tinción de Gram al sobrenadante.

**Figura 10.** Electroforesis por SDS-PAGE 12% de las proteínas totales y secretadas de *E. coli* y *H. pylori*.

**Figura 11.** *H. pylori* secreta y expresa mayor cantidad de HpGroEL.

**Figura 12.** Densitometría del Western blot con anti- $\beta$  galactosidasa.

**Figura 13.** Densitometría del Western blot con anti-GroEL.

**Figura 14.** HpGroEL en las proteínas totales y secretadas mostró actividad de plegamiento.

**Figura 15.** EcGroEL en las proteínas totales mostró actividad de plegamiento.

**Figura 16.** HpGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 2.

**Figura 17.** EcGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 2.

**Figura 18.** HpGroEL en las proteínas secretada mostró actividad de plegamiento a pH 4.

**Figura 19.** EcGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 4.

**Figura 20.** HpGroEL en las proteínas secretadas mostró actividad de plegamiento a pH 7.

**Figura 21.** EcGroEL de las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 7.

**Figura 22.** HpGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 8.

**Figura 23.** EcGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 8.

## **LISTA DE TABLAS**

**Tabla 1.** Fármacos, dosis y duración de los tratamientos erradicadores de *H. pylori*.

## ABREVIATURAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
°C	Grado centígrado
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albúmina de suero bovino
MOPS	Ácido 3-n-morfolino propanosulfónico
Cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
D. O	Densidad Óptica
DTT	Ditiotreitol
g	Gravedad
h	Hora
Hb	Hemoglobina
Hem	Hemina
kDa	Kilodalton
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
PBST	Amortiguador de fosfatos salino y tween
pH	Potencial de hidrogeno
PM	Peso Molecular
PSA	Persulfato de Amonio
rpm	Revoluciones por minuto

SDS	Dodecil sulfato sódico
TEMED	N, N, N', N', tetrametilen-diamina
Tris	Tris (hidroximetil)- aminometano
V	Voltaje

## RESUMEN

*Helicobacter pylori* es un patógeno Gram negativo que habita en el epitelio gástrico humano. La infección causada por esta bacteria puede provocar úlceras pépticas y desarrollar cáncer de estómago.

Éste patógeno necesita hierro para sobrevivir, y puede utilizar hemoglobina humana, hemina o transferrina como fuente alterna. Para obtener hierro *H. pylori* expresa proteínas tales como FrpB1, FrpB2 o FrpB3.

Adicionalmente se ha reportado una proteína secretada que une el grupo hemo, la chaperonina HpGroEL. Creemos que esta característica es propia de *H. pylori* porque GroEL de *E. coli* no la tiene. Además, *H. pylori* secreta la chaperonina, mientras que *E. coli* no. Desafortunadamente, no sabemos si la chaperonina tiene actividad de plegamiento y si la expresión del gen está regulada por las diferentes fuentes de hierro. Por este motivo, en este trabajo se investigaron ambas características. Nuestros resultados corroboraron que *H. pylori* secretaba HpGroEL, adicionalmente investigamos si la secreción de HpGroEL estaba regulada por las diferentes fuentes de hierro. Además, la cantidad de chaperonina secretada fue mayor que la de las proteínas totales. La capacidad de plegamiento también se analizó para HpGroEL, la cual mostró actividad de plegamiento en un mayor rango de pH en comparación de GroEL de *E. coli*. En síntesis, nuestros resultados indican que HpGroEL se secreta y es capaz de plegar proteínas pH 4, 5 y 7.

Sugerimos que HpGroEL es secretada para mantener su correcto plegamiento de la ureasa y otras proteínas con la finalidad de soportar el ambiente hostil del estomago

# INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes del descubrimiento de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*)

Gran parte de las infecciones bacterianas humanas se descubrieron a finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Sin embargo la visualización de las bacterias con forma de espiral en el estómago no era algo novedoso, previamente en 1893 el italiano Giulio Bizzozero hizo una descripción similar en estómagos de perros y gatos (Bizzozero, 1893).

Después de confirmar los hallazgos en animales en 1896, Salomon logra encontrar bacterias helicoidales en humanos (Salomon, 1896).

En 1899 Walery Jaworski es el primer investigador en proponer la probable asociación patógena de esta bacteria con las enfermedades gástricas (Jaworski, 1899).

Posteriormente en 1906 Krienitz encontró estos organismos en pacientes que tuvieron cáncer gástrico (Krienitz, 1906). En 1938 Doenges realiza el primer estudio sistemático en estómagos de humanos, donde el 43% de las muestras estudiadas contenían la bacteria helicoidal (Doenges, 1938). Dos años más tarde, Freedberg y Barron dan a conocer la presencia de bacterias helicoidales en la mucosa gástrica (Freedberg, 1940). Sin embargo en 1954 Palmer realizó un estudio en 1100 muestras gástricas y no encontró presencia de la bacteria helicoidal proponiendo que el estómago era un órgano estéril y que las bacterias encontradas provenían de contaminación microbiana de la boca (Palmer, 1954).

En 1975 Steer y Colin Jones al estudiar muestras de pacientes con úlceras gástricas con ayuda de la microscopia electrónica observaron la presencia de microorganismos helicoidales en la mucosa gástrica asociados a respuesta inflamatoria (Steer, 1975). A continuación, los experimentos realizados por Warren y Marshall, lograron el cultivo de la bacteria con ayuda de la metodología para poder aislar a *Campylobacter* spp, lo cual constituyó un gran avance en el campo

(Skirrow, 1977). En 1983 identifican al bacilo y lo denominan *Campylobacter pyloridis*, apareciendo en las publicaciones científicas como *Campylobacter pylori* (Marshall, 1987).

La primera observación de *H. pylori* se da en el año 1979 por el patólogo australiano Robin Warren quien describía bacterias en forma de espiral encontradas entre la mucosa y la superficie del epitelio gástrico de biopsias de diferentes pacientes con gastritis crónica proponiendo una asociación entre la bacteria con dicha enfermedad, (Marshall, 1983). En 1981 el gastroenterólogo australiano Barry Marshall confirma los hallazgos de Warren, ambos inician un estudio prospectivo con pacientes sometidos a endoscopia oral y en 1982 logran cultivar por primera vez a la bacteria de muestras de mucosa gástrica de 11 pacientes (Marshall, 1984).

En 1985, Marshall demuestra que el microorganismo cumple con los postulados de Koch, al ingerir una cepa cultivada de un paciente de 66 años, al cabo de dos semanas comienza a presentar los mismos síntomas que el paciente, y en las biopsias de su mucosa gástrica, se observaron los mismos bacilos (Marshall, 1985). Este mismo experimento fue realizado por Morris en 1987 (Morris, 1987).

Estudios de secuenciación posteriores de la región 16s del ARN ribosomal ayudaron a determinar que la especie era distinta del resto de las *Campylobacter*, por lo que en 1989 se concluye que su género es *Helicobacter* y su especie es *pylori* (Goodwin, 1989).

## 1.2 Microbiología

*H. pylori* es un bacilo gram negativo, curvado, móvil, no fermentador, no oxidante y microaerofílico, que se localiza en la mucosa gástrica de los humanos.

### La estructura de *Helicobacter pylori*

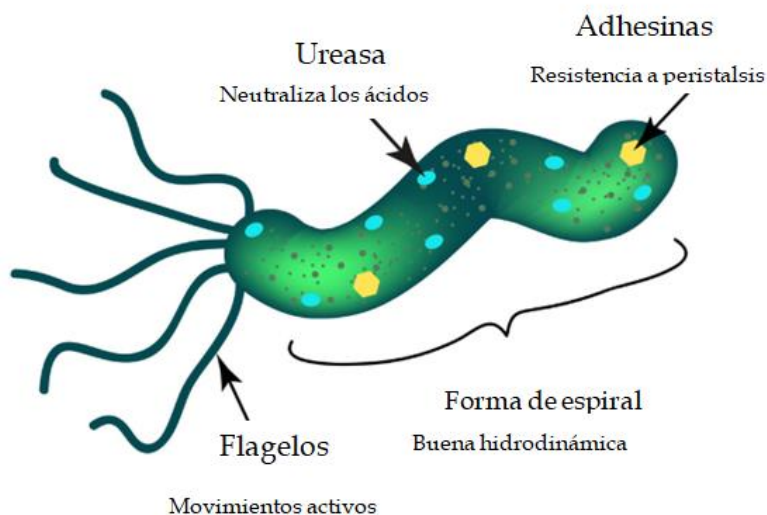


Figura 1. La estructura de *Helicobacter pylori*. (Mikrostoker, 2017)

Su morfología es de espiral cuando se le observa en la mucosa gástrica, sin embargo esta forma puede perderse cuando es cultivada en medios artificiales o muy viejos en los cuales puede adoptar una forma de coco. Tiene un tamaño promedio de 0.5 a 1.0  $\mu$  de ancho y 3.0  $\mu$  de largo y suele tener de 2 a 4 flagelos monopolares, los cuales son esenciales para facilitar su movilidad, tanto los flagelos como su membrana externa están recubiertos por una vaina lipídica, la cual parece tener como finalidad proteger a los flagelos de la degradación provocada por el ácido estomacal (Amieva, 2008).

Para cultivar *H. pylori* es necesario enriquecer los medios con suero o sangre, los cuales ayudan a la bacteria a obtener nutrientes extras y a protegerla de los efectos de los ácidos grasos de cadena larga. Estos efectos también puede ser reducidos o evitados si al medio de cultivo se le adiciona IsoVitaleX,  $\beta$ -ciclodextrinas o carbón

activado. Se recomienda también añadir mezclas de antibióticos que contengan vancomicina, trimetoprim, y anfotericina para evitar el crecimiento de contaminantes. La temperatura óptima para su crecimiento es a 37 °C, aunque puede adaptarse a temperaturas de 35 a 39 °C, en condiciones de microaerofilia (con concentraciones aproximadas de 7% a 10% de CO<sub>2</sub>), en un pH con intervalo de 5.5 a 8.0 (Mégraud, 1995).

Todas las especies de *Helicobacter* poseen un mecanismo de metabolismo respiratorio además de ser quimioorganotrofas (obtienen su energía de reacciones de óxido-reducción y utiliza sustratos orgánicos), son asacarolíticas (no fermentan azúcares) con excepción de la glucosa la cual si se oxida. Carecen de la vía del glioxilato, pero tienen de manera parcial las vías metabólicas de pentosas fosfato y el ciclo de ácidos tricarboxílicos (Agudo, 2009).

Estas especies tienen actividad de ureasa, le permiten convertir la urea en amonio, generando un ambiente alcalino para resistir el medio ácido del estómago (Puig, 2016).

### **1.3 Epidemiología**

A nivel mundial existen variaciones en la prevalencia de *H. pylori* siendo los niveles altos en América del Sur, África y Medio Oriente.

La infección crónica provocada por *H. pylori* es la más prevalente del mundo, afectando a un 50% de la población. Sin embargo, solo el 15% de los individuos infectados desarrollarán úlcera péptica y solo de 1 a 3 % sufrirá cáncer gástrico.

Esta prevalencia es mayor en países con un nivel socioeconómico bajo como India y África, por otro lado en países más desarrollados como los nórdicos la prevalencia disminuye. En México se estima que del 55% de la población está infectada (Burkitt, 2017).

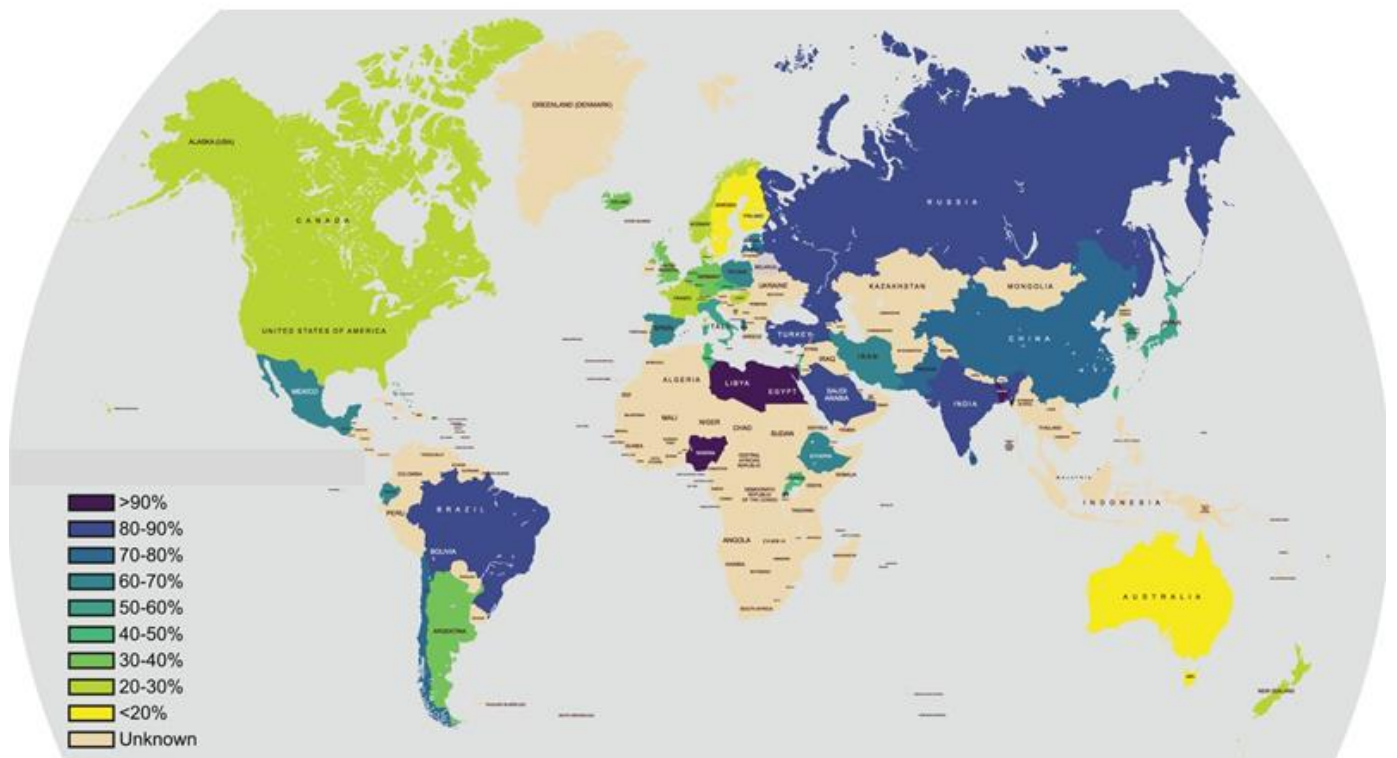


Figura 2. Prevalencia mundial de la infección por *H. pylori* (Burkitt, 2017).

A pesar de que no se conoce con exactitud la vía de transmisión, se han propuesto tres opciones: oral-oral, debido a que en la saliva y en la placa dental se ha logrado encontrar *H. pylori* (Axon, 1995). Gastro-oral, algunos brotes se han asociado al mal manejo y desinfección de gastroscopios (Axon, 1995). Fecal-oral que por medio de PCR se ha logrado identificar *H. pylori* en heces (Nilsson, 1996).

Existen dos patrones de seroprevalencia frente a *H. pylori*: El primero incluye poblaciones con una tasa de infección elevada durante la infancia típico en regiones del tercer mundo y el segundo incluye poblaciones industrializadas con un bajo nivel de seroprevalencia en la niñez, con un incremento gradual en función de la edad. Ambos patrones reflejan una correlación inversa entre el riesgo de infección y la situación socioeconómica (Bruce, 2008).

Algunos factores dependientes del hospedero o de *H. pylori* pueden intervenir en la evolución de esta infección hacia un estado crónico asintomático o al desarrollo

de manifestaciones clínicas. Por esto, los datos obtenidos de seroprevalencia se deben interpretar con cautela, ya que en ocasiones se dan aparentes contradicciones entre los niveles de prevalencia y la incidencia real de la enfermedad. Siendo este el caso de los denominados “enigmas” africanos y asiáticos (Holcombe, 1992).

En África a pesar de la alta prevalencia e infección en individuos de todas las edades, las tasas de adenocarcinoma son muy bajas. Una posible explicación para esto serían los factores relacionados con la virulencia los cuales varían entre cepas, el polimorfismo genético humano y el tipo de dieta (Graham, 2009).

En Asia la infección es más frecuente en países poco desarrollados como Pakistán, Tailandia, India o Bangladesh, teniendo niveles de seroprevalencia de 55 a 90% en adultos. No obstante, en Japón la seroprevalencia es menor, pero su tasa de cáncer gástrico es mayor, posiblemente a que la mayor parte de los infectados por *H. pylori* son de cepas cag positivas. En Asia se ha reportado la existencia de dos tipos de cepas cag positivas, la variante asiática Oeste y la variante asiática del Este, siendo esta última la cepa con mayor asociación a cáncer gástrico, atrofia de la mucosa gástrica y mayores grados de inflamación (Agudo, 2009).

#### **1.4 Clínica de la infección**

La infección con *H. pylori* puede provocar sintomatología variable (inflamación de la mucosa gástrica, úlceras pépticas, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT), cáncer de estómago. Sin embargo, sólo el 15% de las pacientes infectados desarrollarán dichos síntomas (Pakodi, 2000).

Se desconoce por qué en algunos pacientes la enfermedad es asintomática mientras que en otros se desencadenan enfermedades gástricas de diferente gravedad. Se piensa que los factores genéticos, ambientales o de patogenicidad de *H. pylori* pueden tener efectos en el desarrollo de la enfermedad (Höcker, 2003).

## **1.4.1 Manifestaciones digestivas**

### **1.4.1.1 Gastritis**

La gastritis que se inicia después de la infección de *H. pylori* se puede desarrollar de manera asintomática, o manifestarse como una gastritis aguda normal (vómitos, náuseas y dolor epigástrico). La gastritis crónica se distingue por infiltración inflamatoria crónica, constituida por células plasmáticas y linfocitos, con presencia de folículos linfoides. La gastritis crónica puede evolucionar hacia la atrofia que afecta al antro estomacal y se puede expandir en dirección del estómago (Suerbaum, 2002).

La colonización constante de *H. pylori* a la mucosa gastroduodenal provoca inflamación con un infiltrado mixto en el que los leucocitos polimorfonucleares son predominantes, aunque también hay células plasmáticas y linfocitos, dando lugar a la gastritis crónica activa. La sintomatología relacionada a la gastritis causada por *H. pylori* puede ser muy variable. Se puede expresar con un cuadro similar con la dispepsia no ulcerosa (Di Lorenzo, 2005).

### **1.4.1.2 Dispepsia**

Se define como la presencia de dolor o ardor epigástrico (Stanghellini, 2016). La dispepsia puede ser secundaria a un trastorno orgánico o funcional. Si los síntomas disminuyen después del tratamiento contra la infección, se considera una dispepsia secundaria a la infección, pero si los síntomas persisten se considera una dispepsia funcional (Moayyedi, 2006).

Ante la presencia de dispepsia, existen 3 estrategias posibles: Endoscopia digestiva alta, investigar a *H. pylori* mediante métodos no invasivos y tratarlo con inhibidores de la bomba de protones (Malfertheiner, 2012).

En pacientes jóvenes que no presentan síntomas graves se recomienda hacerles estudios no invasivos, pero si los síntomas son alarmantes, se debe hacer una endoscopia digestiva alta para descartar cáncer gástrico, en caso de que ambos

tratamientos no funcionen, la bomba de protones sería la opción de tratamiento (Gisbert, 2013).

La dispepsia funcional es la que ha sido investigada y no se ha encontrado una causa que pueda justificar la sintomatología, tiene una fisiopatología compleja en la que participan el sistema nervioso central, una disminución de la distensibilidad gástrica, hipersensibilidad visceral, por lo tanto el tratamiento es complicado y varía según el paciente (Stanghellini, 2016).

#### **1.4.1.3 Dispepsia no ulcerosa**

Este síndrome se ha atribuye a la presencia de *H. pylori*, la cual ha sido identificada en las biopsias por medio de una prueba rápida de ureasa (Carmona, 2004).

#### **1.4.1.4 Úlceras pépticas**

Se sabe que el 70% de pacientes con úlcera duodenal están infectados con *H. pylori* (Dehesa, 1997). Pero solo el 15% de los pacientes desarrolla úlceras pépticas, las cuales se cree están relacionados con una susceptibilidad genética, infección con cepas más agresivas, la edad en la cual se contrae la infección y factores ambientales (Tytgat, 2003). Se ha reportado que personas portadoras del grupo sanguíneo tipo O también aumentan el riesgo de padecer úlcera péptica (Forné, 2001).

#### **1.4.1.5 Adenocarcinoma gástrico**

Desde el año 1994 se clasificó a *H. pylori* como un agente carcinogénico de categoría I, considerado como el más infeccioso y prevalente por delante del virus del papiloma humano, virus de la hepatitis B y C y del VIH, representando un riesgo 8 veces mayor para desarrollar tumores gástricos. (De la Torre, 2003). *H. pylori* provoca el 5.5% de los 1.9 millones de tumores malignos provocados por agentes carcinogénicos infecciosos (Parkin, 2006). Sin embargo, menos del 5% de pacientes

infectados lo desarrollan. La erradicación de *H. pylori* disminuye la incidencia y el riesgo de recurrencia de adenocarcinoma gástrico (Boneca, 2003).

#### **1.4.1.6 Linfoma MALT**

El linfoma gástrico asociado a mucosas (MALT) relacionado con la infección por *H. pylori* representa alrededor del 10% de los linfomas y cerca de un 3% de las neoplasias gástricas, debido a un estímulo autoinmune antigénico crónico, además las personas infectadas con *H. pylori* tienen 6 veces más de probabilidades de adquirir un linfoma asociado a mucosas (Pineda, 2007).

#### **1.4.1.7 Reflujo gastroesofágico (RGE)**

La relación entre RGE y *H. pylori* ha sido discutida en los últimos años, ya que estudios epidemiológicos sugieren una relación inversa entre la prevalencia de *H. pylori* y la severidad de los síntomas por RGE (O'Connor, 1999). De igual modo, la incidencia de esófago de Barrett y adenocarcinoma esofágico es mayor en pacientes *H. pylori* negativos, lo que sugiere un papel protector de la infección frente a estas entidades (Rokkas, 2007). Sin embargo, otros estudios han demostrado que la presencia o ausencia de la infección por *H. pylori* no tiene un efecto sobre la severidad o la recurrencia de los síntomas del RGE ni en la eficacia del tratamiento antisecretor (Yaghoobi, 2010).

### **1.4.2 Manifestaciones extradigestivas**

#### **1.4.2.1 Anemia ferropénica refractaria**

Diversos meta-análisis han descrito una relación entre la anemia y la infección (Muhsen, 2008), posteriormente se demostró que la hemoglobina y la sideremia aumentaban tras el tratamiento erradicador (Huang, 2010). Por último, un ensayo de 16 análisis clínicos comprobó que el tratamiento combinado (hierro y erradicador) era superior a la ferrotterapia aislada (Yuan, 2010).

#### **1.4.2.2 Déficit de vitamina B12**

Un meta-análisis con 2,400 pacientes encontró una diferencia significativa en los niveles de vitamina B12 de los pacientes infectados contra los no infectados. Un sub análisis que incluyó 5 pacientes demostró que la eliminación de la infección causada por *H. pylori* mejoraba los niveles de cobalamina. La infección por *H. pylori* no es la causa más frecuente de déficit de vitamina B12 (Andres, 2009).

#### **1.4.2.3 Púrpura trombocitopénica idiopática**

Una revisión sistemática y un meta-análisis incluyendo 25 diferentes estudios y 700 pacientes demostró un aumento significativo de las plaquetas en el 50% de los pacientes después el tratamiento erradicador (Stasi, 2009).

#### **1.4.2.4 Retraso en el crecimiento**

En la década los 90, varias investigaciones encontraron una relación significativa entre la infección y el retraso de la talla de los niños y adolescentes, aseverando que la infección podría afectar el crecimiento (Cohem, 1991). Estudios posteriores no han detectado ninguna evidencia del papel de *H. pylori* en relación con el retraso de la talla pero sí con el estatus socioeconómico. Tomando en cuenta que la prevalencia de la enfermedad es mayor en niños de países en desarrollo sometidos a un mayor riesgo de diarrea y desnutrición, esta podría ser la causa del retraso en la talla más que la colonización por *H. pylori* (Bruce, 2008). Otra posible explicación sería la afectación a la hormona del crecimiento en los niños infectados. Últimamente se ha comprobado que el estómago es una fuente de leptina y grelina y que la colonización por *H. pylori* y la dispepsia provocan un aumento de los niveles de leptina y una disminución en los niveles de grelina, repercutiendo en el aporte calórico y afectando secundariamente al índice de masa corporal (Weigt, 2009).

### **1.4.3 Otras manifestaciones extra digestivas**

Se ha relacionado la infección por *H. pylori* con la aparición de urticaria al encontrarse valores elevados de anticuerpos específicos tipo IgG frente a *H. pylori* en algunos casos de pacientes con urticaria crónica (Cuevas, 2006).

### **1.5 Diagnóstico de la infección por *H. pylori***

Los factores de patogenicidad de la bacteria son múltiples, por eso los estudios a seguir deben tener el objetivo de lograr un diagnóstico adecuado para ofrecer el mejor tratamiento en caso de ser necesario. Las pruebas diagnósticas se han basado en detectar características específicas de la bacteria, por ejemplo en la capacidad que tiene para colonizar el estómago y producir ureasa, la presencia de la bacteria en heces y placas dentales dispepsia crónica y úlcera péptica duodenal (Pounder, 1995).

Los infección por *H. pylori* puede detectarse por medio de métodos invasivos y no invasivos. Una prueba ideal sería una mínimamente no invasiva, económico, disponible en la mayoría de los centros de salud y que sea capaz de diferenciar una infección activa. Sin embargo, ninguno de los métodos actuales cumple con estas características. Todas las pruebas presentan ventajas y desventajas. Para elegir un método óptimo es necesario tener en cuenta las características del paciente (Steven, 2005).

### **1.6 Pruebas invasivas**

#### **1.6.1 Cultivos**

Es el método con especificidad del 100% para el diagnóstico de infección por *H. pylori*, sin embargo la sensibilidad reporta variaciones del 60% a 90% ya que está afectada directamente por la densidad bacteriana, el tiempo entre la toma de muestra y el proceso, los tratamientos previos con antibióticos. Para conseguir mejores resultados en los cultivos se recomienda la utilización de un medio no

selectivo el cual es suplementado con sangre, y un medio selectivo con diferentes antibióticos (Bernal, 2007).

### **1.6.2 Histología**

Por medio de tinciones de Gram se puede identificar a *H. pylori* en las muestras de biopsias. Esta técnica tiene una sensibilidad cercana al 90% y especificidad aproximada al 100% (Gómez, 1999).

Otras tinciones utilizadas son con hematoxilina-eosina y Giemsa, las cuales permiten una rápida identificación de la bacteria. Los falsos negativos en las pruebas de histología son raros y suelen ser por error de muestreo o presencia escasa de bacterias debido a tratamientos anteriores a la endoscopia (Bernal, 2007).

La sensibilidad de la técnica depende de la densidad de las bacterias, tomando en cuenta que un mínimo de 10,000 bacterias en la muestra dan un resultado positivo, pueden presentarse falsos negativos si la cantidad de bacterias en la muestra es muy escasa, debido a tratamientos previos con inhibidores de la bomba de protones, sales de bismuto, antibióticos o errores de muestreo (Bernal, 2007).

### **1.6.3 Prueba rápida de ureasa**

En la biopsia de la mucosa gástrica se puede detectar *H. pylori* por la actividad de la ureasa de este microorganismo. La ureasa hidroliza a la urea para convertirla en amonio y en anhídrido carbónico, reacción alcalina que modifica el color en un indicador de pH con rojo fenol, el cual cambia de color amarillo a buganvilia. Cuando se verifica la reacción el cambio de color puede ser rápido si existe una mayor densidad bacteriana. Actualmente los endoscopías cuentan con soluciones comerciales como Pylori-test y CLO-test, las cuales reportan sensibilidades de 90 a 95% y especificidades de 95 a 100%. Los resultados de falsos positivos con la prueba rápida de ureasa son poco frecuentes, en ocasiones pueden ser por la contaminación de las biopsias a causa de otras bacterias productoras de ureasa como los *estreptococos* y *estafilococos* (González, 2004).

#### **1.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Una de las ventajas de esta prueba es que el ADN se puede utilizar para diferentes estudios además del diagnóstico de la infección. También se ha utilizado la PCR en tiempo real la cual permite la detección de cepas resistentes a antibióticos. También se han desarrollado varias técnicas para poder detectar el ADN de *H. pylori* en muestras como de heces, saliva o agua (Simala-Grant, 2004). Los objetivos de este tipo de pruebas han sido: detección de genes específicos de la bacteria, como lo es el gen de la ureasa entre otros (Woo, 2009). La detección de mecanismos de resistencia, donde el método de la PCR ha sido exitosa para detectar la resistencia a claritromicina debido a que son capaces de detectar mutaciones puntuales en el gen 23S ARNr, que confieren resistencia a este antimicrobiano. También se ha podido detectar la resistencia a tetraciclina, debida a mutaciones en el 16S ARNr (Alarcón, 2003). Esta técnica es útil también para la detección de factores de virulencia como los tipos del gen *vacA* (Yamazaki, 2005), y para comparar aislamientos de *H. pylori* cultivados del mismo paciente o de familiares (Achtman, 1999)

#### **1.6.5 Hibridación *in situ***

La infección puede ser detectada por medio de sondas para hibridación *in situ* fluorescentemente utiliza tejido proveniente de biopsias gástricas. Estas sondas se unen al 16S ARNr de *H. pylori*. También se puede detectar la resistencia a claritromicina si estas sondas reconocen al 23S ARNr. Esta prueba se puede realizar en tres horas (Caristo, 2008).

### **1.7 Métodos no invasivos**

#### **1.7.1 Prueba del aliento (Urea Breath Test: UBT)**

Prueba indirecta para detectar a la ureasa de *H. pylori*. Si la bacteria se encuentra en el estómago, va a hidrolizar la urea ingerida previamente y va a liberar CO<sub>2</sub> que se difunde en la sangre y es transportado a los pulmones y liberado con el aliento. Es

uno de los métodos no invasivos más seguros para poder detectar la presencia de *H. pylori*. Esta prueba indica una infección actual por la bacteria, debido a que si no lo fuera, la prueba saldría negativa. Debido a esto, es una prueba útil para realizarla de 4 a 6 semanas después de haber concluido el tratamiento (Malfertheiner, 2012).

### **1.7.2 Antígeno en heces**

Es un método cualitativo, directo, que permite la detección del antígeno de *H. pylori* en las heces. Hay varios sistemas comerciales que permiten detectar la presencia de antígeno en heces con anticuerpos poli y monoclonales, obteniendo mejores resultados con estos últimos. Es una prueba válida para establecer el diagnóstico inicial, verificar la eficacia del tratamiento y comprobar una reaparición de la infección. Las ventajas son la fácil obtención y conservación de las muestras, por lo mismo es muy útil para realizarla en niños pequeños (Raguza, 2005).

### **1.7.3 Serología**

Este tipo de pruebas se basan en la detección de anticuerpos específicos frente *H. pylori* en suero. Resulta útil en los estudios de poblaciones seleccionadas, pero su principal problema es que no permite diferenciar la infección activa de la exposición previa al microorganismo, la cual provoca una respuesta inmunitaria tanto local como sistemática. El sistema inmune reacciona con un aumento transitorio de IgM, seguido de un aumento de anticuerpos de tipo IgA e IgG presentes en la infección. Debido a que los anticuerpos IgM se detectan solo de manera transitoria, tienen poco valor para el diagnóstico. La respuesta principal sistémica es de tipo IgG, por lo que la detección de este tipo de anticuerpos es la más común para el diagnóstico (López-Brea, 1998).

### **1.7.4 Endoscopia**

Los reportes dados por los endoscopistas respecto a la mucosa de pacientes infectados con *H. pylori* describen las gastropias como: nodular, folicular,

eritomatosa, duodenitis erosiva y metaplasia hasta en el 10% de las series (Díaz, 2006).

### **1.8 Tratamiento**

Se recomienda tratar la infección de *H. pylori* en las siguientes situaciones (Gisbert, 2013):

- Déficit de vitamina B12 no explicable por otras causas.
- Anemia ferropénica por causa no aclarada.
- Familiares de primer grado de pacientes con cáncer gástrico.
- Metaplasia intestinal.
- Dispepsia funcional.
- Úlcera péptica
- Linfoma MALT de bajo grado

### **1.9 Pautas de tratamiento**

Las pautas para erradicar la infección combinan 2 o 3 antimicrobianos y un compuesto anti ulceroso que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico. La duración habitual de la terapia es de 8 días (Oderda, 2007) aunque se ha demostrado que los tratamientos que se extienden por 14 días consiguen mayores tasas de erradicación (Villoria, 2008). Si el tratamiento falla no se debe repetir y se recomienda realizar estudios microbiológicos (Mégraud, 2004).

En la IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *H. pylori* se consideró que un tratamiento erradicador efectivo debía tener una tasa de curación cercana al 90%, la duración del tratamiento, la dosis y posología óptimos de los antibióticos (Tabla 1).

Fármacos, dosis y duración de los tratamientos erradicadores para la infección por <i>Helicobacter pylori</i>			
Tratamiento	Fármacos	Posología	Duración (días)
Terapia cuádruple sin bismuto (concomitante)	IBP	Dosis estándar <sup>a</sup> / 12 h	14
	Amoxicilina	1 g/12 h	
	Claritromicina	500 mg/12 h	
	Metronidazol	500 mg/12h	
Terapia cuádruple con bismuto Pylera <sup>®</sup>	IBP	Dosis estándar/12 h	10
	Pylera <sup>®</sup>	3 cápsulas/6 h	
Terapia cuádruple con bismuto clásica	IBP	Dosis estándar/12 h	10-14
	Subcitrato de bismuto	120 mg/6 h o 240 mg/12 h	
	Doxiciclina <sup>b</sup>	100 mg/12 h	
	Metronidazol	500 mg/8 h	
Terapia cuádruple con levofloxacino y bismuto	IBP	Dosis estándar <sup>a</sup> / 12 h	14
	Amoxicilina	1 g/12 h	
	Levofloxacino	500 mg/24 h	
	Subcitrato de bismuto	240 mg/12 h	
Terapia triple con levofloxacino	IBP	Dosis estándar/12 h	14
	Amoxicilina	1 g/12 h	
	Levofloxacino	500 mg/24 h	
Terapia triple con rifabutina	IBP	Dosis estándar/12 h	10
	Amoxicilina	1 g/12 h	
	Rifabutina	150 mg/12 h	

Tabla 1. Fármacos, dosis y duración de los tratamientos erradicadores de *H. pylori* (Gisbert y cols, 2016).

## 1.10 Antiácidos

### 1.10.1 Compuestos de bismuto

Actúan como citoprotectores, aumentan la producción de las prostaglandinas en la mucosa gástrica, evitan la adherencia de *H. pylori* y destruyen la integridad de la pared bacteriana. Sin embargo, el mecanismo de acción de estos compuestos es desconocido (McCool, 1998).

### 1.10.2 Inhibidores de la bomba de protones (IBP)

Inhiben de forma reversible la enzima H-K ATPasa, bloqueando toda secreción de ácido (Laine, 2000).

## 1.11 Antimicrobianos

### 1.11.1 Amoxicilina

La amoxicilina ha sido útil en el tratamiento de la infección por *H. pylori* y se utiliza en diferentes pautas del tratamiento. Es el betalactámico más estable en el medio

ácido y el que alcanza mayores concentraciones en tejidos después de una dosis oral (Rimbara, 2007). En Europa la resistencia a la amoxicilina es menor del 1%, sin embargo en otros países como Irán la resistencia es de 56% (Raffeey, 2007).

#### **1.11.2 Metronidazol**

Junto con las sales de bismuto y la amoxicilina, tiene tasas muy altas de erradicación (López-Brea, 1999). Cuando en metronidazol ingresa a las células por difusión pasiva, es reducido por proteínas de transporte de electrones de bajo potencial redox, exclusivas de ciertas bacterias y parásitos anaerobios. El metronidazol reducido produce la pérdida de la estructura helicoidal del ADN inhibiendo la síntesis de los ácidos nucleicos y la muerte celular. El porcentaje de resistencia a metronidazol es mayor en los países subdesarrollados, por el alto consumo de este antibiótico para tratar enfermedades parasitarias (Albert, 2006).

#### **1.11.3 Rifabutina**

Este antibiótico es usado para infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* o *Legionella* spp, sin embargo se ha notado una alta eficacia contra *H. pylori*. Este antibiótico inhibe el inicio de la síntesis del ARN al inhibir a la ARN polimerasa. La resistencia a la rifabutina es baja (Glocker, 2007).

#### **1.11.4 Levofloxacino**

Se ha utilizado con éxito para erradicar a *H. pylori*. El mecanismo de acción consiste en la inhibición de la replicación del ADN por su unión a las topoisomerasas, inhibiendo la acción de la ADN girasa cuya función principal es la de mantener el ADN enrollado para facilitar la formación de los complejos en el proceso de replicación y transcripción. La resistencia a este fármaco es baja (Kim, 2005).

### **1.12 Tratamientos para alérgicos a la penicilina**

Para este tipo de pacientes se recomienda un tratamiento cuádruple con bismuto (IBP, bismuto, tetraciclina y metronidazol) durante 14 días, teniendo tasas de erradicación del 85% (Rodríguez, 2005).

### **1.13 Causas del fracaso en los tratamientos**

El fracaso de los tratamientos puede estar relacionado con dosis inadecuadas, una duración incorrecta, antibióticos erróneos, resistencia a fármacos e inclusive el tipo de cepa de *H. pylori* (Graham, 2008).

### **1.14 Patogenia**

La infección por *H. pylori* puede provocar en la mayoría de los pacientes usualmente adultos, gastritis crónica, a pesar de esto, existe una minoría de pacientes adultos que pueden desarrollar otro tipo de complicaciones como son las úlceras pépticas o adenocarcinoma y linfoma gástrico. (Puig, 2016). Se han hecho varios estudios para intentar relacionar los factores de virulencia con el desarrollo de la enfermedad provocada por *H. pylori*, algunos de estos factores son cagA, vacA y baba. Sin embargo, ninguno por si mismo puede explicar la patogenia, con lo cual se cree que la infección crónica puede tener un origen multifactorial y el riesgo aumenta conforme se acumulan más factores de virulencia. (Wen, 2009).

*H. pylori* provoca una fuerte respuesta inmune celular y humoral en la mucosa gástrica, a pesar de esto la infección no se puede erradicar y se provocan daños en el epitelio gástrico. Una vez que *H. pylori* logra colonizar, libera toxinas que provocan una respuesta inmune local, donde actúan principalmente los neutrófilos, después se produce una respuesta inflamatoria por la interacción con los linfocitos, macrófagos, células no inmunes y células mastoides las cuales van a liberar una gran cantidad de intermediarios químicos; cuando esta inflamación se convierte en crónica, se producen las úlceras pépticas, el adenocarcinoma y linfoma gástrico (Allen, 2008).

### **1.15 Factores de patogenicidad implicados en la colonización de la mucosa gástrica**

*H. pylori* presenta diferentes factores de virulencia y patogenicidad que le permiten tener presencia en el medio ácido gástrico del hospedero, colonizar un micronicho gástrico, permanecer en el hospedero y provocar enfermedad (Kuster, 2006).

### **1.15.1 Actividad ureasa**

La ureasa es la enzima más sintetizada por *H. pylori*, la cual aumenta sólo si el pH disminuye.

Este mecanismo le ayuda a protegerse durante el periodo de colonización o disminución de pH, mediante la acción de la enzima ureasa acumulada en el citoplasma y en la superficie de la bacteria. La ureasa es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de la urea presente en el estómago provocando que la urea se transforme en amonio y dióxido de carbono. El amonio producido modifica el pH del entorno a 6 ó 7, de esta manera *H. pylori* puede mantener un microambiente el cual le permite sobrevivir hasta llegar a la superficie de las células de la mucosa donde prácticamente el pH es neutro. Además la ureasa junto con el amonio provoca lesiones a la mucosa gástrica ayudando a la adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico (Parsonnet, 1998). El hábitat de *H. pylori* se encuentra debajo de la capa de la mucosa gástrica donde el pH es aproximadamente 7 (Bauerfeind, 1997).

La ureasa se puede regular mediante el transportador UreI dependiente de pH, el cual permite la entrada de urea, una vez que el pH llega a un valor de 6 ó 7 se inactiva, ya que un aumento de la alcalinidad podría matar a la bacteria (Agudo, 2009). Las proteínas de choque térmico GroEL y GroES tienen la capacidad de aumentar la actividad de la ureasa (Marcano, 2006).

### **1.15.2 Sistemas antioxidantes**

*H. pylori* es vulnerable a la toxicidad del oxígeno, es por eso que, durante el proceso de su colonización promueve una respuesta inflamatoria mediada por macrófagos y neutrófilos, los cuales generan una cantidad de metabolitos reactivos del oxígeno y para la reparación de daños sufridos lo cual favorece su supervivencia en el tejido inflamado. Dentro de los sistemas de detoxificación de los metabolitos reactivos al oxígeno se encuentra la enzima superóxido dismutasa, ésta cataliza la transformación de superóxido en peróxido de hidrógeno. También se encuentra la catalasa o peroxidasa que catalizan la descomposición del peróxido

de hidrógeno en agua y oxígeno, este es el principal sistema antioxidante de *H. pylori* (Basu, 2004). Las peroxirredoxinas catalizan la reducción del peróxido de hidrógeno en alcohol y MdaB (flavoproteína), la cual es una NADHPH quinona reductasa que *H. pylori* expresa cuando debe compensar la pérdida de los componentes antioxidantes. La actividad enzimática de la superóxido dismutasa, catalasa y las peroxirredoxinas están aumentadas en las cepas cagA positivas.

En ocasiones los sistemas de detoxificación no son suficientes y puede ocurrir oxidación, llevada a cabo por un mecanismo que repara el ADN dañado como las proteínas RecA, UvrABC, RuvC, MutS y endonucleasa III (Agudo, 2009).

El gen *napA* que codifica a la proteína NAP, se identificó como una proteína que participaba en la activación de los neutrófilos, captando los iones ferrosos libres intracelulares gracias a su función de bacterioferritina. Esta proteína puede actuar como adhesina al ser secretada o expresada en la superficie bacteriana ya que tiene afinidad por las ceramidas presentes en las membranas plasmáticas celulares y por el grupo antigénico sanguíneo de Lewis (Long, 2009).

### **1.15.3 Flagelos**

La movilidad para *H. pylori* es fundamental para poder colonizar la mucosa gástrica, sus 2 a 6 flagelos monopolares están compuestos por dos flagelinas Fla A y Fla B, la más abundante es Fla A, mientras que Fla B se localiza en la base del flagelo. Estas le permiten a la bacteria tener una movilidad óptima para poder atravesar la mucosa gástrica y la adhesión al epitelio gástrico. La pérdida de estas flagelinas provocan inmovilidad a la bacteria y por lo tanto las cepas no logran colonizar al hospedero (Cervantes, 2006).

### **1.15.4 Adhesinas**

La adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico se lleva a cabo por diferentes adhesinas utilizando diferentes receptores, entre los cuales se encuentran glicerofosfolípidos, sulfátidos, secuencias repetidas de N-acetil-lactosamina, componentes de la matriz extracelular y glicoconjugados (Carlsohn, 2006). Se piensa

que la adherencia de *H. pylori* se lleva a cabo gracias a múltiples adhesinas y receptores al mismo tiempo (Beswick, 2006).

#### **1.15.4.1 BabA** (blood antigen binding adhesion)

*H. pylori* se une a las células epiteliales gástricas a través de los antígenos de Lewis con la adhesina BabA, la cual está codificada por los genes *babA1* y *babA2* (Wirth, 2006). Se sabe que la unión de *H. pylori* al receptor gástrico de Lewis promueve la respuesta inmune no específica y el desarrollo de anticuerpos frente a células productoras de ácido lo que provoca la gastritis crónica. También la adherencia mediada por BabA participa en la distribución de factores de virulencia que dañan al hospedero, contribuyendo al desarrollo de úlcera y cáncer gástrico (Olfat, 2005).

#### **1.15.4.2 HpaA** (*H. pylori* adhesin A)

Esta adhesina está codificada por el gen *hpaA*, es un antígeno localizado en la membrana externa de *H. pylori* que es reconocido por las células presentadoras de antígenos humanas, estimulando la proliferación de los linfocitos B y T (Nvström, 2007).

#### **1.15.4.3 OipA** (outer membrane inflammatory protein)

A pesar de que todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen que codifica para esta adhesina, solo algunas la expresan. Dicha expresión está asociada a una mayor producción de IL-8, aunque se desconoce realmente cuál es su participación en la inflamación gástrica ya que suele estar asociada a las cepas *cagA* positivas (Yamoka, 2008).

#### **1.15.4.4 SabA** (sialic acid binding adhesion)

Esta adhesina se une a los receptores con el ácido siálico de los neutrófilos y provoca la activación de su respuesta oxidativa (Unemo, 2005).

## 1.16 Factores implicados en el daño de la mucosa gástrica

### 1.16.1 *VacA* (vacuolating cytotoxin)

*VacA* es un importante factor de virulencia codificado por el gen *vacA* reportado por primera vez en 1988, el cual provoca la formación de varios poros para realizar vacuolización y de esta manera el contenido celular se vacía permitiendo la salida de aniones y urea la cual es un sustrato indispensable para la enzima ureasa. Esto se ha visto en células epiteliales en cultivos celulares, sin embargo esta actividad solo la presenta el 60% de las bacterias de *H. pylori* a pesar de que todas tienen el gen *vacA* (Nomura, 2002). También se ha desmostado que *vacA* impide la maduración de los fagosomas en los macrófagos evitando así su proliferación (Xu, 2000).

*VacA* tiene una estructura hexamérica y posee la capacidad de ensamblarse en la bicapa lipídica celular del huésped, formando así un canal selectivo de aniones, provocando un gradiente de pH que capta sustancia alcalinas al interior del canal provocando que entre agua por medio de osmosis, lo que comienza a hacer una vacuolización alrededor del núcleo y posteriormente la muerte celular. En el citosol impide el tránsito vesicular de los lisosomas. A pesar de que todas las cepas tienen el gen *vacA*, solo un 50% producen la toxina, y las cepas que presentan esta actividad suelen provocar una infección más fuerte en pacientes con adenocarcinoma gástrico y úlcera péptica que en pacientes solo con gastritis (Yamazadi, 2005). Sin embargo, no todos los estudios concuerdan con esto y mencionan que quizás se deba a que el gen tiene una estructura de mosaico quedando diferentes alelos. El gen *vacA* en la secuencia señal codifica cuatro alelos (s1a, s1b, s1c y s2) y en la región media tres (m1, m2a y m2b) que al combinarse podrían producirse diferentes genotipos, los cuales podrían variar la virulencia del microorganismo (Rudi, 1998). De esta manera las cepas s1/m1 son más citotóxicas que las s1/m2. Recientemente se ha descrito una nueva región en el gen, la región intermedia como se puede ver en la figura 4. Esta región presenta varias formas, i2

e i1; las cepas tipo il son más citotóxicas y están asociadas con la estructura alélica s1m1, mientras que las cepas i2 se encuentran más relacionadas con las cepas con combinación alélica s2m2 y que suelen presentar un mejor pronóstico (Palframan, 2012).

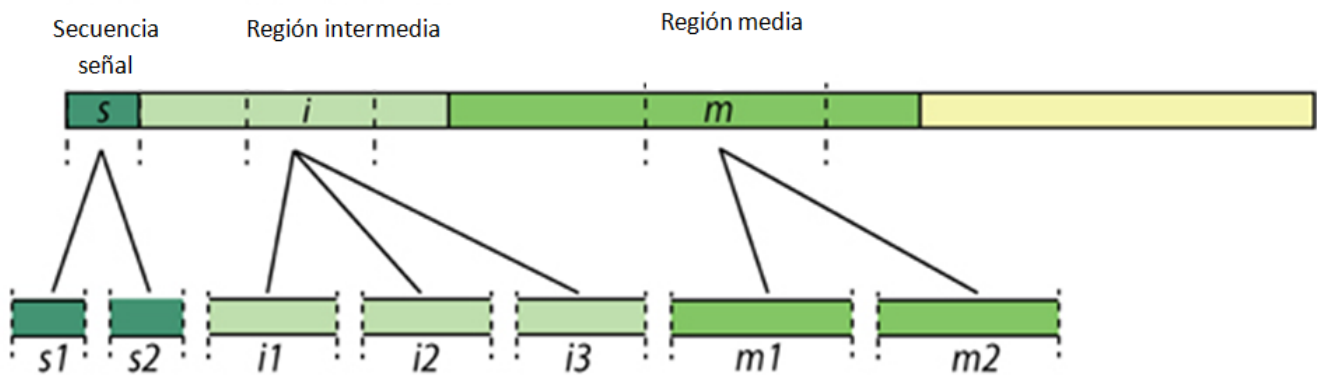


Figura 3. Estructura y diversidad alélica de *vacA* (Palframan, 2012).

El productor del gen *vacA* puede provocar muerte celular programada no solo por vacuolización, ya que induce la liberación de citocromo C de las mitocondrias por medio de la activación de las proteínas proapoptóticas Bak y Bax. Asimismo puede participar en el proceso de apoptosis mediante la activación del receptor Fas/CD95 con ayuda de diversas caspasas y de la ruptura de la membrana mitocondrial la cual afecta la concentración de ATP celular provocando alteraciones en el ciclo celular (Agudo, 2009).

*VacA* puede activar la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y provocar el desarrollo de procesos carcinogénicos. Éste factor de crecimiento está relacionado con la neoangiogénesis vía del sistema TLR2/TLR9, el cual se encuentra sobreexpresado en carcinomas humanos. Este proceso depende directamente del tipo de cepa bacteriana, lo cual podría explicar el diferente potencial patológico de las mutantes. Igualmente *vacA* aumenta la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica incrementando la expresión de la ciclooxigenasa 2 en los neutrófilos, macrófagos y células T, los cuales pueden activar la

producción de VEGF y estimular el desarrollo de procesos carcinogénicos. Si bien no están perfectamente definidos los mecanismos de *H. pylori* que inducen a la carcinogénesis gástrica, la sobreexpresión de VEGF Y COX-2, el aumento de citocinas proinflamatorias y la activación de NF- $\kappa$  $\beta$ , causan alteraciones morfológicas que inducen al desarrollo de metaplasia gastrointestinal y gastritis atróficas (Rudnicka, 2004). Así mismo está relacionada con la alteración de las funciones moduladas por integrinas al interaccionar con la fibronectina y la mediación de la respuesta inmunitaria de células T y B, granulocitos y monocitos ya que impide la presentación de antígenos y la proliferación de células T. Por otra parte, impide la maduración de los fagosomas en los macrófagos, por lo que la bacteria sobrevive dentro de los mismos (Atherton, 1997).

Este gen no tiene un homólogo en las otras especies de *Helicobacter*, por lo tanto es de gran importancia en la interacción de *H. pylori* con la mucosa gástrica humana (Blaser, 1995).

#### **1.16.2 CagA (cytotoxin-associated gene A)**

Las cepas de *H. pylori* muestran cambios en el genotipo y debido a la presencia o ausencia de la isla de patogenicidad *cagPAI* a la cual pertenece el gen *cagA*. La presencia de este factor de virulencia hace una diferencia entre el fenotipo de las cepas que la contienen, ya que el 60% de ellas expresan una proteína de 120 a 140 kDa denominada CagA (Pérez, 2007).

La isla de patogenicidad son segmentos de ADN compuestos de por lo menos 32 genes, contienen más de un gen de virulencia; la isla de patogenicidad *cagPAI* tiene un tamaño aproximado de 37 a 40 kb y está flanqueada por secuencias repetidas directas de 31 pb con un contenido de GC del 35% en comparación con el 39% del resto del genoma. Los genes de virulencia de *cagPAI* no se expresan de manera constitutiva sino que responden a señales ambientales. Están reguladas por mecanismos que se activan o no dependiendo de las condiciones microambientales

como el pH, la fase de crecimiento bacteriano, nivel de oxígeno, osmolaridad, etc (Blaser, 1995).

Se ha demostrado que las cepas de *H. pylori* que expresan CagA son más virulentas y coloniza seis veces más en el antro gástrico, incrementando el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico (Blaser, 1995).

Este tipo de cepas inyectan la proteína CagA y peptidoglicanos en las células epiteliales gástricas del hospedero por medio de una estructura de inyección supramolecular. El sistema de secreción tipo 4 (T4SS) es un ensamblaje formado por múltiples proteínas Cag, entre las cuales está CagA. La penetración intracelular de la proteína en la célula gástrica del hospedero provoca la producción de interleucinas y citocinas proinflamatorias como IL-1 e IL-8, aunque también puede actuar como un carcinogénico activando oncogenes e inactivando genes supresores de tumor. La molécula diana de CagA más estudiada es la fosfatasa SHP-2 (Proteína tirosina fosfatasa) y su activación por CagA puede colaborar a la proliferación celular excesiva (Neal, 2013).

## **1.17 Otros factores**

### **1.17.1 Tip $\alpha$ (TNF- $\alpha$ inducing protein)**

Estas proteínas tienen una fuerte actividad carcinogénica por medio de la activación de NF- $\kappa$ B y la inducción de TNF- $\alpha$ , promoviendo la inflamación durante el cáncer. (Suganuma, 2006).

### **1.17.2 Lipopolisacáridos (LPS)**

Los LPS de *H. pylori* tienen una estructura de tres dominios principales: la cadena específica O, el núcleo oligosacárido y el lípido A. Estos no estimulan la respuesta inmune del hospedero durante la etapa de colonización del epitelio gástrico gracias a que los antígenos que poseen son semejantes a los de los grupos sanguíneos (Xu, 2000).

## 1.18 EL hierro

El hierro es esencial para casi todos los organismos vivos y está estrechamente involucrado en una amplia gama de vías metabólicas y celulares, como el transporte de electrones, la activación de oxígeno, la reducción de peróxido, la síntesis de aminoácidos y nucleósidos y la fotosíntesis. Los cofactores, como los grupos de hierro-azufre y los grupos hemo, se han utilizado como cofactores en más de 100 enzimas en el metabolismo primario y secundario (Sun, 2012).

Para superar la limitada disponibilidad de hierro en el entorno del huésped, los patógenos bacterianos han desarrollado al menos dos formas de satisfacer su necesidad de fuentes de hierro:

- Mediante modificaciones genéticas, como ejemplifica *Borrelia burgdorferi*, utilizando otros cationes como cobre para complementar las funciones de las metaloproteínas que contienen hierro (Posey, 2000).
- Desarrollar sistemas de captación de hierro de alta afinidad con la captación de las proteínas de hierro del huésped, que incluyen hemo, ferritina, transferrina, lactoferrina, hemoglobina y hemosiderina, por medio de hemóforos o sideróforos (Ratledge, 2000).

Las bacterias normalmente extraen hierro de la transferrina o la lactoferrina antes de transportar el hierro a través de la pared celular (Andrews, 2003). De manera similar, para las proteínas que contienen hemocetamina, todo el grupo hemo se elimina de la proteína y se importa a la bacteria (Genco, 2001).

### 1.18.1 Adquisición de hierro en *H. pylori*.

CagA se inyecta en las células epiteliales gástricas a través del sistema de secreción de tipo IV. VacA y CagA causan la interrupción de la señalización intracelular en las células huésped. Ambos factores de virulencia contribuyen a la perturbación del reciclado de la transferrina desde la endocitosis a la transcitosis, por ejemplo, de  $Fe^{3+}$  se reduce a  $Fe^{2+}$ . Por un tipo de reductasa  $Fe^{2+}$  se difunde a través de las

porinas de la membrana externa y se transporta al citoplasma por FeoB, cuyo proceso se activa mediante hidrólisis de GTP o ATP. El hemo de la hemoglobina, extraído con una serie de proteínas que se unen al hemo, se transporta a través de la membrana externa con FrpB2 y a través de la membrana citoplasmática con un transportador. Luego se procesa el hemo con HugZ, una hemooxigenasa, para liberar el hierro. Los hierros intracelulares libres se almacenan en ferritinas bacterianas, NapA o Pfr. Tf transferrina; Receptor de transferrina TfR; Hemoglobina Hb; Membrana externa OM de *H. pylori*; Membrana citoplasmática CM de *H. pylori* (Figura 1).

Se sabe que *H. pylori* posee varios sistemas de absorción de hierro a través del análisis de todo el genoma (Tomb, 1997). *H. pylori* contiene NapA y Pfr, proteínas similares a la ferritina para el almacenamiento de hierro. Además el regulador global de la absorción férrica (Fur) está presente en esta bacteria (Tomb, 1997).

A diferencia de la mayoría de los otros patógenos con mecanismo de captación de hierro mediado por sideróforos (Ge, 2009), no se ha demostrado que *H. pylori* sintetice sideróforos (Vliet, 2001).

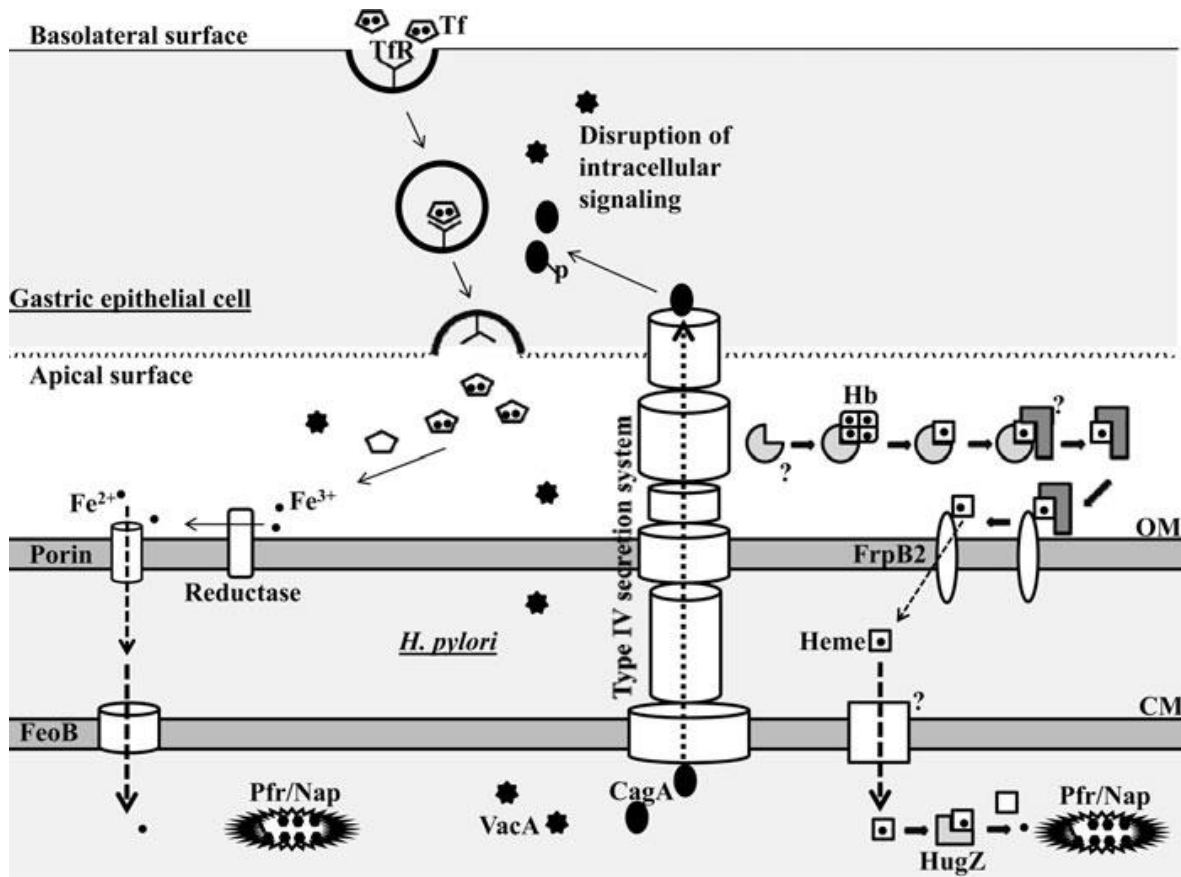


Figura 4. Adquisición de hierro en *H. pylori*.

Muchas bacterias patógenas requieren hemo para las rutas de utilización de energía y biosintéticas. Un método importante de captación es a través de transportadores ABC activos que están compuestos de una proteína de unión a hemo, una permeasa de membrana y una ATPasa (Davidson, 2004).

En el huésped, el hemo suele estar cubierto por una proteína (hemoproteína) para aumentar la solubilidad y hexacoordinado con cuatro ligandos de la protoporfirina IX y dos ligandos axiales de las cadenas laterales de las hemoproteínas. Al menos un transportador de hemo / hemoglobina está presente en *H. pylori* ya que se sabe que el hemo puede servir como la única fuente de hierro para el crecimiento de *H. pylori* (Worst, 1995) y en deficiencia de hierro, se observó la capacidad de *H. pylori* para extraer hierro de la hemoglobina (Senkovich, 2010) además se encontró que la hemoglobina del medio de cultivo se incorporaba a las células de *H. pylori* (Ge, 2007).

Se sugiere que la proteína de la membrana externa de *H. pylori* FrpB2 es una proteína de unión a la hemoglobina, ya que esta proteína tiene los motivos de unión a la hemoglobina característicos (FRAP y NPNL) y puede mantener el crecimiento de células de *E. coli* solo en presencia de hemoglobina (González, 2009).

La transferrina y la lactoferrina en forma de holo pueden apoyar el crecimiento de *H. pylori* como única fuente de hierro (Senkovich, 2010). Dado que *H. pylori* no puede competir con las células eucariotas por la holo transferrina debido a su alta afinidad por el receptor de la transferrina (Young, 1984), es beneficioso para las bacterias que el hierro se libere de la transferrina, ya sea enzimáticamente o por ácido, en el extracelular espacio (Senkovich et al. 2010).

#### **1.18.2 Almacenaje de hierro en *H. pylori*.**

La ferritina desempeña un papel importante en la homeostasis del hierro: para catalizar la oxidación del hierro (actividad ferroxidasa), evitando así los efectos nocivos del exceso de hierro intracelular y proporcionar células con hierro que puede ser liberado por pH ácido o especies oxidativas reactivas dentro de las células. La ferritina permite que *H. pylori* se multiplique bajo la falta de hierro severa y protege a las bacterias de la toxicidad del hierro amplificado con ácido (Waidner, 2002).

#### **1.19 Chaperonina GroEL**

Es una proteína que secreta *H. pylori* la cual tiene la capacidad de unir hierro (González, 2013). Formada por un cilindro de dos anillos de siete subunidades idénticas cada uno. La altura del cilindro es de 145 Å y 135 Å de ancho (Figura 5) y con una cavidad central de 45 Å de ancho (Briag, 1994). Estas dimensiones corresponden a la chaperonina sin ATP, y pueden variar dependiendo del ciclo funcional en el que se encuentre la chaperonina. Ambos anillos interactúan por su base y las cavidades que definen a cada uno no se comunican ya que se encuentran separadas por los últimos 24 aminoácidos del extremo carboxilo

terminal (C-terminal), de las siete subunidades, que se disponen hacia el centro del complejo. Cada una de las subunidades se pliega en tres dominios diferenciados denominados: apical, intermedio y ecuatorial. El dominio ecuatorial forma la base de la cavidad, y tiene una estructura ordenada con  $\alpha$  hélices largas y paralelas. Este dominio está localizado en el sitio de unión al nucleótido situado en su superficie superior, asimismo, en él coinciden los extremos N y C terminal y ayuda a la mayor parte de las interacciones entre subunidades cercanas del mismo anillo y en todas las que se establecen entre ambos anillos. Por consiguiente, parece que este dominio es el encargado de la comunicación alostérica producida en la proteína tras la unión, hidrólisis y liberación del nucleótido (Horovitz, 2001). El dominio intermedio es corto y flexible, ayuda a conectar al dominio ecuatorial con el dominio apical, el cual se encuentra en la entrada del de la cavidad y tiene residuos involucrados en la interacción con el sustrato y su co-chaperonina, GroES (Fenton, 1994). La estructura del dominio apical es flexible y poco ordenada lo cual le favorece para adaptarse al sustrato como a la co-chaperonina (Xu, 1997).

### **1.19.1 Chaperonina GroES**

La chaperonina de GroES es un oligómero con una estructura en forma de anillo conformado por siete subunidades idénticas de 10 kDa cada una (Hunt, 1996). Cada monómero tiene un barril  $\beta$  antiparalelo hidrofóbico y dos horquillas  $\beta$ . Una de las hebras  $\beta$  de la región N-terminal de cada monómero interactúa con el barril  $\beta$  del monómero contiguo. El oligómero mide 30 Å, tiene un ancho de 70 Å y un orificio de 8 Å de diámetro. Una horquilla  $\beta$  de cada subunidad se encuentra en la parte superior de la cúpula de oligómero dirigido hacia el eje de simetría para formar el techo de la cúpula. Otra horquilla  $\beta$  constituye un lazo flexible y móvil orientado hacia la parte inferior del oligómero formando la zona de la interfase entre GroEL y GroES durante su interacción (Xu, 1997).

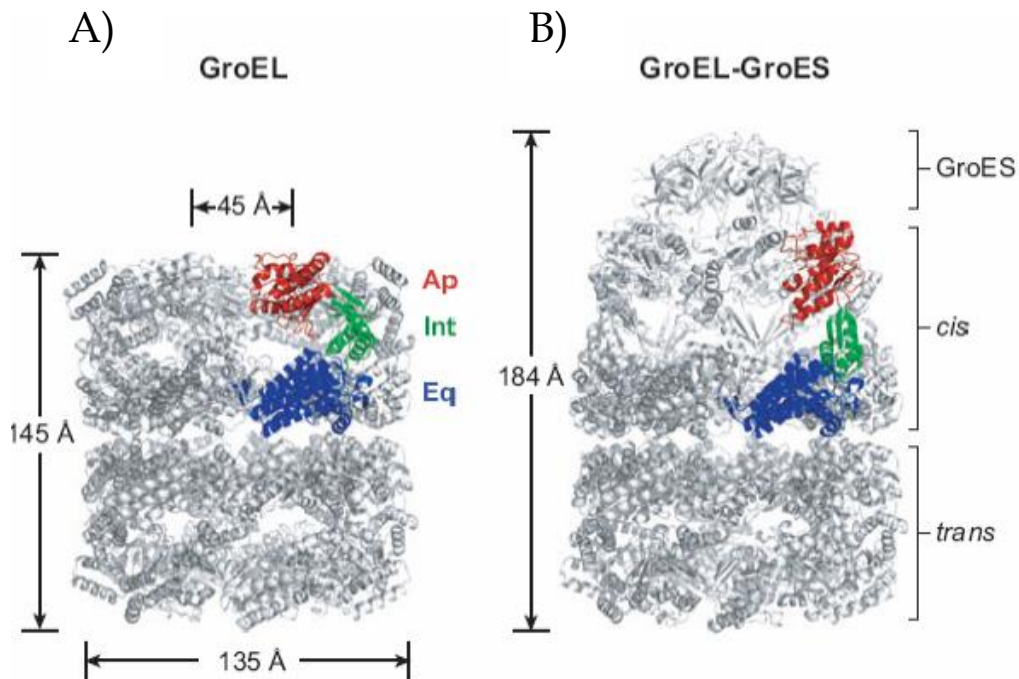


Figura 5. Arquitectura típica de las chaperoninas de tipo I (Braig, 1994). (a) Modelo cristalográfico de la proteína GroEL. Los tres dominios de GroEL: Apical, Intermedio y Ecuatorial se muestran en colores diferentes (rojo, verde y azul, respectivamente). (b) Modelo cristalográfico del complejo formado entre GroEL y GroES.

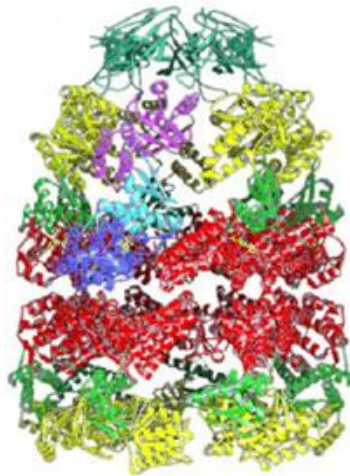


Figura 6. Vista lateral del complejo asimétrico que forman GroEL-GroES

### 1.91.2 GroEL es una proteína moon lighting

Las proteínas de choque térmico (HSP) HSP60 / GroEL se han estudiado durante muchos años debido a su papel crítico como chaperonas moleculares dependientes de ATP, pero algunas tienen funciones importantes en condiciones de ATP pobre, cuando se secretan fuera de la célula. De hecho, se ha encontrado que los miembros de cada una de las familias de proteínas HSP60 / HSP10, HSP70, HSP90, HSP100 y HSP110 HSP / chaperona son moon lighting. Las proteínas moon lighting comprenden un subconjunto de proteínas multifuncionales en las que una cadena polipeptídica muestra más de una función bioquímica o biofísica fisiológicamente relevante (Jefferi, 1999). En esta clase de proteínas multifuncionales, las funciones múltiples no se deben a fusiones de genes o fragmentos proteolíticos múltiples. Se han identificado varios cientos de proteínas moon lighting, que incluyen un conjunto diverso de proteínas con una gran variedad de funciones (Mani, 2015).

Se ha reportado que *H. pylori* secreta a GroEL y se ha identificado que tiene la capacidad de unir hierro, además de mantener el correcto plegamiento de las proteínas (González, 2013). Además se sabe que GroEL de *Escherichia coli* tiene la capacidad de plegar a la proteína rodanasa a pH 5 (Weber, 2000), sin embargo esta función hasta el momento es desconocida para GroEL de *H. pylori*

## JUSTIFICACIÓN

*H. pylori* es una bacteria con prevalencia alta especialmente en países en vías de desarrollo, siendo un problema de salud pública a nivel mundial que requiere atención debido a que los pacientes presentan síntomas como gastritis crónica, úlceras gástricas y adenocarcinoma gástrico, aunque la mayoría de las veces, la infección resulta asintomática. La capacidad de *H. pylori* para crecer y sobrevivir en ambientes con pH ácido como el que se encuentra en el estómago, han dificultado su erradicación. Una de las principales interrogantes para lograr comprender la capacidad de infección de *H. pylori* es conocer las proteínas que secreta durante su infección, la cual es una de las preguntas más difíciles e interesantes para responder actualmente. La búsqueda de proteínas que ayudan a la supervivencia de la bacteria condujo a la identificación de la proteína GroEL. El poder identificar si tiene actividad de plegamiento es un factor importante para poder conocer el mecanismo desarrollado por esta bacteria patógena para soportar el ambiente hostil del estómago.

Por lo tanto consideramos importante hacer una caracterización de esta chaperonina cambiando su fuente de hierro y visualizar su capacidad de plegamiento a diferentes pH.

## **HIPÓTESIS**

La expresión de la chaperonina HpGroEL está regulada por las fuentes de hierro hemina, hemoglobina y ayuno de hierro y su capacidad de plegamiento está relacionada con el pH.

# OBJETIVOS

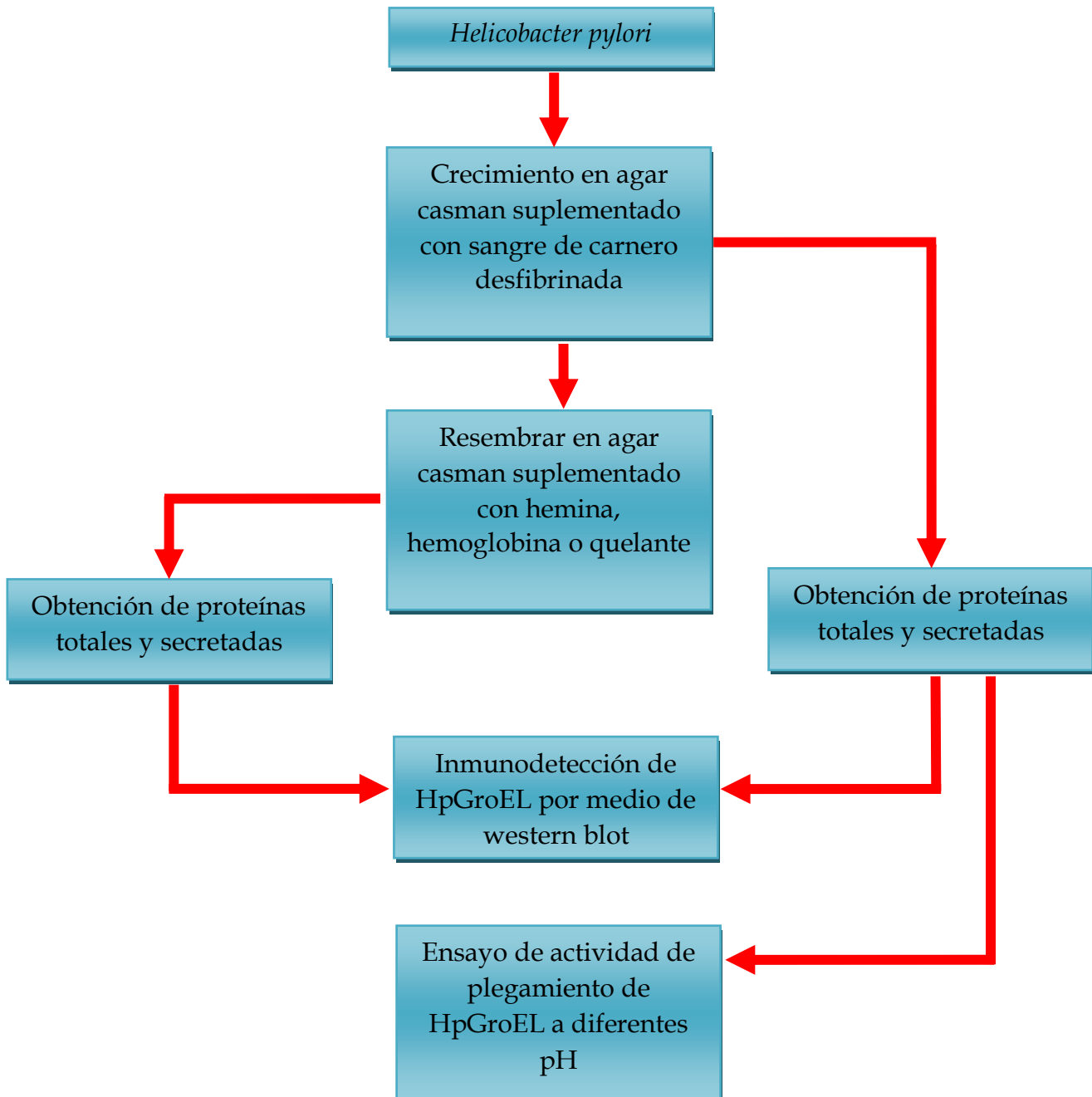
## OBJETIVO GENERAL

Determinar si HpGroEL se secreta al ser criada bajo ayuno de hierro, hemina y hemoglobina y evaluar su capacidad de plegamiento en pH ácidos y básicos.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si la proteína HpGroEL se expresa bajo diferentes fuentes de hierro tales como hemina, hemoglobina y ayuno de hierro.
2. Determinar la actividad de plegamiento *in vitro* de HpGroEL a diferentes valores de pH.

# ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Cepas bacterianas

Se utilizó la cepa J99 de *H. pylori* (ATCC 700824) y como control la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* (ATCC/PTA-8525).

## 2. Condiciones de crecimiento bacteriano

### 2.1 *H. pylori* crecida en ayuno de hierro, hemina o hemoglobina.

Un vial de 1.0 mL de la cepa J99 de *H. pylori* fue sembrado en 5 cajas de agar casman, suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 7.5% y antibiótico, Se incubaron a 37 °C bajo condiciones anaeróbicas (10% de CO<sub>2</sub>) de 48 a 72 h, posteriormente este cultivo fue resembrado en cajas con agar casman, antibiótico y dipirilo, suplementado con hemoglobina o hemina, las cuales fueron incubadas durante 12 h.

### 2.2. Crecimiento de *Escherichia coli*

Se tomó un inóculo de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* se sembró en 30 mL de medio líquido LB estéril, durante 12 h en una incubadora a 37 °C en agitación.

## 3. Visualización microscópica de *H. pylori* y *E. coli* por tinción de Gram.

Se tomó un inóculo de ambas cepas con un asa bacteriológica y se fijó con flama en un porta objetos, se cubrió la muestra con cristal violeta y se dejó fijar 1 min. Se lavó con agua para eliminar el exceso, se agregó lugol a la muestra y se dejó reposar por 1 min, se lavó con alcohol-acetona y se adicionó safranina. Se dio un último lavado con agua y se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se observó en el microscopio. Para buscar determinadas zonas en el campo, se utilizó el objetivo de 10x. Se le adicionó una gota de aceite de inmersión para ver con el objetivo de 100x, se observó la morfología y las características de *H. pylori* y *E. coli*.

## **4. Obtención de proteínas**

### **4.1 Proteínas secretadas de *H. pylori***

Después de crecer las bacterias en las condiciones señaladas, se cosechó la biomasa de 5 cajas petri y se resuspendió en un tubo de 1.5 mL y se resuspendieron en 1 mL de medio brucella. Se centrifugaron a 6,000 g /10 min. El sobrenadante se filtró a través de una membrana con poro de 0.45  $\mu$  con la finalidad de eliminar residuos y restos celulares que hayan podido permanecer en el sobrenadante. Se guardó a -20 °C.

#### **4.1.2. Proteínas secretadas de *E. coli***

Las bacterias se recolectaron en un tubo de 1.5 mL con 1 mL de medio brucella, se centrifugaron a 6,000 g /10 min, el sobrenadante se filtró en un tubo de 50 mL estéril a través de una membrana con poro de 0.45  $\mu$  con la finalidad de eliminar residuos que hayan podido permanecer en el sobrenadante. Se guardó a -20 °C.

## **4.2 Proteínas totales**

### **4.2.1. *H. pylori***

Se recolectó la biomasa de 5 cajas petri y se resuspendió en un tubo de 1.5 mL con 1 mL de Tris HCl 20 mM, se centrifugaron a 6,000 g /3 min y se decantó el sobrenadante, posteriormente se le adicionaron 1 mL de Tris HCl 20 mM y se resuspendió por pipeteo repitiendo este lavado en 3 ocasiones. La pastilla formada se resuspendió en tubo de 5 mL con 2 mL de Tris HCl 20 mM con sarkosil al 1% e inhibidor de proteasas (complete), la muestra se mantuvo en hielo al momento de ser sonicada (Ultrasonic Processor), con pulsos de 30 s y descansos de 30 s y 60% de amplitud durante 12 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g /20 min y se colectó el sobrenadante, el cual contenía las proteínas totales.

#### **4.2.2. *E. coli***

Se obtuvo la biomasa de la cepa cultivada centrifugando a 6,000 g /5 min, se resuspendió en un tubo de 15 mL con 5 mL de Tris HCl 20 mM, se centrifugaron a 6,000 g /3 min y se decantó el sobrenadante, posteriormente se le adicionó 1 mL de Tris HCl 20 mM y se resuspendió por pipeteo repitiendo este lavado en 3 ocasiones. Al momento de ser sonicada la muestra se mantuvo en hielo, con pulsos de 30 s por 30 s y 60% de amplitud durante 12 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 g /20 min se colectó el sobrenadante, el cual contenía las proteínas totales.

### **5. Determinación de la concentración de proteínas**

Las proteínas se cuantificaron por espectrofotometría empleando el método de Bradford. Se generó una curva estándar con albúmina sérica bovina al 1% con las siguientes diluciones: 5, 10, 15, 20 y 25 µg/mL Las muestras se prepararon tomando un volumen de 25 µL, aforando a 100 µL con agua destilada. Posteriormente en cada tubo se agregó 100 µL del reactivo de Bradford, se mezclaron y se dejaron reposar durante 2 min, posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm. (Biomates Thermo).

### **6. Resolución de las proteínas en geles SDS-PAGE**

Las muestras se resolvieron en un gel al 12% de acrilamida y bisacrilamida de 1.5 mm. Se cargaron en cada uno de ellos 30 µg de cada una de las muestras de las proteínas y se aplicó una corriente de 80 volts durante 120 min. Posteriormente el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 50 min. Éste procedimiento se hizo por duplicado para obtener un gel para visualizar las proteínas con azul de Coomassie y otro para la técnica de western blot.

### **7. Tinción de proteínas con azul de Coomassie**

Las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE, se visualizaron por el método de azul de Coomassie. El gel fue inmerso en la solución de tinción durante 50 min,

posteriormente se destiñó con la solución decolorante hasta que las proteínas quedaron de color azul con fondo transparente.

## **8. Western blot**

### **8.1 .1. Transferencia**

Las proteínas resueltas en el gel SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa con un buffer de transferencia y una cámara semi-seca (Biorad) a 20 volts durante 45 min. Todas las transferencias de Western blot se realizaron de forma independiente por triplicado.

### **8.1.2. Inmunodetección**

Se lavó la membrana con PBS pH 7.0 por medio de agitación (Biometra WT-17) durante 10 min y se bloqueó con leche semidescremada (5%) disuelta en PBST toda la noche a 4 °C en agitación. Posteriormente se lavó la membrana con PBST por medio de agitación durante 10 min, después el PBST se decantó y el proceso de lavado se repitió una vez más. A continuación se puso a interaccionar con el anticuerpo primario anti-GroEL (1:40,000) o anti- $\beta$ -galactosidasa (1:50,000) disueltos en PBS, durante 1 h. a 4 °C en agitación. Se lavó la membrana con PBST con agitación durante 10 min después el PBST se decantó y el proceso se repitió dos veces más y se le agregó el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP disuelto en PBS (1:10,000) durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente se lavó la membrana con PBST con agitación durante 10 min después el PBST se decantó y el proceso se repitió dos veces más y se dio un último lavado con PBS con agitación por 10 min. Finalmente se agregaron 700  $\mu$ L de la solución A y 700  $\mu$ L solución B del producto de quimioluminiscencia (GE Healthcare Life Sciences, ECL) el cual estuvo interaccionando con la membrana por medio de pipeteo durante 3 min, después se reveló la membrana en el del equipo ChemiDoc, BIO-RAD.

### **8.1.3. Cuantificación de intensidad de señal por densitometría**

Para el método de cuantificación de Western blot, se escanearon las bandas en el equipo ChemiDoc, Bio-Rad y se analizaron con el software Quantity One de Bio-Rad. Las bandas se identificaron con la función "Crear contorno" y se redefinieron con "Contorno a banda". La sustracción de fondo se realizó utilizando la función "fondo de carril". Los datos se obtuvieron como OD / mm<sup>2</sup>, donde el resultados de la muestra de *E.coli* fue considerada el 100%, el cual fue comparado con el resto de los resultados de las muestras para obtener la diferencia estadística en su intensidad de señal. Para conocer dicha diferencia, se realizó una prueba de ANOVA-One way con el software Prism V.7 (GraphPad). Todos los datos se representan como la media ± desviación estándar para las 3 repeticiones realizadas de manera independiente. Se tomaron como significativos los valores  $p < 0.05$ .

## **9. Actividad de plegamiento**

### **9.1. Preparación de la rodanasa**

La rodanasa comercial de Sigma catalogo R1756 se disolvió en 1 mL de buffer de replegamiento (NaOH 20 mM, NaCl 100 mM, KCL 10 mM, Mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 5 mM y Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> 1 mM), se hicieron alícuotas de 20 μL y se guardaron a -80 °C.

### **9.2. Desnaturalización de la rodanasa**

A la solución stock de 20 μL de la rodanasa se le agregaron 20 μL del buffer de desnaturalización (CH<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub> 6 mM, DTT 5 mM, MOPS 20 mM, NaCl 100 mM, KCN 10 mM y Mg (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 5 mM) y se dejó incubar a 25 °C en agitación durante 1 h.

### **9.3. Ensayo de replegamiento de la rodanasa**

En un tubo de 1.5 mL se adicionaron 235 μL de buffer de replegamiento, 5 μL de Na<sub>5</sub>P<sub>3</sub>O<sub>10</sub> 1 mM preparado al momento, se agregó 7.5 μL de la proteína total de *E. coli* y *H. pylori* y como control positivo 2.5 μL de GroEL y 5 μL de GroES. Se le añadió a la mezcla 2.5 μL de rodanasa desnaturalizada, se mezcló y se dejó incubar a 25 °C.

Se tomó el tiempo cero con una alícuota de 10  $\mu\text{L}$  del ensayo de actividad de la rodanasa y se le agregaron 2.4  $\mu\text{L}$  de ATP a 0.1 M y se tomaron alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  cada 10 min.

#### **10. Ensayo de actividad de la rodanasa**

A las alícuotas de 10  $\mu\text{L}$  de la reacción de plegamiento, se le agregaron 10  $\mu\text{L}$  de KCN 1 M, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.8 M, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$  1 mM, 5  $\mu\text{L}$  de CDTA 0.40M y 155  $\mu\text{L}$  de agua destilada, para obtener un volumen total de 200  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se incubó durante 3 min a 25 °C y se le añadió 100  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 15%. Posteriormente, se le agregaron 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , las muestras se incubaron durante 5 min y fueron centrifugadas a 14,000 rpm /10 min, se obtuvo el sobrenadante y se cuantificó en un espectrofotómetro (Biomates Thermo) a 460 nm., el color fue estable durante 1 h. Todas las pruebas de actividad de plegamiento se realizaron de forma independiente por triplicado.

#### **11. Actividad de plegamiento a diferentes pH**

Para realizar los ensayos de actividad de plegamiento a diferentes pH, se siguió el protocolo descrito desde el apartado 9 al 10, con una modificación de pH al buffer de replegamiento (que se tenía un rango de 5) el cual fue ajustado a pH 2, 4, 7 y 8 para realizar las curvas las cuales se realizaron de forma independiente por triplicado.

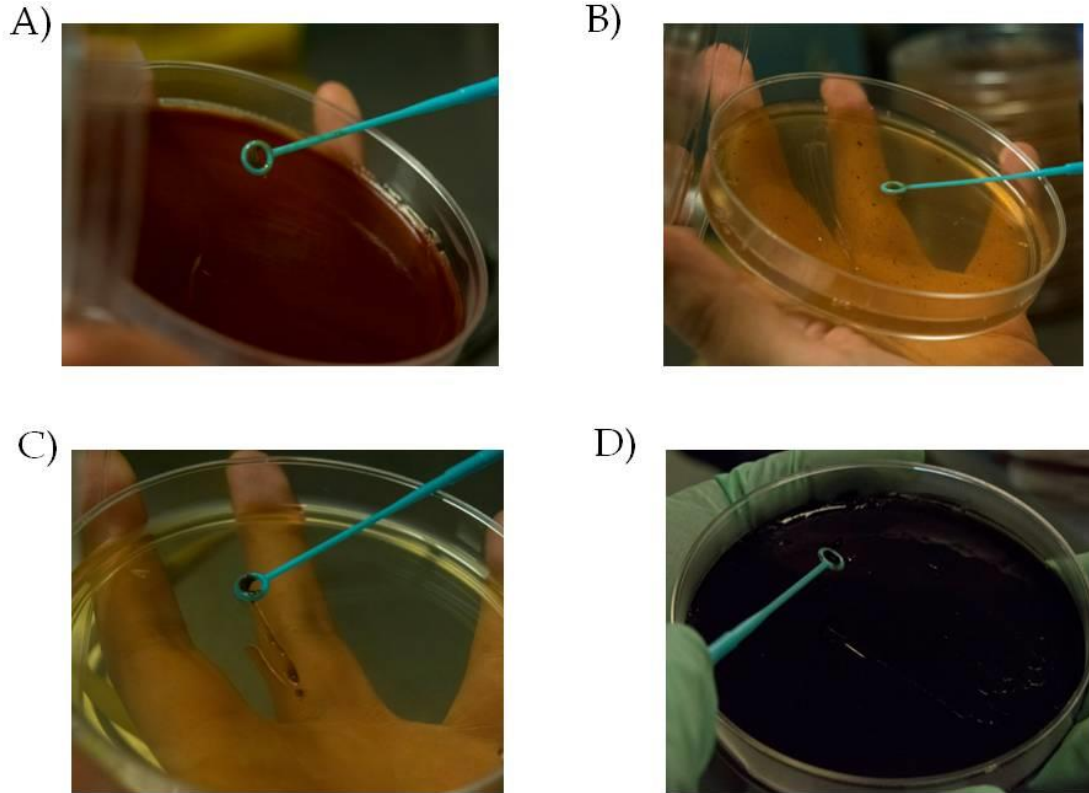
#### **12. Análisis estadístico**

Se realizó una prueba de ANOVA-One way donde se usó el software Prism V.7 (GraphPad) para comparar si existían diferencias significativas entre la actividad de plegamiento de las muestras y si el pH estaba relacionado con dicha actividad. Se tomaron como significativos los valores  $p < 0.05$ .

# RESULTADOS

## 1. Crecimiento de *H. pylori* en diferentes fuentes de hierro

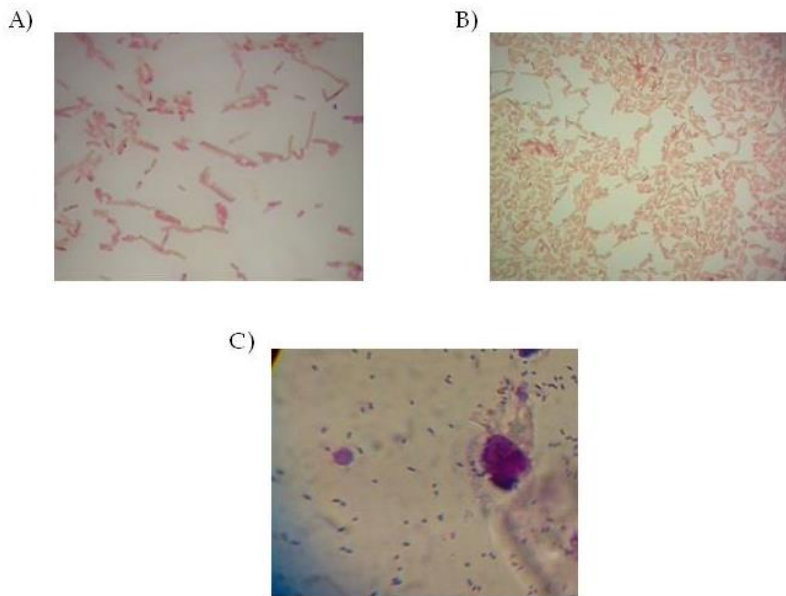
Se creció a *H. pylori* durante 72 h, después se resembró durante 12 h bajo diferentes fuentes de hierro (hemina, hemoglobina o dipirilo) (Figura 7).



**Figura 7. Crecimiento de *H. pylori* bajo diferentes fuentes de hierro.** Crecimiento con hierro (A), resembrada y crecida con hemoglobina (B), con dipirilo (C) y con hemina (D).

## 2. Visualización microscópica de *E. coli* y *H. pylori* por tinción de Gram

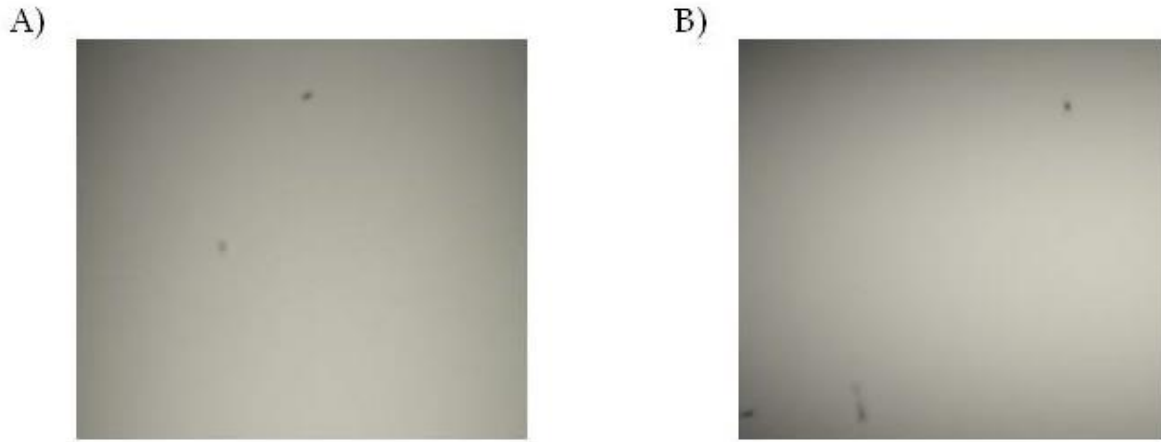
Para corroborar que los experimentos se estaban realizando con bacterias Gram negativas, se realizó una tinción de Gram a los cultivos de *E. coli* y *H. pylori* para observar la morfología y asegurar que no esté contaminada con otro tipo de bacteria (Figura 8, A y B). Como control se realizó una tinción de *Streptococcus pneumoniae* la cual es una bacteria Gram positiva (Figura 8 C).



**Figura 8. Tinción de Gram.** Cultivo de *E. coli* (A), *H. pylori* (B) y *Streptococcus pneumoniae* (C).

La tinción de Gram (Figura 8 A) nos reveló bacterias en forma de bacilo con una tonalidad rojiza lo que indicó que eran bacterias Gram negativas.

Para el caso de la tinción del cultivo de *H. pylori* (Figura 8 B) las bacterias tenían forma de bacilos más cortos en comparación con los bacilos de *E. coli*, la tonalidad fue rojiza lo que indicó una tinción de Gram negativa.



**Figura 9. Tinción de Gram al sobrenadante.** *E.coli* (A) y *H. pylori* (B)

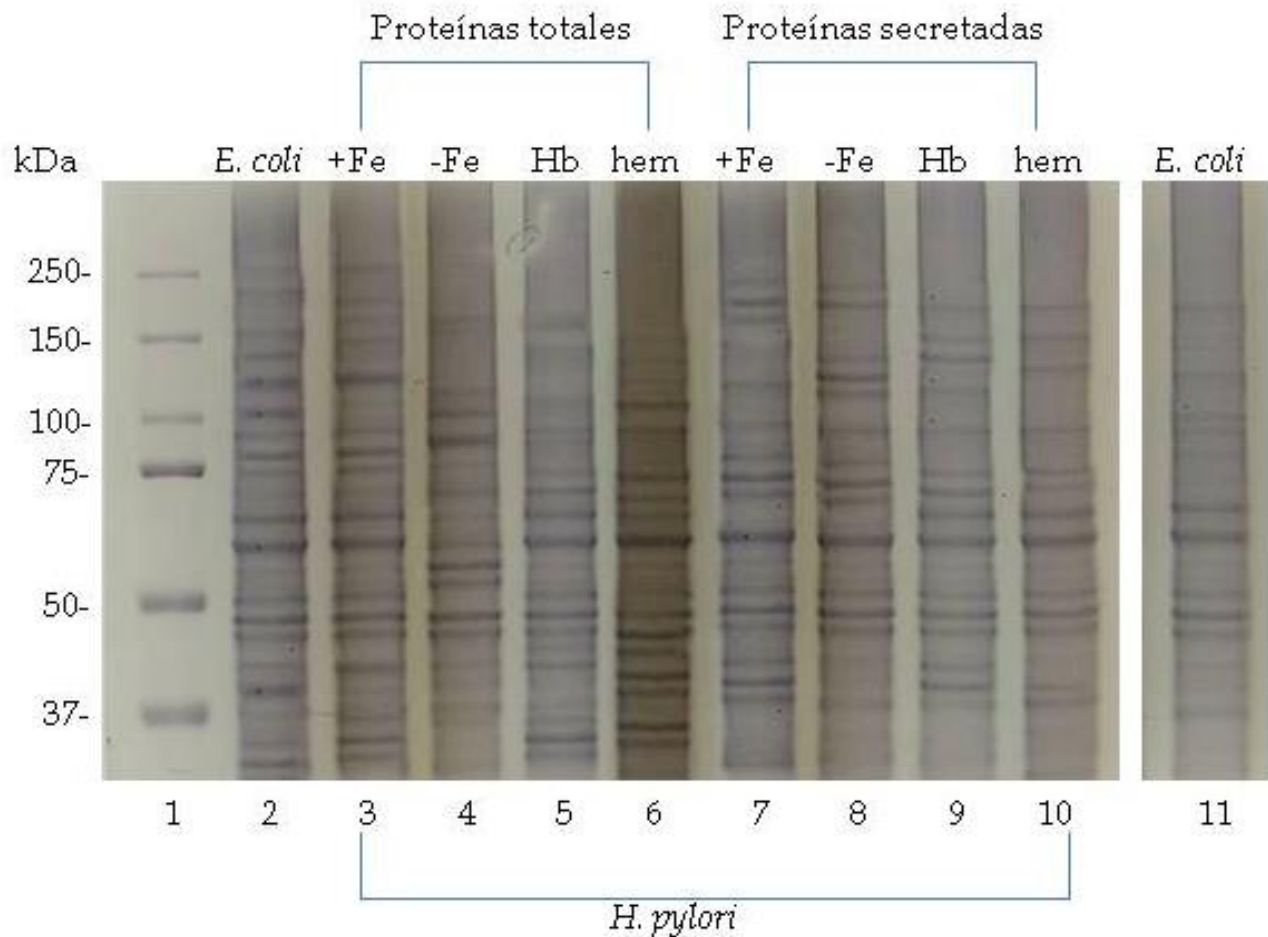
Se realizó la tinción de Gram a los sobrenadantes obtenidos. Tanto para *H. pylori* como para *E. coli* no observó la presencia de restos de bacterias, con lo cual se confirmó que las proteínas secretadas no estarían contaminadas (Figura 9).

### **3. Obtención de proteínas secretadas y totales**

Cosechamos las bacterias y las centrifugamos. Para obtener las proteínas totales sonicamos el sobrenadante y para obtener las proteínas secretadas el sobrenadante fue filtrado.

### **4. Geles de poliacrilamida SDS-PAGE**

Para observar si las proteínas totales y secretadas (con hierro, hemina, hemoglobina o quelante) cuantificadas por el método de Bradford no estaban degradadas, se realizó una electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12% donde el resultado nos mostró que las proteínas se encontraban integras (Figura 10).



**Figura 10. Electroforesis por SDS-PAGE 12% de las proteínas totales y secretadas de *E. coli* y *H. pylori*.** Marcador de peso molecular (carril 1), proteínas totales de *E. coli* (carril 2), proteínas totales de *H. pylori* cultivadas con hierro (carril 3), con dipirilo (carril 4), con hemoglobina (carril 5) con hemina (carril 6). Proteínas secretadas de *H. pylori* crecidas con hierro (carril 7), con dipirilo (carril 8), con hemoglobina (carril 9) con hemina (carril 10). Proteínas secretadas de *E. coli* (carril 11).

Carril	Proteínas Totales	Cantidad para 30µg	Buffer de carga 2x	Total a cargar en los pozos
1	Marcador de peso molecular	0	0	4 µL.
2	<i>E.coli</i>	25 µL.	12.5 µL.	37.5 µL.
3	<i>H. pylori</i>	24 µL.	12.0 µL.	36 µL.
4	<i>H. pylori</i> hemoglobina	12.44 µL.	6.22 µL.	18.66 µL.
5	<i>H. pylori</i> hemina	12.34 µL.	6.17 µL.	18.51 µL.
6	<i>H. pylori</i> quelante	10.27 µL.	6.13 µL.	15.14 µL.
Carril	Proteínas secretadas	Cantidad para 30µg	Buffer de carga 2x	Total a cargar en los pozos
7	<i>H. pylori</i>	34.88 µL.	17.4 µL.	52.2 µL.
8	<i>H. pylori</i> hemoglobina	14.0 µL.	7.0 µL.	21 µL.
9	<i>H. pylori</i> hemina	13.45 µL.	6.72 µL.	20.17 µL.
10	<i>H. pylori</i> quelante	12.14 µL.	6.0 µL.	18.14 µL.
11	<i>E. coli</i>	24 µL.	12.0 µL.	36 µL.

## **5. Los anticuerpos anti-GroEL y anti- $\beta$ galactosidasa de *E. coli* tienen reacción cruzada con las proteínas homólogas de *H. pylori*.**

Se ha demostrado que el anticuerpo anti-GroEL reconoce a la chaperonina GroEL de *E. coli* (EcGroEL), por esta razón decidimos probar si este mismo anticuerpo podía reconocer a la chaperonina GroEL de *H. pylori* bajo diferentes fuentes de hierro (HpGroEL).

Las proteínas totales y secretadas de *E. coli* y *H. pylori* que habían sido resueltas en los geles SDS-PAGE al 12% fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa e interactuaron con el anticuerpo anti-GroEL (Figura 11 A).

El ensayo de Western blot con anti-GroEL detectado por quimioluminiscencia, mostró una banda de aproximadamente 58 kDa (GroEL) en las proteínas totales de *E. coli*, (Figura 11 A, carril 2) y en las proteínas totales y secretadas de *H. pylori* (Figura 11 A, carriles 3-10).

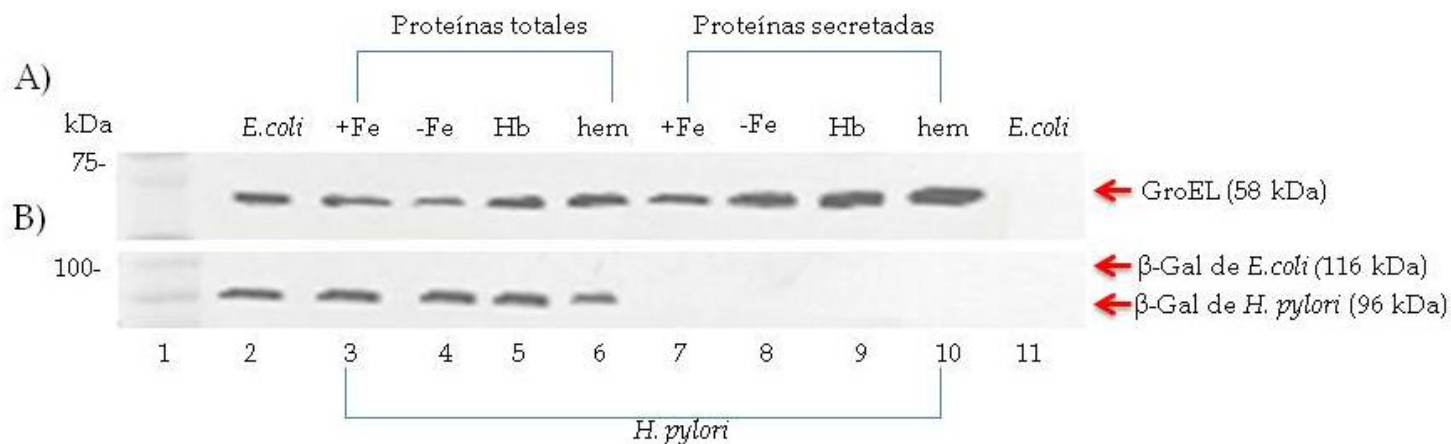
Para demostrar que las proteínas secretadas no se generaron por una lisis natural de las bacterias, se realizó un Western blot para identificar la presencia de la proteína  $\beta$  galactosidasa (Figura 11 B). Debido a que la proteína  $\beta$  galactosidasa sólo se encuentra en el citoplasma, no es posible detectarla en las proteínas secretadas de *E. coli* y *H. pylori*, lo cual fue corroborado por densitometría (Figura 12).

El ensayo con anti- $\beta$  galactosidasa mostró una banda aproximada de 116 kDa en las proteínas totales de *E. coli* y 96 kDa en las proteínas totales de *H. pylori*. (Figura 11 B). Estos resultados corroboraron que el anticuerpo para  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* tiene reacción cruzada con  $\beta$ -galactosidasa de *H. pylori*.

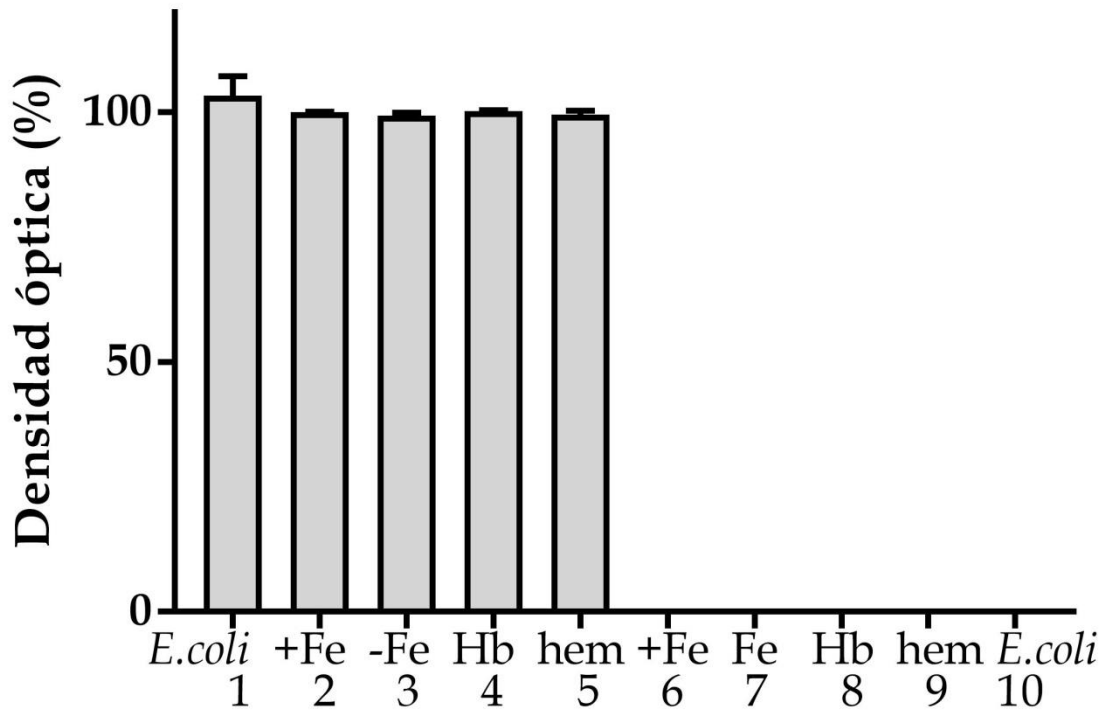
## **6. Inmunodetección de HpGroEL en diferentes fuentes de hierro.**

Como observamos que HpGroEL estaba presente cuando se crecía con hierro, quisimos saber si cambiando la fuente de hierro por hemina, hemoglobina o quelante continuaba la presencia de HpGroEL y si estas fuentes de hierro influían en su expresión (Figura 11 A, carriles 3-10).

Observamos que cuando se cambiaba la fuente de hierro por hemina o hemoglobina la expresión de HpGroEL aumentaba, además observamos que la expresión de HpGroEL era mayor en las proteínas secretadas en comparación con las proteínas totales, dicha diferencia de expresión de HpGroEL fue corroborada por densitometría (Figura 13).

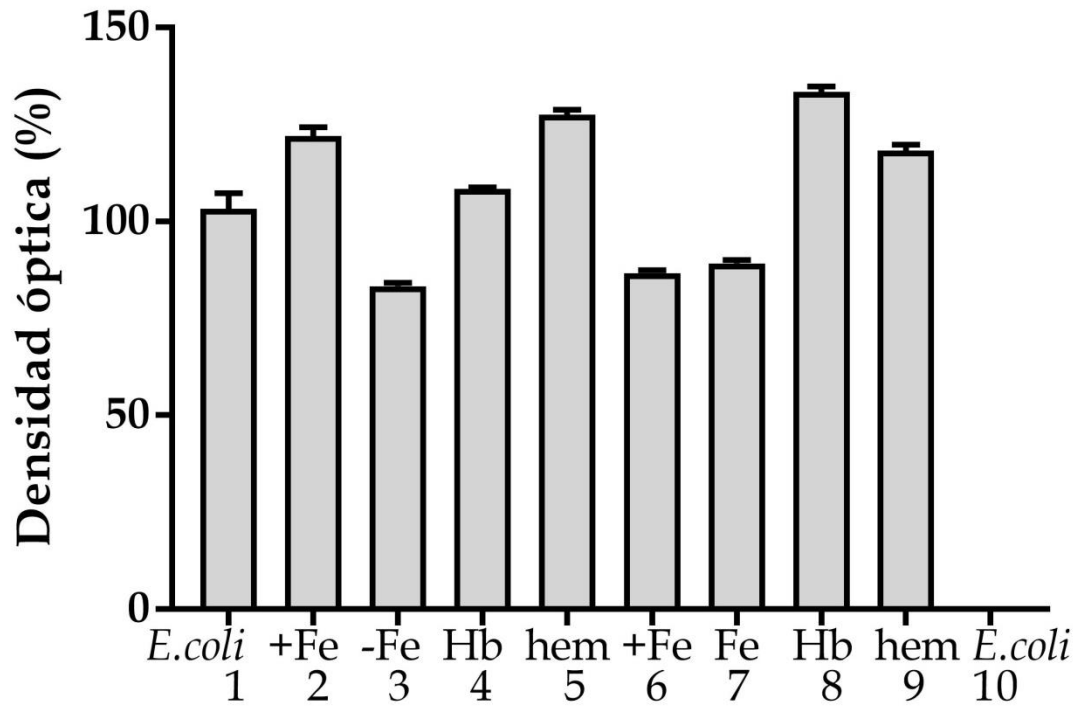


**Figura 11. *H. pylori* secreta y expresa mayor cantidad de HpGroEL.** Marcador de peso molecular (carril 1), proteínas totales de *E. coli* (carril 2), proteínas totales de *H. pylori* crecidas con hierro (carril 3), con dipirilo (carril 4), con hemoglobina (carril 5) con hemina (carril 6). Proteínas secretadas de *H. pylori* crecidas con hierro (carril 7), con dipirilo (carril 8), con hemoglobina (carril 9) con hemina (carril 10). Proteínas secretadas de *E. coli* (carril 11).



**Figura 12. Densitometría del Western blot con anti- $\beta$  galactosidasa.** Representación gráfica del análisis cuantitativo de los niveles de expresión de la proteína anti- $\beta$  galactosidasa calculados por densitometría. Proteínas totales de *E. coli* (1), proteínas totales de *H. pylori* crecidas con hierro (2), con dipirilo (3), con hemoglobina (4) con hemina (carril 5). Proteínas secretadas de *H. pylori* crecidas con hierro (6), con dipirilo (7), con hemoglobina (8) con hemina (9). Proteínas secretadas de *E. coli* (10).

Se graficó el promedio de la relación de intensidades de las bandas que representan a la proteína  $\beta$  galactosidasa ( $p > 0.05$ ).



**Figura 13. Densitometría del Western blot con anti-GroEL.** Representación gráfica del análisis cuantitativo de los niveles de expresión de la chaperonina GroEL calculados por densitometría. Proteínas totales de *E. coli* (1), proteínas totales de *H. pylori* crecidas con hierro (2), con dipirilo (3), con hemoglobina (4) con hemina (carril 5). Proteínas secretadas de *H. pylori* crecidas con hierro (6), con dipirilo (7), con hemoglobina (8) con hemina (9). Proteínas secretadas de *E. coli* (10).

Se graficó el promedio de la relación de intensidades de las bandas que representan a GroEL ( $p < 0.05$ ).

## 7. HpGroEL tiene actividad de chaperonina

Debido a que se tienen antecedentes de la actividad de plegamiento de EcGroEL, se decidió explorar si HpGroEL tenía la capacidad de plegar proteínas.

Se realizaron curvas de actividad de plegamiento donde las proteínas totales y secretadas de *H. pylori* y *E. coli* interaccionaron con la proteína rodanasa durante 90 min. Como control positivo de la reacción se puso a interactuar GroEL -GroES purificadas de *E. coli* con rodanasa. En cada caso, se incluyó una muestra de las proteínas sin rodanasa para observar que no hubiera algún componente de *H. pylori* o *E. coli* que estuviera dando señal a 460 nm.

El control positivo GroEL-GroES ( $p= 0.0325$ ) mostró una actividad de plegamiento mínima durante 80 min y disminuyendo a los 90 min (Figura 14 y 15).

HpGroEL total (+) ( $p= 0.0093$ ) tuvo un aumento significativo en su actividad de plegamiento a partir de los 50 min los 80 min (Figura 14 A).

HpGroEL total (-) ( $p=0.0010$ ) mostró un aumento en su actividad de plegamiento (Figura 14 A).

HpGroEL secretada (+) ( $p= 0.0217$ ) tuvo un comportamiento similar al control positivo GroEL-GroES (Figura 14 B).

HpGroEL secretada (-) ( $p=0.0166$ ) mostró valores similares durante los 90 min de la actividad de plegamiento (Figura 14 B).

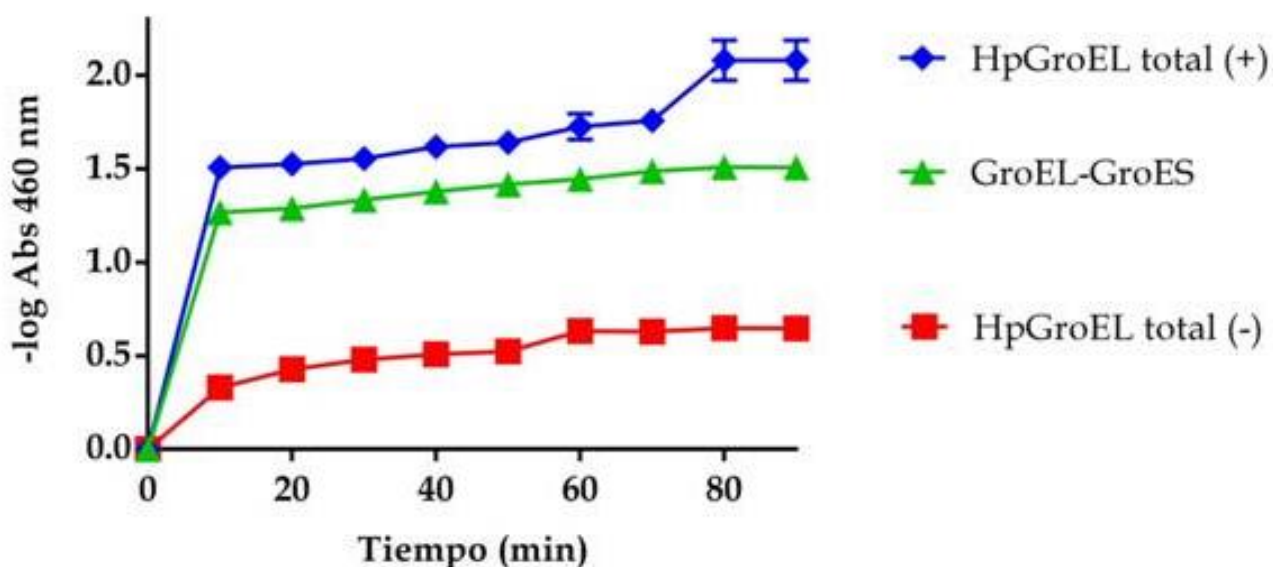
EcGroEL total (+) ( $p= 0.0277$ ) tuvo un aumento en la actividad de plegamiento entre los minutos 60 y 80, disminuyendo a los 90 min (Figura 15 A).

EcGroEL total (-) ( $p=0.0360$ ) tuvo valores constantes durante 90 min (Figura 15 A).

EcGroEL secretada (+) y (-) tuvieron valores mayores a  $\alpha 0.005$  (Figura 15 B).

A)

Actividad de plegamiento de HpGroEL  
de proteínas totales



B)

Actividad de plegamiento de HpGroEL  
de proteínas secretadas

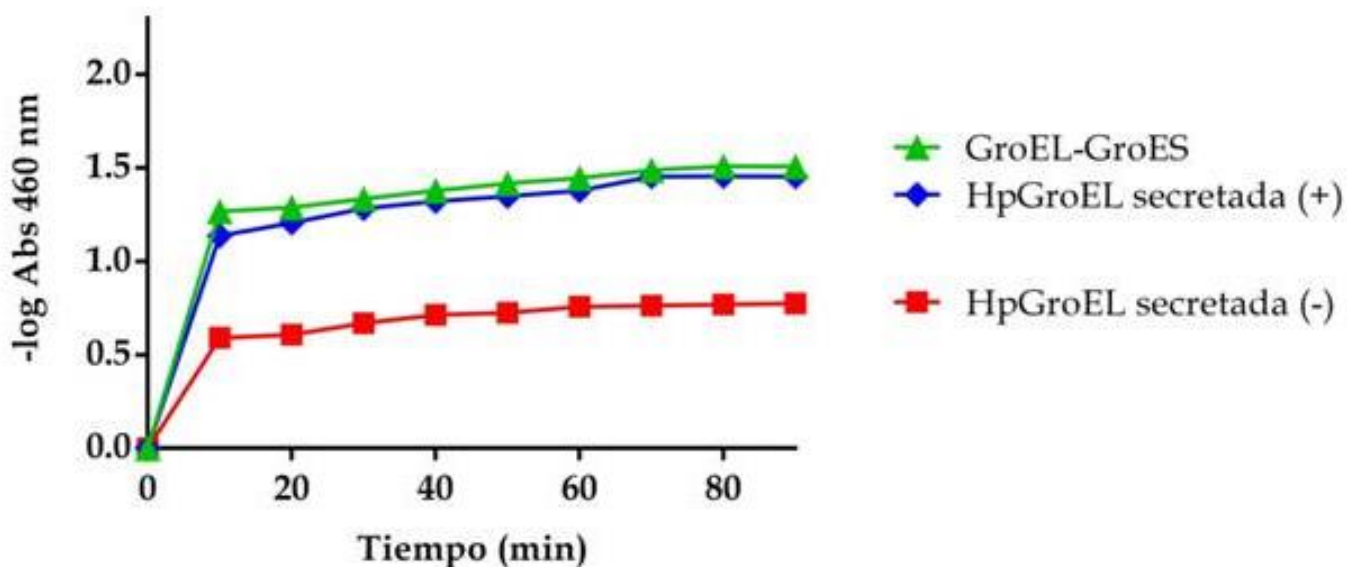
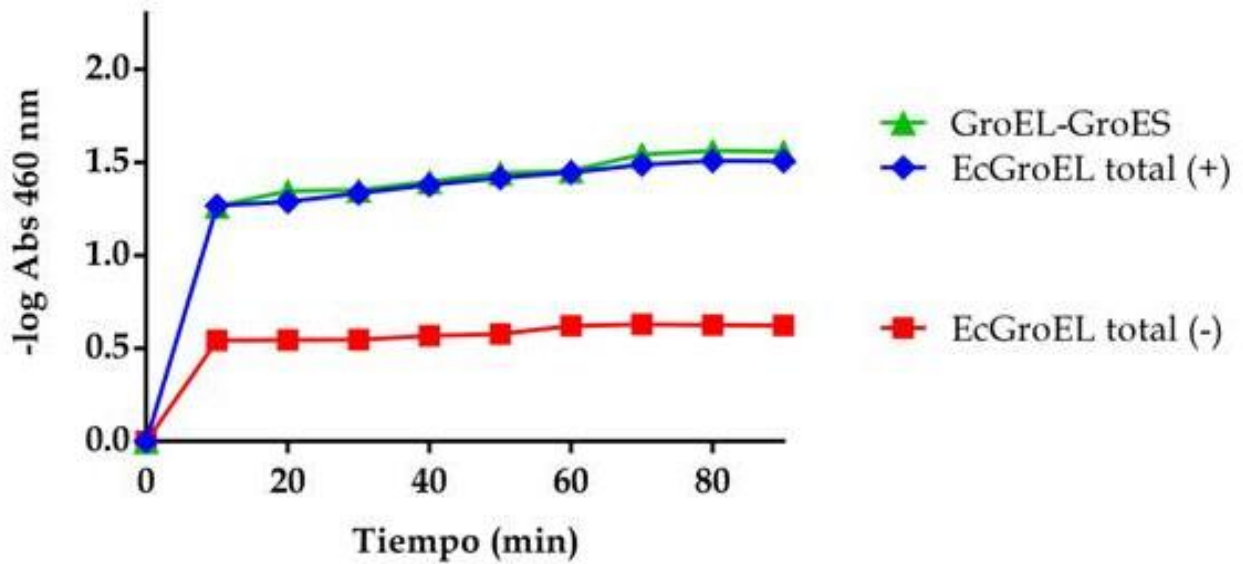


Figura 14. HpGroEL en las proteínas totales y secretadas mostró actividad de plegamiento. (A) Control positivo GroEL-GroES▲, HpGroEL total con rodanasa (+)◆, HpGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) Control positivo GroEL-GroES▲, HpGroEL secretada con rodanasa (+)◆, HpGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

A)

Actividad de plegamiento de EcGroEL de proteínas totales



B)

Actividad de plegamiento de EcGroEL de proteínas secretadas

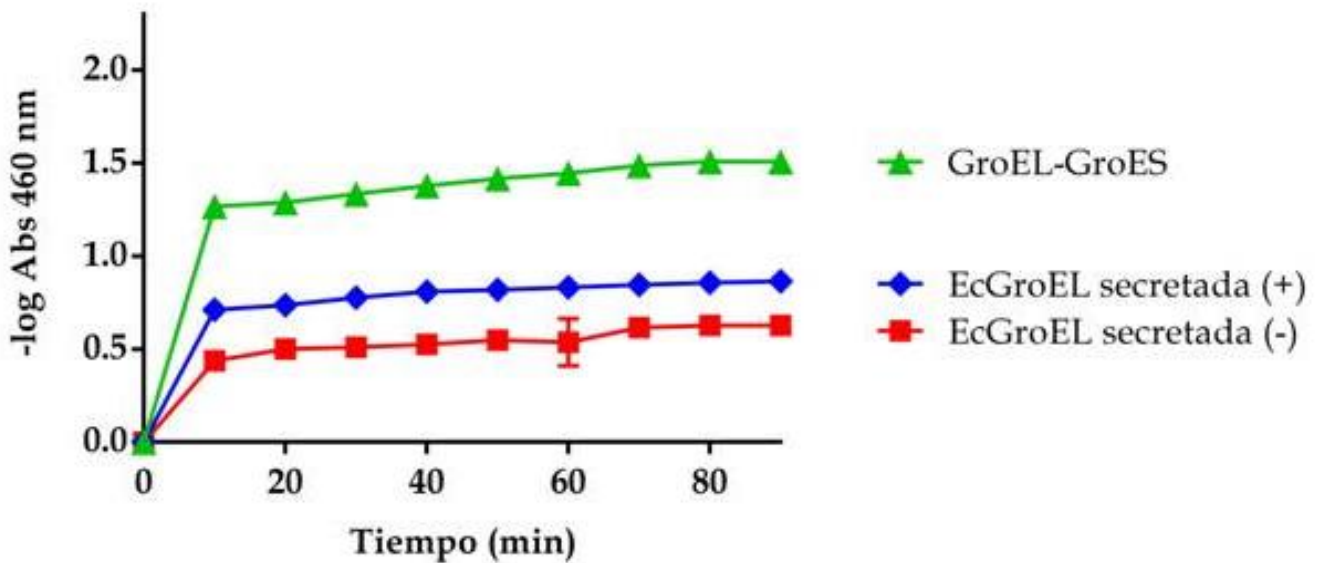


Figura 15. EcGroEL en las proteínas totales mostró actividad de plegamiento. (A) Control positivo GroEL-GroES▲, EcGroEL total con rodanasa (+)◆, EcGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) Control positivo GroEL-GroES▲, EcGroEL secretada con roanasa (+)◆, EcGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

## **8. Actividad de plegamiento de HpGroEL a diferentes valores de pH**

Como pudimos observar que HpGroEL mostró actividad de chaperonina con un experimento con pH de 5, decidimos realizar la misma técnica cambiando el pH (2, 4, 7 y 8) para observar si la actividad tenía alguna relación con este factor.

### **8.1.1. HpGroEL no mostró actividad de plegamiento a pH 2**

Decidimos medir la actividad de plegamiento a pH 2 el cual está cercano al pH del jugo gástrico con el cual *H. pylori* tiene contacto al inicio de la colonización.

A este pH, HpGroEL y EcGroEL no mostraron actividad de plegamiento en proteínas totales (+), (-) o secretadas (+), (-) teniendo valores de p mayores a  $\alpha$  0.05 (Figura 16 A y 16 B), (Figura 17 A y 17 B).

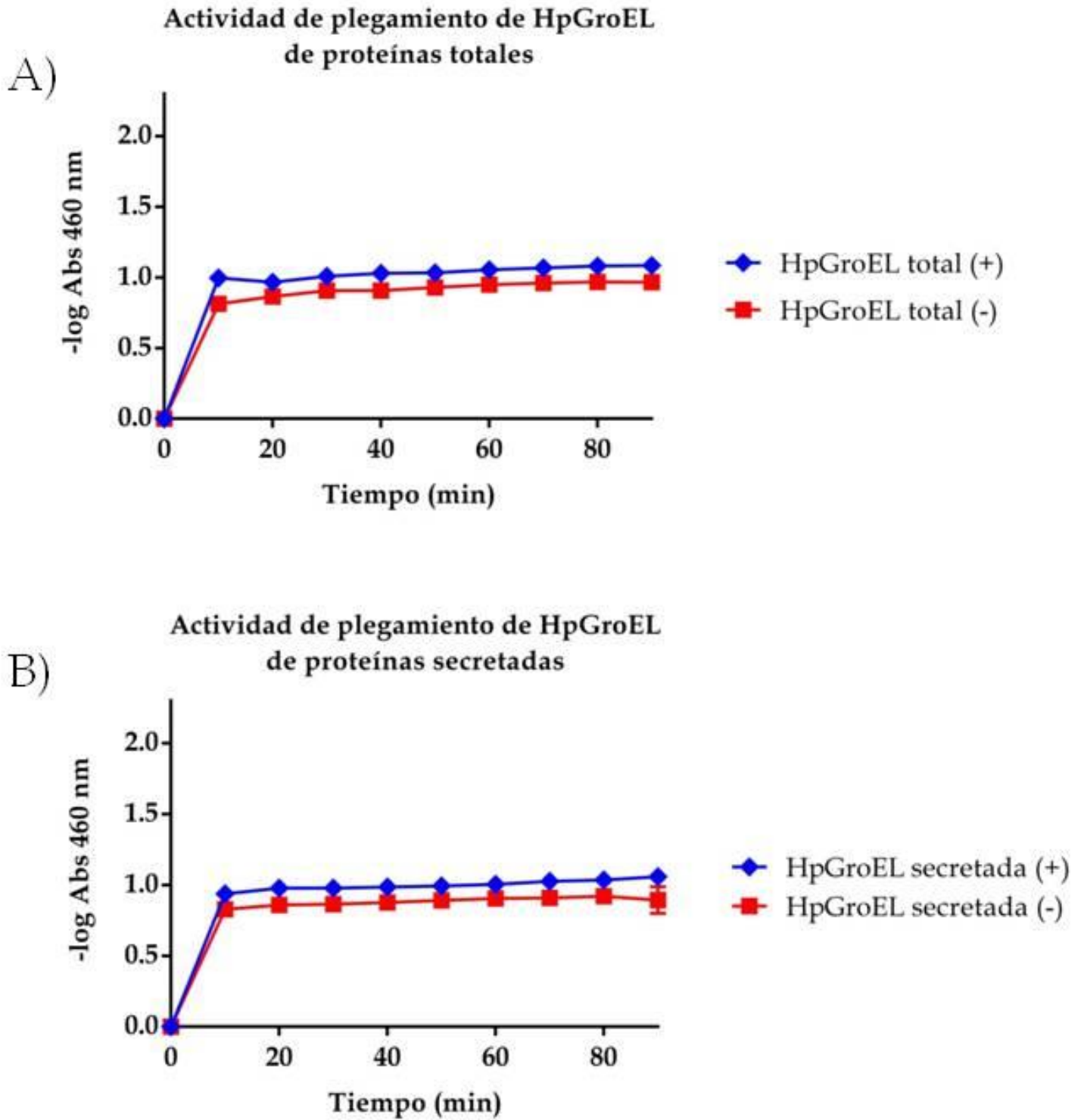
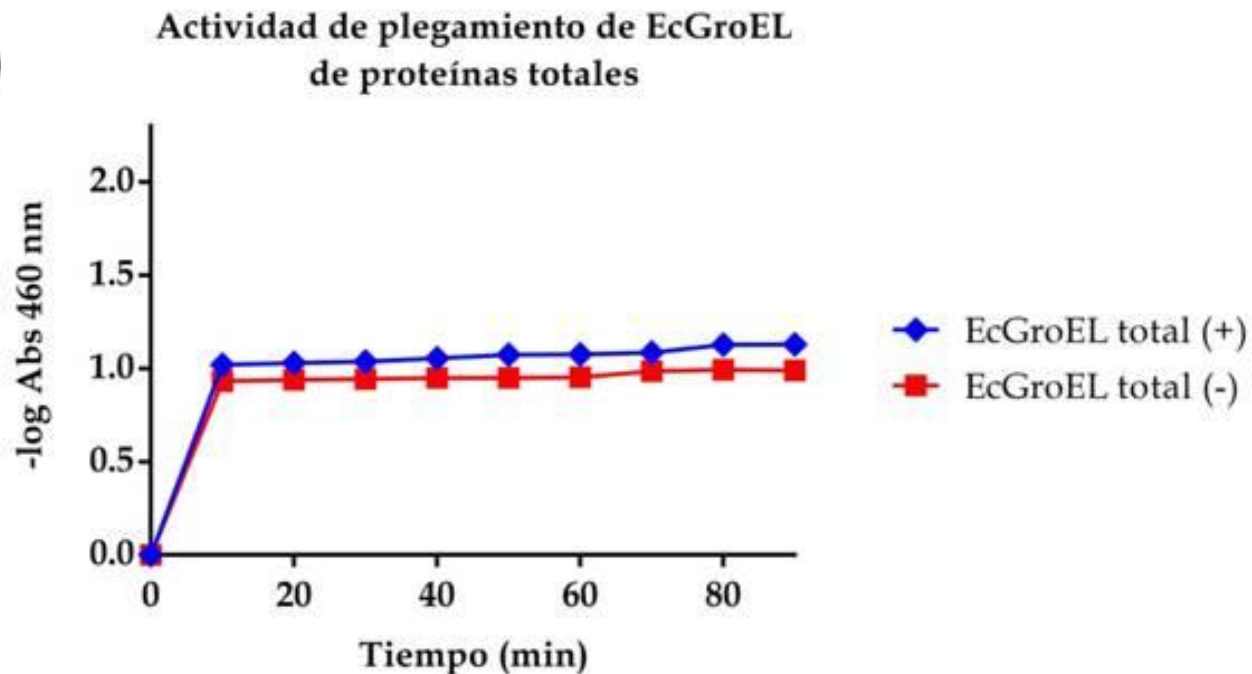


Figura 16. HpGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 2. (A) HpGroEL total con rodanasa (+)◆, HpGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) HpGroEL secretada con rodanasa (+)◆, HpGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

A)



B)

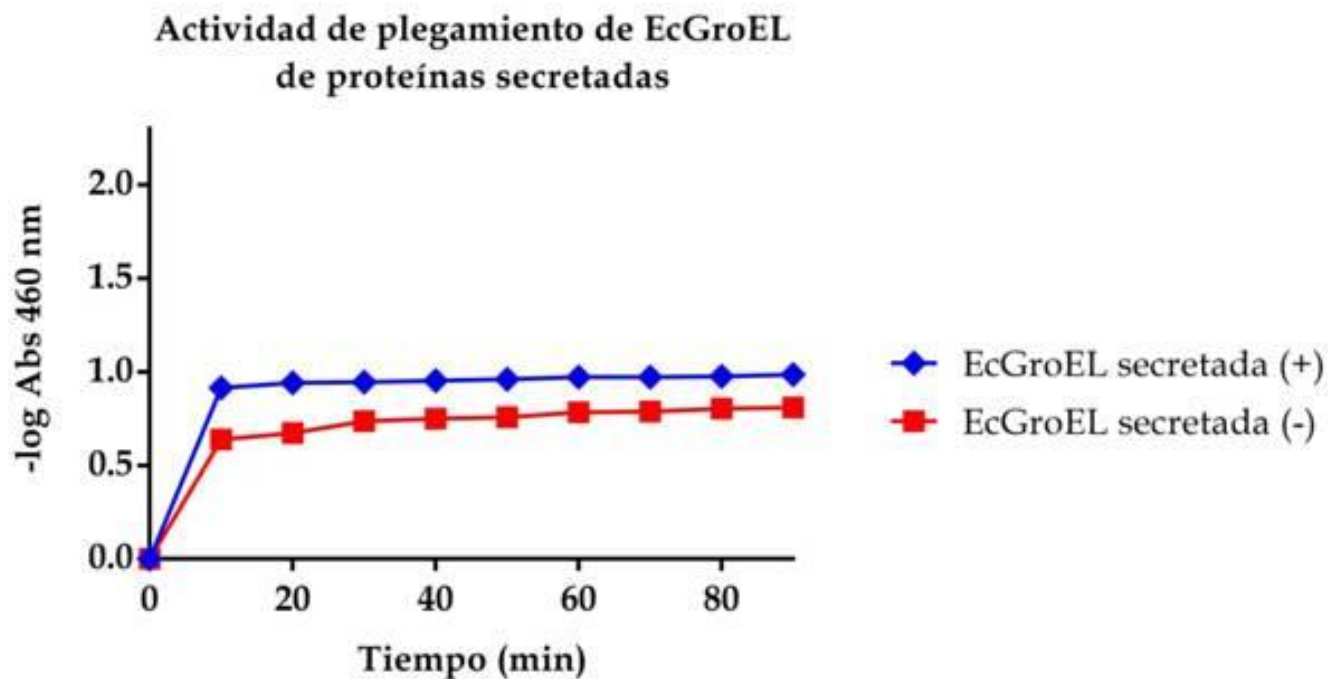


Figura 17. EcGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 2. (A) EcGroEL total con rodanasa (+)◆, EcGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) EcGroEL secretada con rodanasa (+)◆, EcGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

### 8.1.2. HpGroEL mostró actividad de chaperonina a pH 4

Decidimos utilizar el pH 4 debido a que es normal encontrar estos valores en las secreciones estomacales después de que la comida es ingerida.

HpGroEL total (+) ( $p= 0.0358$ ) mostró actividad de plegamiento durante 80 min (Figura 18 A).

HpGroEL secretada (+) ( $p= 0.0086$ ) tuvo actividad de plegamiento constante desde los 10 min hasta los 70 min, teniendo su máxima actividad a los 80 min (Figura 18 B).

HpGroEL total (-) y secretada (-) tuvieron un valor de  $p$  mayor a  $\alpha 0.05$  (Figura 18 A y Figura 18 B).

EcGroEL total (+) tuvo un valor de  $p$  mayor a  $\alpha 0.05$  (Figura 19 A).

EcGroEL secretada (+) ( $p= 0.0395$ ) mostró un aumento en su actividad de plegamiento entre los 60 y 80 min, actividad que disminuyó a los 90 min (Figura 19 B).

EcGroEL total (-) y secretada (-) tuvieron un valor de  $p$  mayor a  $\alpha 0.05$  (Figura 19 A y Figura 19 B).

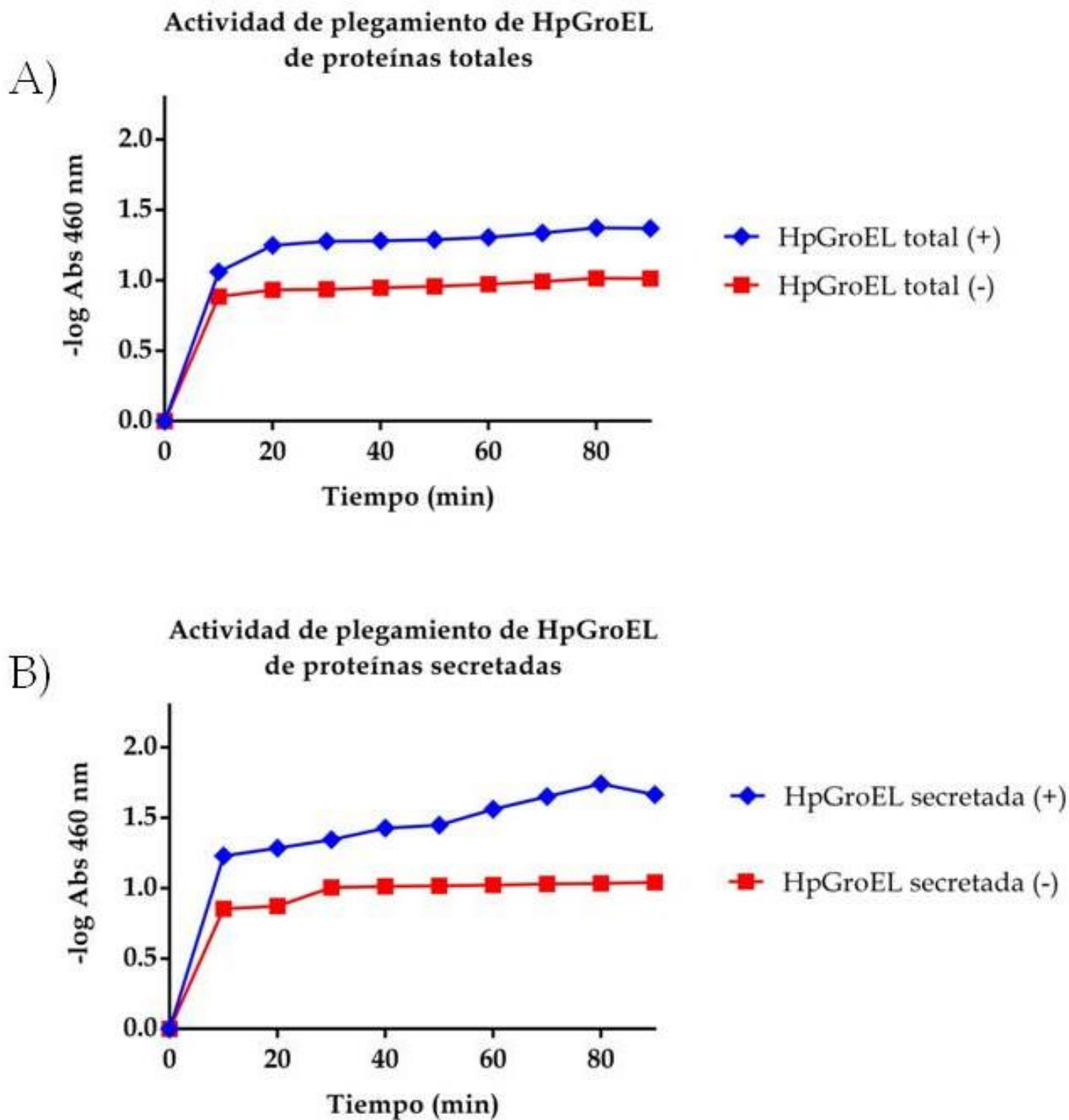


Figura 18. HpGroEL en las proteínas secretada mostró actividad de plegamiento a pH 4. (A) HpGroEL total con rodanasa (+)◆, HpGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) HpGroEL secretada con rodanasa (+)◆, HpGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

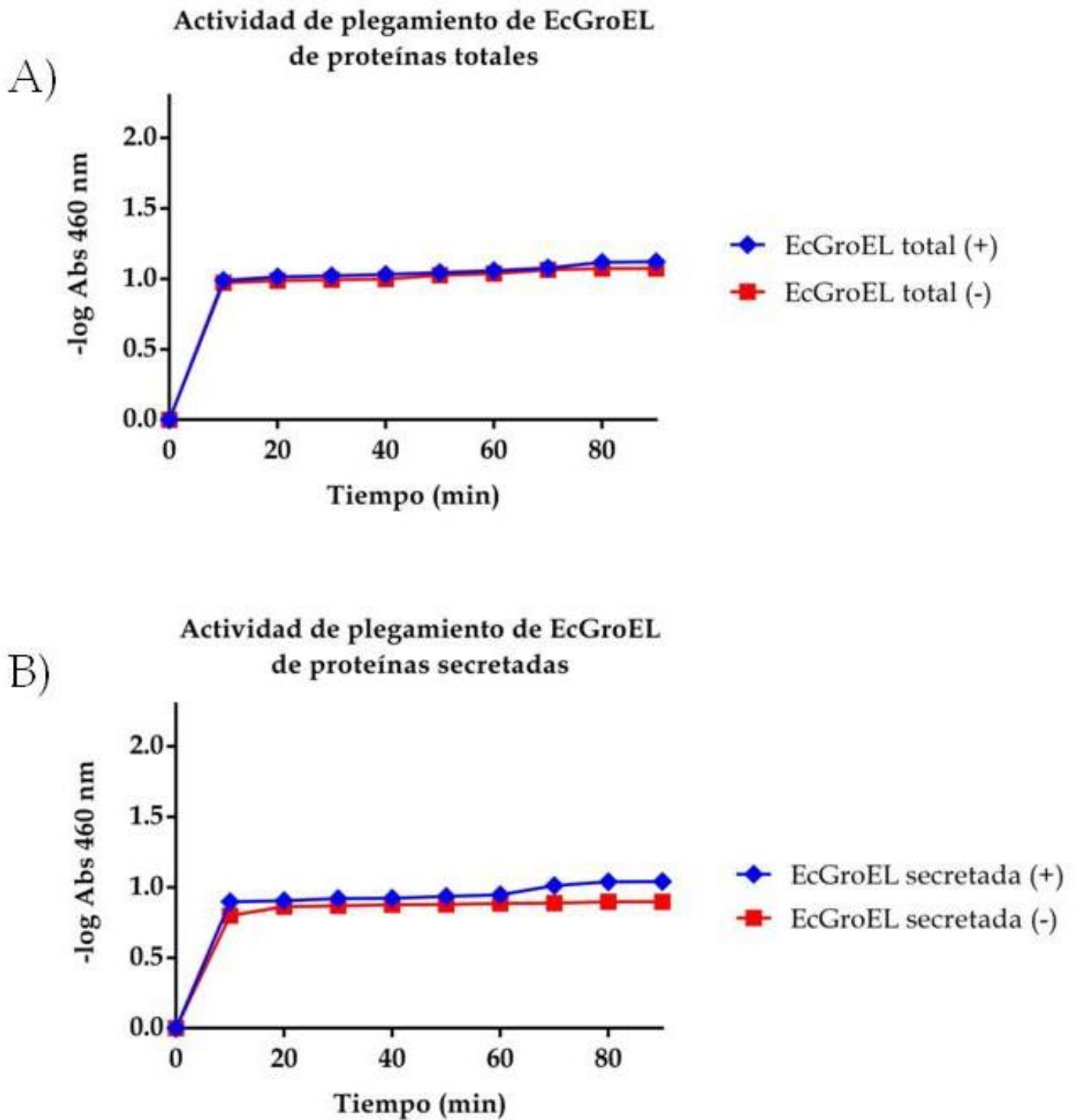


Figura 19. EcGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 4. (A) EcGroEL total con rodanasa (+)◆, EcGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) EcGroEL secretada con rodanasa (+)◆, EcGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

### 8.1.3. HpGroEL mostró actividad de plegamiento a pH 7

Previamente se ha reportado que *H. pylori* tiene la capacidad de establecerse en el duodeno el cual tiene secreciones con un pH promedio de 7, por este motivo quisimos conocer si a este pH HpGroEL mostraba actividad de chaperonina.

HpGroEL secretada (+) ( $p= 0.0156$ ) tuvo un aumento constante durante 80 min en su actividad de plegamiento (Figura 20 B).

HpGroEL total (+), (-), secretada (-), tuvieron valores de p mayores a  $\alpha 0.05$  (Figura 20 A y B).

EcGroEL total (+), (-) y secretada (+), (-) tuvieron valores de p mayores a  $\alpha 0.05$  (Figura 21 A y B).

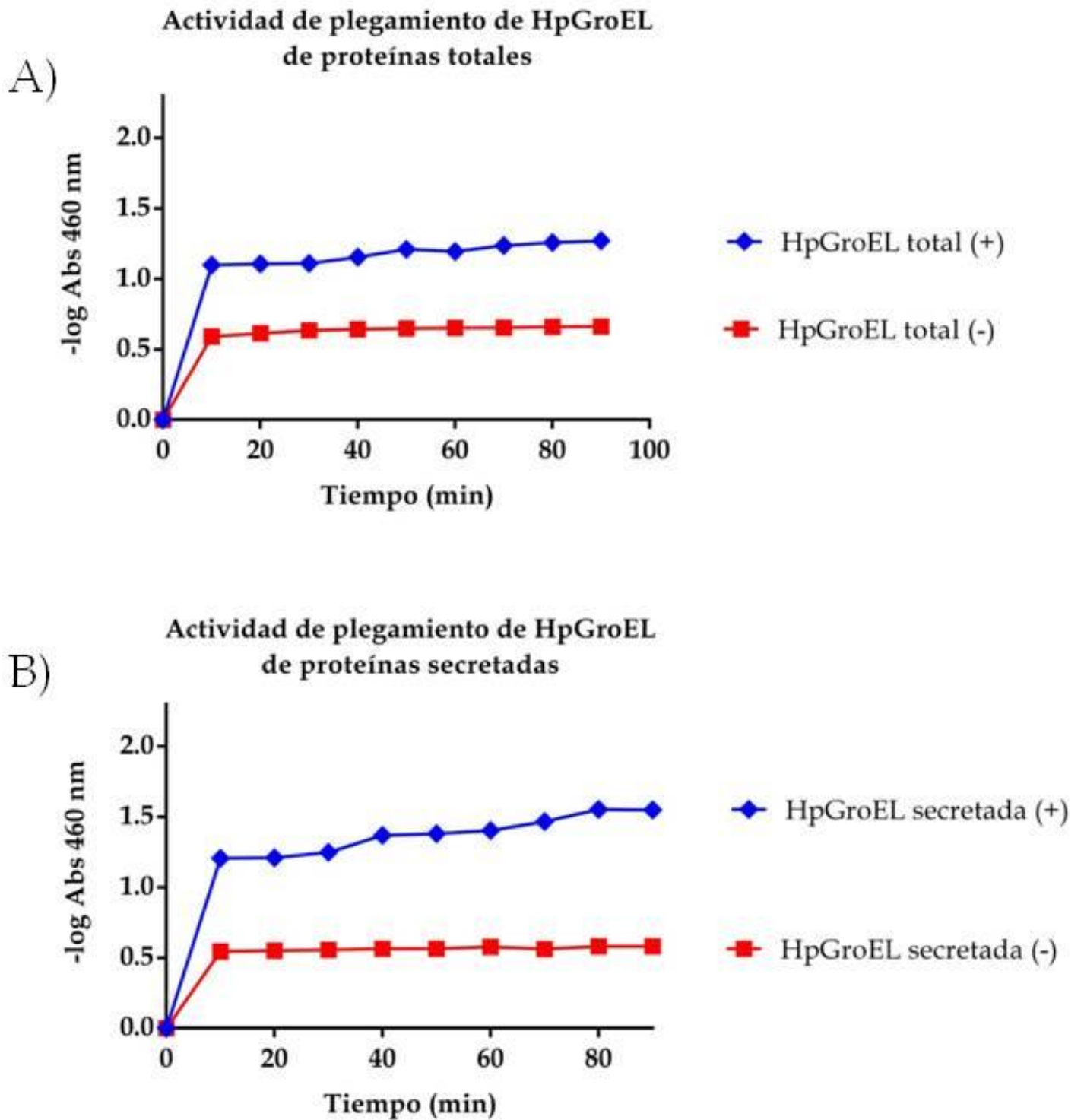


Figura 20. HpGroEL en las proteínas secretadas mostró actividad de plegamiento a pH 7. (A) HpGroEL total con rodanasa (+)◆, HpGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) HpGroEL secretada con rodanasa (+)◆, HpGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

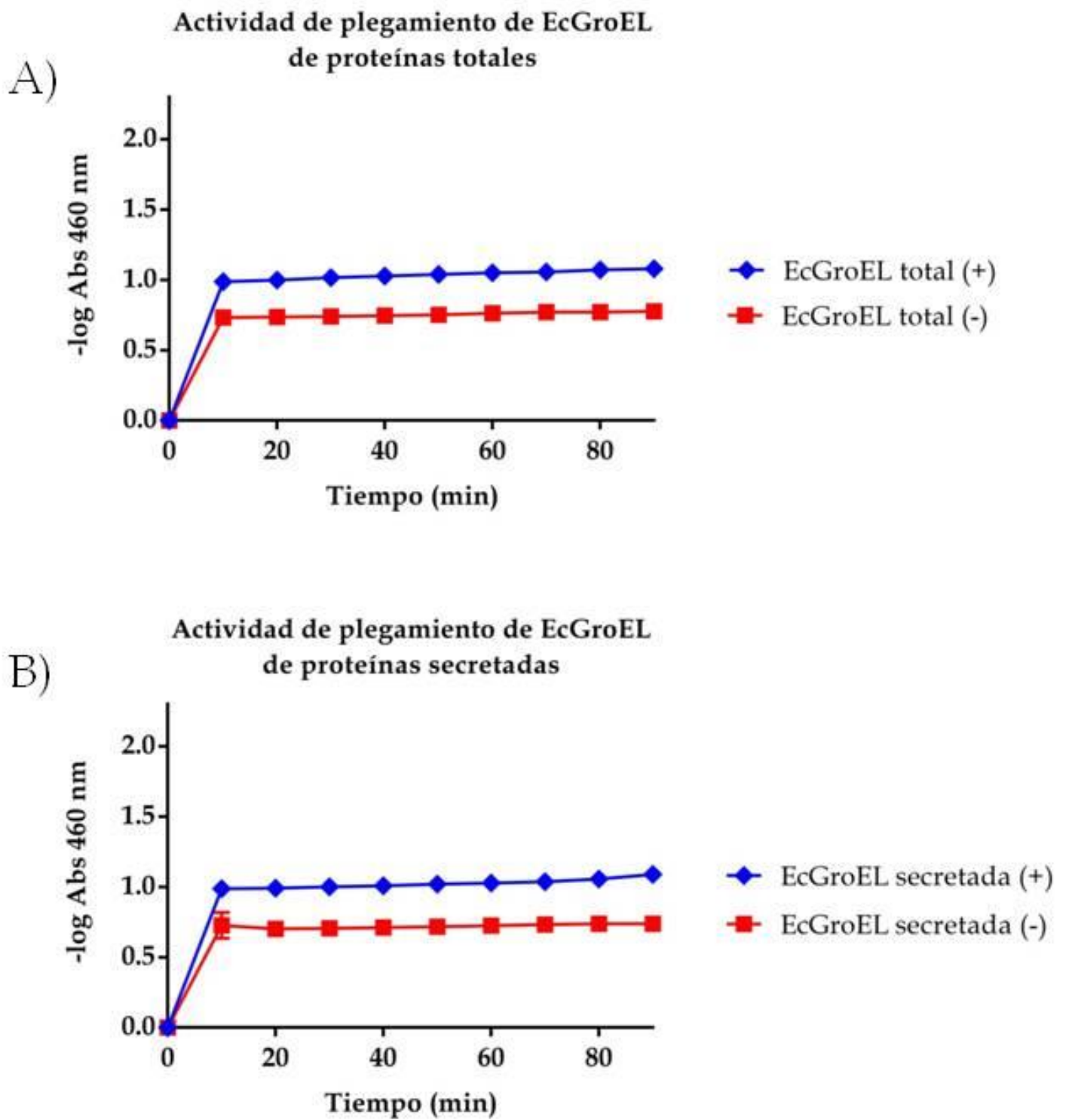


Figura 21. EcGroEL de las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 7. (A) EcGroEL total con rodanasa (+)◆, EcGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) EcGroEL secretada con rodanasa (+)◆, EcGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

#### **8.1.4. HpGroEL no mostró actividad de plegamiento a pH 8**

Como pudimos observar que HpGroEL tenía actividad de chaperonina a pH 7 quisimos saber si esa actividad permanecía en un valor de pH más alcalino, por este motivo decidimos realizar la prueba con pH 8.

HpGroEL total (+), (-) y secretada (+), (-) tuvieron valores de p mayores a  $\alpha$  0.05 (Figura 22 A y B).

EcGroEL total (+), (-) y secretada (+), (-) tuvieron valores de p mayores a  $\alpha$  0.05 (Figura 23 A y B).

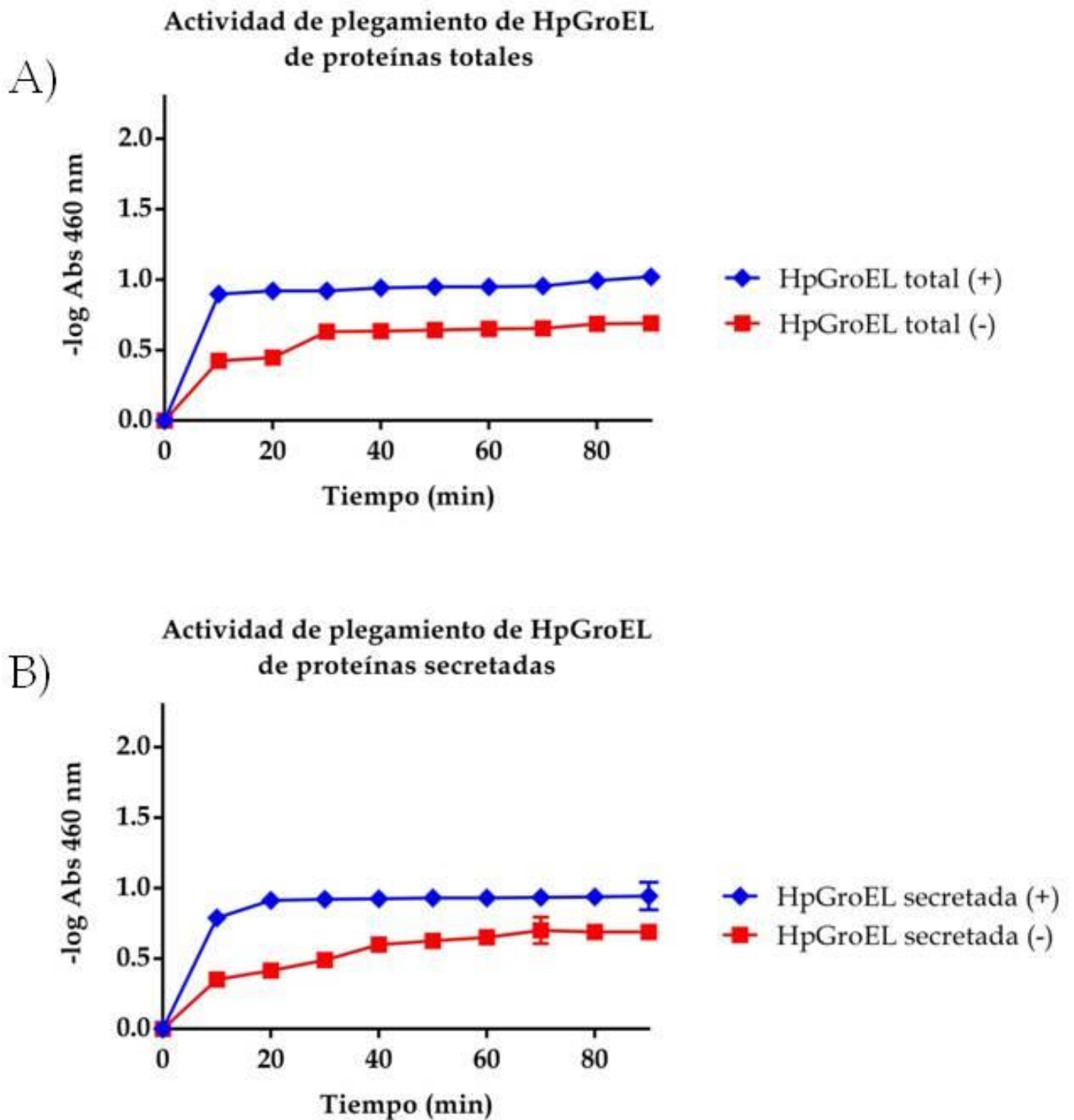


Figura 22. HpGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 8. (A) HpGroEL total con rodanasa (+)◆, HpGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) HpGroEL secretada con rodanasa (+)◆, HpGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

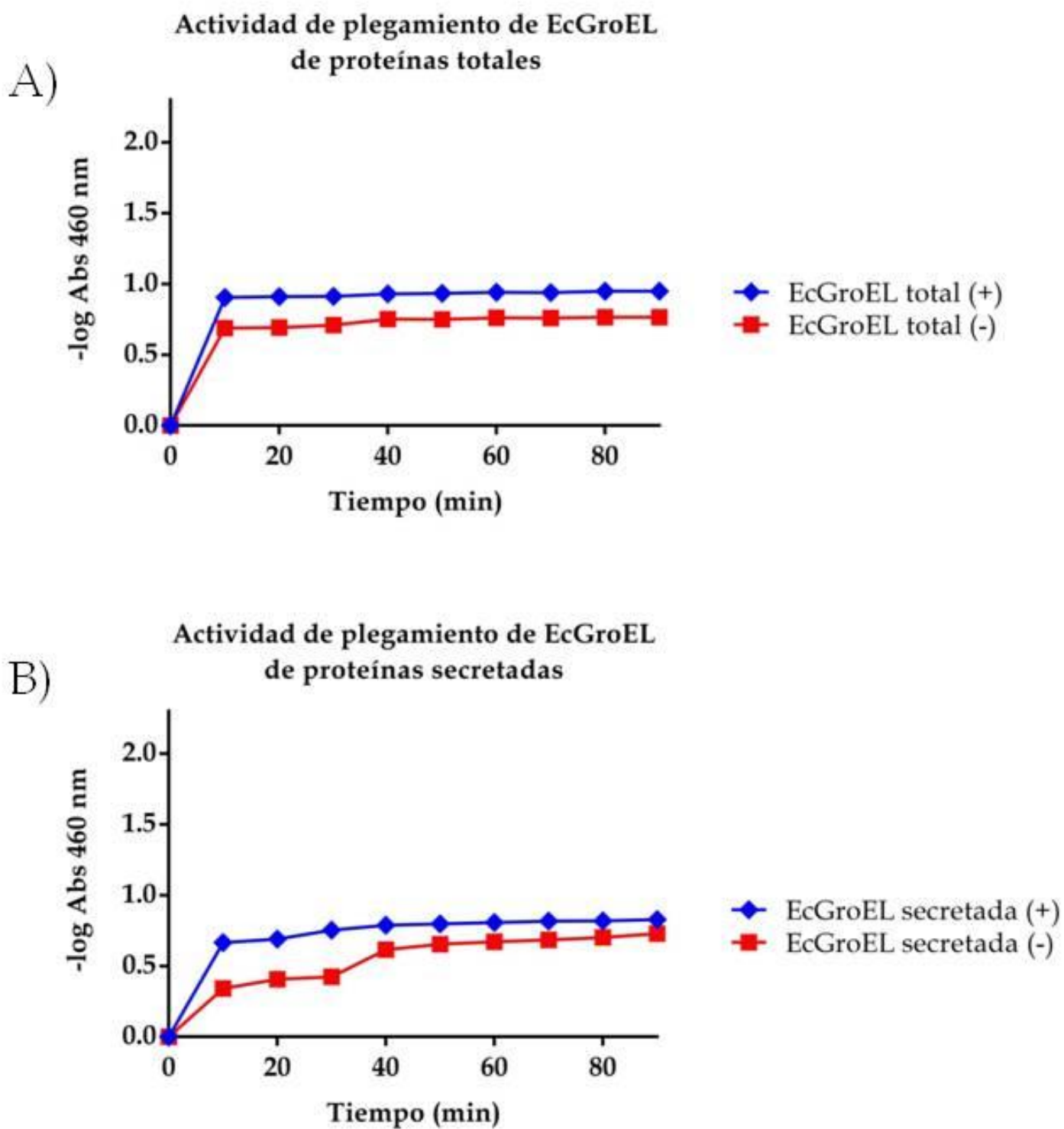


Figura 23. EcGroEL en las proteínas totales y secretadas no mostró actividad de plegamiento a pH 8. (A) EcGroEL total con rodanasa (+)◆, EcGroEL total sin rodanasa (-)■. (B) EcGroEL secretada con rodanasa (+)◆, EcGroEL secretada sin rodanasa (-)■.

## 9. ANOVA

Para saber si existían cambios significativos en la actividad de plegamiento de HpGroEL entre los diferentes valores de pH, se realizó un análisis comparativo de ANOVA, tomando como valores significativos aquellos que tuvieran un valor de  $p < 0.05$ .

En dicha prueba obtuvimos los siguientes resultados:

- En el caso de HpGroEL total con rodanasa (+) ( $F(4, 10) = 130.2$ ,  $p = < 0.0001$ ), la actividad de plegamiento aumentaba en el pH 4 ( $p = 0.00358$ ) y 5 ( $p = 0.0093$ ) y disminuía cuando el pH era de 2 ( $p = 0.0599$ ) y 8 ( $p = 0.0591$ ).
- Para HpGroEL total sin rodanasa (-) ( $F(4, 10) = 294.5$ ,  $p = < 0.0001$ ), sus valores de  $p$  fueron mayores a  $\alpha 0.05$  con excepción del pH 5 ( $p = 0.0010$ ).
- En HpGroEL secretada con rodanasa (+) ( $F(4, 10) = 1150$ ,  $p = < 0.0001$ ), su actividad de plegamiento aumentaba en el pH 4 ( $p = 0.0086$ ), 5 ( $p = 0.0217$ ) y 7 ( $p = 0.0156$ ) mientras que disminuía cuando el pH era de 2 ( $p = 0.0622$ ) y 8 ( $p = 0.0626$ ).
- Para HpGroEL secretada sin rodanasa (-) ( $F(4, 10) = 218.7$ ,  $p = < 0.0001$ ), se pudo observar que su actividad de plegamiento aumentaba cuando el pH estaba en 5 ( $p = 0.0166$ ) y disminuía cuando el pH era de 2 ( $p = 0.0703$ ) y 8 ( $p = 0.0822$ ).

Con estos resultados pudimos determinar que HpGroEL total tenía actividad de chaperonina a pH 4 y 5, mientras que HpGroEL secretada tenía esta actividad a pH 4, 5 y 7. En ambos casos HpGroEL no tuvo actividad de chaperonina a pH 2 y 8.

Con estos datos podemos concluir que la actividad de plegamiento de HpGroEL está relacionada con el pH.

## DISCUSIÓN

*H. pylori* es una bacteria patógena que tiene la capacidad de soportar el ambiente hostil del estómago, por lo tanto es importante conocer los mecanismos que le permiten a este patógeno crecer en este tejido.

Se creció a *H. pylori* bajo ayuno de hierro o con fuentes alternas de hierro como hemina y hemoglobina con la finalidad de estudiar a la chaperonina HpGroEL tanto en las proteínas totales como en las secretadas. Se pudo demostrar que HpGroEL tiene actividad de chaperonina la cual es dependiente del pH.

Se logró estandarizar el crecimiento de *H. pylori* y se corroboró que puede soportar su crecimiento usando como fuente de hierro hemina o hemoglobina.

Se obtuvieron las proteínas totales y secretadas de *H. pylori* en ayuno de hierro, hemina y hemoglobina y fueron utilizadas para identificar HpGroEL cuyo peso molecular ronda los 58 kDa. Su identidad fue corroborada por Western blot usando anticuerpo anti-GroEL de *E. coli* ya que se ha reportado que tiene reacción cruzada con HpGroEL (González, 2013).

HpGroEL fue detectada tanto en proteínas totales como en proteínas secretadas, en *E. coli* se ha reportado que la chaperonina es expresada en el citoplasma (Kusukawa, 1989). Como esperábamos esta proteína se encontró en la fracción de proteínas totales.

El anticuerpo anti- $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* reconoció a la proteína de *H. pylori*, porque en el Western blot se observó una banda a 116 kDa, esto corrobora lo reportado por González en 2013.

Se sabe que EcGroEL tiene actividad de chaperonina a pH 5 (Weber, 2000), para el caso de HpGroEL se estandarizó un protocolo que mostró actividad de esta chaperonina a pH 4, 5 y 7. En este mismo experimento se utilizó GroEL-GroES purificada de *E. coli* como un control para la reacción a pH 5. Los resultados obtenidos fueron similares a los reportados previamente.

La temperatura usada en el protocolo para medir la actividad de chaperonina HpGroEL fue de 25 °C, porque se ha reportado que EcGroEL no tiene actividad a 10 °C, (Mendoza y cols, 1991) ni a 30 ni 40 °C (Dungan, 1993). Probablemente las temperaturas de 10, 30 y 40 °C no favorecen la actividad de plegamiento (Horowitz, 1992).

El lapso de tiempo en el cual se midió la actividad de plegamiento de EcGroEL en el protocolo de Weber y Hayer-Hartl fue de 0 a 80 min, sin embargo para el caso de HpGroEL se sostuvo por 10 min más porque posiblemente HpGroEL es más resistente que EcGroEL.

Hasta la fecha no se han reportado experimentos de actividad de plegamiento para EcGroEL o HpGroEL a diferentes pH, sin embargo se sabe que la proteína rodanasa se encuentra estable en un rango de pH de 4 a 6, siendo el pH de 5 el óptimo, y a partir del pH 7 en adelante existe una pérdida significativa del plegamiento (Horowitz, 1992), lo cual coincide con los rangos de pH donde observamos actividad de HpGroEL secretada (4, 5 y 7). Sin embargo, HpGroEL total sólo tuvo actividad a pH 5, posiblemente esto se deba a que la proteína secretada se carga con iones de hierro los cuales le permite ser más resistente a estos pH ya que se sabe que esta chaperonina puede unir iones hierro mientras que EcGroEL no, la cual sólo tuvo actividad de plegamiento a pH 5.

En conjunto nuestros resultados son los primeros hallazgos que podrían explicar los mecanismos que le permiten a *H. pylori* soportar el ambiente ácido del estómago para poder colonizar el tejido.

## CONCLUSIONES

1. HpGroEL está presente en las proteínas totales y secretadas de *H. pylori* independientemente de la fuente de hierro con la que fue suplementado el medio de cultivo.
2. HpGroEL se expresa más en las proteínas secretadas en comparación con las proteínas totales.
3. La expresión de HpGroEL está regulada por hemina y hemoglobina.
4. HpGroEL en las proteínas totales tiene actividad de chaperonina a pH 4 y 5.
5. HpGroEL de las proteínas secretadas tienen actividad de chaperonina a pH 4, 5 y 7.
6. HpGroEL no tienen actividad de chaperonina a pH 2 y 8.
7. La actividad de plegamiento de HpGroEL está relacionada con el pH.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Achtman M, Azuma T, Douglas E, Berg Ito Y, Morelli G, Pan Z, Suerbaum S, Stuart A, Ende A and Doorn L. (1999). Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Molecular Microbiology*, 459-470.
2. Agudo S, Alarcón T, Cibrelus L, Urruzuno P, Martínez M, López-Brea M. (2009). High percentage of clarithromycin and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates obtained from Spanish children. *Rev Esp Quimioter*, 88- 92.
3. Alarcón T, Martínez MJ, Urruzuno P, Cilleruelo ML, Madruga D, Sebastián M. (2003). Prevalence of CagA and VacA Antibodies in children with *Helicobacter pylori* associated peptic ulcer compared to prevalence in pediatric patients with active or nonactive chronic gastritis. *Clin Diag Lab Immunology*, 842-844.
4. Allen LA. (2008). Rate and extend of *Helicobacter pylori* phagocytosis. *Methods Mol Biol*, 147 -157.
5. Amieva MR, El-Omar EM. (2008). Host bacterial interactions infection. *Gastroenterology*, 306 - 23.
6. Andres E, Dali-Youcef N, Vogel T. (2009). Oral cobalamin (vitamina B12) treatment. An update. *Int J Lab Hematol*, 1-8.
7. Atherton J, Peek RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. (1997). Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol*, 92 - 99.
8. Axon, A. T. R. (1995). Review Article: is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route? *Aliment Pharmacol*, 585-588.
9. Basu M, Czinn SJ, Blanchard TG. (2004). Absence of catalase reduces long-term survival of *Helicobacter pylori* in macrophage phagosomes. *Helicobacter*, 211-6.

10. Bauerfeind P, Garner R, Dunn B, Mobley H. (1997). Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut*, 25-30.
11. Bernal, R. R. (2007). *Helicobacter pylori* métodos de diagnóstico SAM Esófago, estómago y duodeno Sistema de Actualización médica. Intersistemas, 39 – 44.
12. Beswick E, Suarez G, Reyes V. (2006). *Helicobacter pylori* and host interactions that influence pathogenesis. *World J Gastroenterol*, 5599-5605.
13. Bizzozero G. (1893). Ueber die schlauchförmigen drüsen des megendarmkanals und die bazillenförmigen epithelien zudem oberflächenepithel der scheidewand. *Arch. F. Mikr. Anat*, 82 – 152.
14. Blaser, M. J. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*, 2111 – 2115.
15. Boneca, I. G., Reuse, H., Epinat, J. C., Pupin, M., Labigne, A., Moszer, I. (2003). A revised annotation and comparative analysis of *Helicobacter pylori* genomes. *Nucleic Acid Research*, 1704 – 1714.
16. Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L. y Sigler, P.B. (1994). "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å." *Nature*, 578-586.
17. Bruce MG, Maaroos HI. (2008). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 1 - 6.
18. Caristo E, Parola A, Rapa A, Vivenza D, Raselli B, Dondi E, Boldorini R and Oderda G. (2008). Clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* Strains isolated from Children Gastric Antrum and Fundus as assessed by Fluorescent *in-situ* hybridization and culture on four sector Agar plates. *Helicobacter*, 557- 563.
19. Carlsohn E, Nystrom J, Bolin I. (2006). HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. *Infect Immun*, 920-926.

20. Carmona, S. R. (2004). Erradicación de *Helicobacter pylori* en dispepsia no ulcerosa. *Rev Gastroenterol Mex*, 288 -289.
21. Cervantes, G. E. (2006). *Helicobacter pylori* e infecciones asociadas. *Rev Fac Med*, 163 - 168.
22. Cuevas Acuña MT, López García AI, Paz Martínez D, Galindo García JA, Papaqui Tapia S, Garza Yado Mde L, Arana Muñoz O, Palacios Flores C, Pérez Fernández S. (2006). Frequency of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic urticaria of Puebla University Hospital. *Rev Alerg Mex*, 174 -178.
23. De La Torre, B. A. (2003). Neoplasias gástricas. *Rev Gastroenterol Mex*, 66 - 67.
24. Dehesa, V. M., Robles, D. G. (1997). Consenso Mexicano sobre *Helicobacter pylori*. *Rev Gastroenterol Mex*, 41 - 5.
25. Di Lorenzo. (2005). Subcommittee on chronic abdominal pain. Chronic Abdominal pain in children. *Pediatrics*, 370-381.
26. Díaz-Reganon J, Alarcón T, Domingo D, López-Brea M. (2006). Susceptibility of 36 *Helicobacter pylori* clinical isolates to four first-line antibiotics and virulence factors. *Rev Esp Quimioter*, 34 - 8.
27. Doenges J. L. (1938). Spirochetes in the gastric glands of macacus rhesus and humans without definite history of related disease. *Proc Soc Exp Med Biol*, 536- 38.
28. Dungan JM, Horowitz PM. (1993). Thermally perturbed rhodanese can be protected from inactivation by sel-association. *J Protein Chem*, 311-321.
29. Forné, B. (2001). Diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* y tratamiento de de la infección en pacientes con úlcera duodenal. Tesis Doctoral, 12 - 17.
30. Gisbert JP, Calvet X, Bermejo F. (2013). III Spanish Consensus Conference on *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterol Hepatol*, 340-374.

31. Glocker E, Bogdan C, Kist M. (2007). Characterization of rifampicin-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates from Germany. J Antimicrob Chemother, 874-879.
32. Gómez, M. J., Garrido, S. G., Cordero, H. H., Arana, P. G., Reyes, D. A. (1999). Detección del *Helicobacter pylori* mediante tinción de una impronata de mucosa gástrica con azul de metileno. Rev Gastroenterol Mex, 47
33. González M, Velázquez N. (2013). *Helicobacter pylori* secretes the chaperonin GroEL (HSP60), which binds iron. FEBS Letters, 1823-1828.
34. González, M. J. E., Lelal, V. L., Guzmán, L. S., Guzmán, T. G. M., González, M. N. A. (2004). *Helicobacter pylori* y enfermedad. Revista Alergia México, 218 - 25.
35. Goodwin CS, Armstrong JA, Chilvers T, Peters M, Collins MD, Sly L, McConnell W, Harper WES. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. Nov. And *Helicobacter mustelae* com. Nov., respectively. Int J Syst Bacteriol, 397.
36. Graham D and Shiotani A. (2008). New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 321-331.
37. Graham DY, Lu H, Yamaoka Y. (2009). African, Asian or Indian enigma, the East Asian *Helicobacter pylori*: facts or medical myths. J Dig Dis, 77 - 84.
38. Höcker M, Hohenber P. (2003). *Helicobacter pylori* virulence factors - one part of a big picture. Lancet, 1231-1233.
39. Holcombe, C. (1992). *Helicobacter pylori*: el enigma africano. Gut, 429 - 431.
40. Horovitz, A., Fridmann, Y., Kafri, G. y Yifach, O. (2001). "Review: allostery in chaperonins". J. Struct. Biol, 104-114.
41. Horowitz PM, Xu R. (1992). Acid pH-induced conformational changes in bovine liver rhodanese. J Bio Chem, 1946-1949.

42. Huang X, Qu X, Yan W. (2010). Iron deficiency anemia can be improved after eradication of *Helicobacter pylori*, 272-278.
43. Hunt, J. F., Weaver, A. J., Landry, S. J., Gierasch, L. y Deisenhofer, J. (1996). "The crystal structure of the GroES co-chaperonin at 2.8 Å resolution". *Nature*, 37-45.
44. John Albert M, Al-Mekhaizeem K, Neil L. (2006). High prevalence and level of resistance to metronidazole, but lack of resistance to other antimicrobials in *Helicobacter pylori*, isolated from a multiracial population in Kuwait. *Aliment Pharmacol Ther*, 1359 - 1366.
45. Kim J, Kim J, Kim N. (2005). Distribution of fluoroquinolone MICs in *Helicobacter pylori* strains from Korean patients. *J Antimicrob Chemother*, 965 - 967.
46. Krienitz W. (1906) Ueber das auftreten von spirochaeten verschiendner form im mageningalt bei carcinoma ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr*, 872.
47. Kuster, J. G., Van, A. H. M., Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews*, 449 - 90.
48. Kusukawa N. (1989). Effects of mutations in heat-shock genes groES and GroEL. *The EMBO Journal*, 3517-3521.
49. Laine L, Fennerty B, Osato M, Sugg J, Suchower L, Probst P and Levine JG. (2000). Esomeprazole-based *Helicobacter pylori* eradication therapy and the effect of antibiotic resistance: results of three US multicenter, double-blind trials. *Am J Gastroenterol*, 3393 - 8.
50. Long M, Luo J, Li Y, Zeng FY, Li M. (2009). Detection and evaluation of antibodies against neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* in patients with gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 2381 - 2388.
51. López-Brea M, Alarcón T, Domingo D, Sánchez I, Martínez MJ, Sanz JC. (1998). Evaluación de una técnica de western-blot (Helicoblot 2.0) para la detección de anticuerpos frente a antígenos específicos de *Helicobacter pylori* en niños. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 275-279.

52. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA. (2012). Management of *Helicobacter pylori* infection, the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut*, 646-64.
53. Marcano, L. M. J., Infante, B. F., Rangel, C., Rojas, M. A. (2006). Theoretical model of immune response in *Helicobacter pylori* gastric mucosa infection. *Bioline International*. 26.
54. Marsall, B. J., Warren, J. P. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1311 - 1315.
55. Marshall B, Goodwin C. (1987). Revised nomenclature of *Campylobacter pyloridis*. *Inf J Syst Bacteriol*, 68.
56. Marshall BJ, Amsrong J, Mcgechie D, Glancy R. (1985). Attempt to fulfill Koch's postulates for *Campylobacter pylori* *Med J Aust*, 436 - 439
57. Marshall, B. J. (1983). Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis (letter). *Lancet*, 1273 - 75.
58. Mégraud F. (1995). Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Clin Gastroenterology*, 507 - 18.
59. Megraud F. (2004). *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance and advantages in testing. *Gut*, 1374-1384.
60. Mendoza J. (1991). On the chaperonin activity of GroEL at heat-shock temperatura. *The International Jpurnal of Biochemistry & Cell Biology*, 1375-1385.
61. Moayyedi P, Soo S, Deeks J. (2006). Eradication of *Helicobacter pylori* for non-ulcer dyspepsia. *Cochrane Database Syst Rev*, CD002096.
62. Morris A, Nicholson G. (1987). Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Am J Gastroenterol*, 192 - 99.
63. Muhsen K, Cohen D. (2008). *Helicobacter pylori* infection and iron stores: a systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*, 323-340.

64. Neal JT, Peterson TS, Kent ML. (2013). *Helicobacter pylori* virulence factor CagA increases intestinal cell proliferation by Wnt pathway activation in a transgenic zebrafish model. *Dis Model Mech*, 802-810.
65. Nilsson, H. O., Aleljung, P., Nilsson, I., Tyszhiewicz, T., Wadstrom, T. (1996). Immunomagnetic bead enrichment and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in humans stools. *J Microbiol Meth*, 73-9.
66. Nomura, A. M. Y., Pérez, G. I., LeeJ, M. J., Blaser, M. J. (2002). Relationship between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol*, 1054 - 1059.
67. Nvström J, Svennerholm AM. (2007). Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine*, 2591 - 2598.
68. O'Connor HJ. (1999). *Helicobacter pylori* and gastro-oesophageal reflux disease-clinical implications and management. *Aliment Pharmacol Ther*, 117-127.
69. Oderda G, Shcherbakov P, Botems P, (2007). Results from the pediatric European register for treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 150-6.
70. Olfat F, Zheng Q, Oleastro M, (2005). Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 151-156.
71. Pakodi, F., Abdel-Salam, O. M., Debreceni, A., Mózsik, G. (2000). *Helicobacter pylori*. One bacterium and a broad spectrum of human disease! An overview. *J Physiol Paris*, 139 - 152.
72. Palmer, ED. (1954). Investigation of the gastric spirochaetes of the human. *Gastroenterol*, 218 - 20.
73. Parkin, D. M. (2006). The global health burden on infection-associated cancer in the year 2002. *Int J Cancer*, 3030 - 3040.
74. Parsonnet, J. (1998). *Helicobacter pylori*. *Infect Dis Clin North Am*, 185 - 97.

75. Pineda, C. B. E. (2007). *Helicobacter pylori* y cáncer. Rev Gastroenterol Mex, 35 - 36.
76. Pounder, R. E. (1995). The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther, 33 - 37.
77. Puig I. (2016). Eficacia del tratamiento guiado por el cultivo en la infección por *Helicobacter pylori*. Tesis doctoral, 35-38.
78. Raffeeey H, Ghotaslau R, Nikuask S. (2007). Primary resistance in *Helicobacter pylori* isolated in children from Iran. J infect Chemother , 291-295.
79. Raguza D, Granato CFH, Kawakami E. (2005). Evaluation of the stool antigen test for *Helicobacter pylori* in children and adolescents. Dig Dis Sci, 453-457.
80. Rimbara E, Noguchi N, Kawai. (2007). Correlation between substitutions in penicillin binding protein 1 and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. Microbiol Immunol, 939-944.
81. Rodriguez M, Salgado R, Rios CF. (2005). High eradication rates of *Helicobacter pylori* infection with first and second line combination of esomeprazole, tetracycline and metrodinazole in patients allergic to penicillin. Dig Dis Sci, 634-639.
82. Rokkas T, Pistiolas D, Sechopopulos P. (2007). Relationship between *Helicobacter pylori* infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis. Clin Gastroenterol Hepatol, 1413-1437.
83. Rudi J, Kolb C, Maiwald M, Kuck D, Sieg A, Galle P, Stremmel W. (1998). Diversity of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genes and relationship to VacA and CagA protein expresion, cytotoxin production, and associated diseases. J Clin Microbiol, 944-948.
84. Rudnicka A, Chimela M. (2004). Inflammation and host immune response in *Helicobacter pylori* infections. Curr Trends Immunol, 1-19.
85. Salomon H. (1896). Über das spirillum des Saugetiermagens und sein Verhalten zuden belegzellen. Zentralbl. Bacteriol, Mikrobiol. Hyg, 433.

86. Samuel L. Palframan, Terry Kwok, and Kipros Gabriel. (2012). Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 92.
87. Simala-Grant JL, Taylor DE. (2004). Molecular biology methods for the characterization of *Helicobacter pylori* infections and their diagnosis. *APMIS*, 886-897.
88. Skirrow M. B. (1977). *Campylobacter enteritis* "a new disease". *British Medical Journal*, 9 - 11.
89. Stanghellini V, Chan FK, Hasler WL, Malagelada JR, Suzuki H, Tack J, Talley NJ. (2016). Rome IV- Gastroduodenal Disorders. *Gastroenterology*, 1380-1392.
90. Stasi R, Sarpatwari A, Segal JB. (2009). Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood*, 1231-1240.
91. Steer H.W. (1975) Ultrastructure of cell migration through the gastric epithelium and its relationship to bacteria. *J Clin Pathol*, 639 - 646.
92. Steven J, Czinn MD. (2005). *Helicobacter pylori* infection: Detection, investigation and management. *J Pediatr*, 21-26.
93. Suerbaum, S., and P. Michetti. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med*, 1175 - 1186.
94. Suganuma M, Kuzuhara T, Yamaguchi K, Fujiki H. (2006). Carcinogenic Role of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Inducing Protein of *Helicobacter pylori* in Human Stomach. *BME*, 1 - 8.
95. Tytgat, N. J. (2003). *Helicobacter pylori* associated duodenal ulcer disease. *Rev Gastroenterol Mex*, 56 - 58.
96. Unemo M, Aspholm-Hurtig M, Ilver D, Bergstrom J, Boren T, Danielsson D, Teneberg S. (2005). The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem*, 15390-15397.

97. Villoria A, Garcia P, Calvet X. (2008). Meta-analysis: high- dose proton pump inhibitors vs standard dose in triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*, 868-77.
98. Weber F, Hayer-Harlt. (2000). Rfolding of Bovine Mitochondrial Rhodanese. *Methods in Molecular Biology*, 117-126.
99. Weigt J, Malfertheiner P. (2009). Influence of *Helicobacter pylori* on gastric regulation of food intake. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 522 - 5.
100. Wen S, Moss SF. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *Cancer Lett*, 1 -8.
101. Wirh H, Yang M, Sanabria-Valentin E, Berg D, Dubois A and Blaser MJ. (2006). Host Lewis phenotype-dependent *Helicobacter pylori* Lewis antigen expression in rhesus monkeys. *FASEB J*, 1534 - 1536.
102. Woo HY, Park D, Park H, Kim M, Kim D, Kim IS. (2009). Dual Priming Oligonucleotide base multiplex PCR for the detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin resistance with Gastric Biopsy Specimens. *Helicobacter*, 22 - 28.
103. Xu Z, Horwich A.L y Sigler, P.B. (1997). "The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature*, 741-750.
104. Xu, Q., Morgan, R. D., Roberst, R. J., Blazer, M. J. (2000). Identification of type II restriction and modification systems in *Helicobacter pylori* reveals their substantial diversity among strains. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 9671 - 6.
105. Yaghoobi M, Farrokhyar F, Yuan Y. (2010). Is there an increased risk of GERD after *Helicobacter pylori* eradication? A meta-analysis. *AM J Gastroenterol*, 1007-1013.
106. Yamaoka Y, Kato M and Asaka M. (2008). Geographic Differences in Gastric Cancer Incidence can be explained by differences between *Helicobacter pylori* strains. *Intern Med*, 1077 - 1083.

107. Yamazaki S, Kato S, Matsukura N. (2005). Identification of *Helicobacter pylori* and the *cagA* genotype in gastric biopsies using highly sensitive realtime PCR as a new diagnostic tool. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 4.
108. Yuan W, Li Y, Yang K. (2010). Iron deficiency anemia in *Helicobacter pylori* infection: meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand Gastroenterol*, 665-76.

# ANEXOS

## Soluciones

### ➤ Medio casman (1L.)

43 g. de medio casman

50 mL de sangre de carnero desfibrinada

7 mL de antibiótico

Disolver en 1 L. de agua caliente

### ➤ Hemoglobina (30 mL)

0.8064 g. de hemoglobina

Disolver en 30 mL de agua

### ➤ Medio casman con hemoglobina (210 mL)

10 mL de hemoglobina

200 mL de medio casman sin sangre.

### ➤ Hemina (30 mL)

2.05 g. de hemina

Disolver en 30 mL de NaOH 0.1 M.

### ➤ Medio casman con hemina (210 mL)

10 mL de hemina

200 mL de medio casman sin sangre

### ➤ Medio casman con dipirilo (205 mL)

5 mL de dipirilo

200 mL de medio casman sin sangre.

### ➤ Luria Bertani (500 mL)

20 g. de medio LB

Disolver en 500 mL de agua

### ➤ BSA

0.01g de BSA

Disolver en 1 mL de agua destilada sin hacer burbujas.

➤ **Acrilamida 30% (1 L)**

290g de Acrilamida

10g de Bis-acrilamida

Disolver en 60 mL de agua

Aforar, filtrar y guardar en un frasco ámbar a 4°C

➤ **Azul de Coomassie (100 mL)**

0.29g de azul de Coomassie

Disolver con agitación en 90 mL de metanol H<sub>2</sub>O y añadir 10 mL de CH<sub>3</sub>COOH

Filtrar con papel whatman

➤ **Antibiótico para medio casman (100 mL)**

0.1g de Ácido nalidixico

0.03g de Vancomicina

0.02g de Anfotericina

0.05g de Trimetoprim

Disolver en 100 mL de agua y guardar a -80 °C

➤ **Amortiguador de corrida para proteínas 2X (10 mL)**

2.5 mL de Tris-HCl 100mM pH 6.8

4 mL SDS

2 mL Glicerol

200 mL DTT 1M

0.1 mg de azul de bromofenol

Disolver agitando en 1 mL de agua y guardar a temperatura ambiente

➤ **Amortiguador de transferencia 1X para proteínas (1 L.)**

100 mL Tris-glicina 10X

200 mL Metanol

Aforar con agua

➤ **PBS tween (150 mL)**

100 mL de PBS 1X

50 mL de tween 20

Disolver con agitación suave

➤ **PSA (10 mL)**

1g PSA

Disolver en 10 mL de agua y guardar a -20°C

➤ **SDS (10 mL)**

1g SDS

Disolver en 10 mL de agua y guardar a temperatura ambiente

➤ **Solución desteñidora (100 mL)**

30 mL de Etanol

10 mL de CH<sub>3</sub>COOH

Aforar con agua

➤ **Tank (1 L)**

30g de tris

144g de glicina

Disolver en 500 mL de agua y aforar a 1 L. Guardar a temperatura ambiente en frasco ámbar.

➤ **Tank Plus (1 L)**

100 mL de tank

10 mL de SDS

Disolver en 500 mL de agua y aforar a 1 L. Guardar a temperatura ambiente en un frasco ámbar.

➤ **Tris HCl 20 mM (200 mL)**

15.76g de tris HCl

Disolver en 200 mL de agua

➤ **Sarkosil**

1 mL de sarkosil

Disolver el 9 mL de agua.

➤ **Complete**

1 pastilla de complete

Disolverla en 1 mL de agua

➤ **Tris base-SDS pH 8.8 (100 mL)**

18.165g de tris

0.4 g de SDS

Disolver en 60 mL de agua y ajustar a pH 8.8 y aforar a 100 mL

➤ **Tris base pH 6.8 (100 mL)**

6.055 g de tris

0.4 g de SDS

Disolver en 60 mL de agua y ajustar a pH 6.8 y aforar a 100 mL

➤ **Rodanasa**

Disolver en 1 mL de buffer de desnaturalización.

➤ **DTT**

0.077g de DTT

Disolver en 10 mL de agua

➤ **CH<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub>**

28.65g de CH<sub>6</sub>ClN<sub>3</sub>

Disolver en 50 mL de agua

➤ **C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S**

0.41g de C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>4</sub>S

Disolver en 10 mL

➤ **NaCl**

0.58 g de NaCl

Disolver en 10 mL de agua

➤ **KCl**

0.074g de KCl

Disolver en 10 mL de agua

➤ **Mg (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>**

0.071g de Mg (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>

Disolver en 10 mL de agua

➤ **Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>5H<sub>2</sub>O**

1.58g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>5H<sub>2</sub>O

Disolver en 10 mL de agua

➤ **KCN**

0.65g de KCN

Disolver en 10 mL de agua

➤ **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**

1.08g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Disolver en 10 mL de agua

➤ **CDTA**

1.45g de CDTA

Disolver en 10 mL de agua

➤ **Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>**

50g de Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

Añadir lentamente 100 mL de HNO<sub>3</sub> y 600 mL de agua destilada

Aforar a 750 mL

➤ **ATP**

0.05g de ATP

Disolver en 1 mL de agua destilada

➤ **NaOH**

0.0079 g de NaOH

Disolver en 10 mL de agua destilada

➤ **Buffer de desnaturalización**

1  $\mu\text{L}$  de  $\text{CH}_3\text{ClN}_3$

19  $\mu\text{L}$  de DTT

➤ **Buffer de replegamiento**

235  $\mu\text{L}$  de buffer de actividad ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Mg}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ )

5  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

2.5  $\mu\text{L}$  de GroEL

5  $\mu\text{L}$  de GroES

➤ **Buffer de ensayo**

10  $\mu\text{L}$  de KCN

10  $\mu\text{L}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

10  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

5  $\mu\text{L}$  de CDTA

155  $\mu\text{L}$  de agua

➤ **Bradford**

1 mL de reactivo de Bradford concentrado

4 mL de agua destilada

Filtrar y guardar a 4 °C sin exponer a la luz

➤ **Reactivo de quimioluminiscencia**

700  $\mu\text{L}$  de solución A

700  $\mu\text{L}$  de solución B



V Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias



Otorga la presente

**CONSTANCIA**

a:

***Selene Becerril Huesca***

quien asistió y presentó el trabajo:

**Characterization of chaperonine (HpGroEL) of *Helicobacter pylori* which binds iron**

cuyos autores fueron:

Selene Becerril Huesca, Crithian Sánchez Cruz, José de Jesús Olivares Trejo

En la modalidad de presentación de cartel.

1-5 de octubre de 2017, Ex-Hacienda de Chautla, Puebla, México.

Atentamente

Por el Comité Organizador

Dr. Dimitris Georgellis





MESA DIRECTIVA 2017 - 2019

PRESIDENTE  
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

VICEPRESIDENTE  
DR. DAVID RENÉ ROMERO CAMARENA

SECRETARIO TESORERO  
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLÓL

SUBSECRETARIA TESORERA  
DRA. MARÍA SOLEDAD FINEZ ARGUELLO

SOCIOS FUNDADORES

Dr. Barbarín Arrogán Lozano  
Dr. Edmundo Calva Cuadrilla  
Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)  
Dr. Joaquín Crausoto (†)  
Dr. Carlos del Río Estrada (†)  
Dr. Silvestre Frank Freund  
Dr. Mario García Hernández (†)  
Dr. Jesús Guzmán García (†)  
Dr. Jesús Kúmale Rodríguez  
Dr. Jesús Leguina García (†)  
Dr. Guillermo Massieu Figueroa (†)  
Dr. Raúl Oñazza Vidaurieta  
Dr. Efraín G. Pardo Codina  
Dr. Guillermo Seberín Acevedo

Otorga la presente

**CONSTANCIA** a:

**Selene Becerril**

Quien asistió y presentó el trabajo:

**Characterization of chaperonine HpGroEL of *Helicobacter pylori***

Por: Selene Becerril Huesca, Cristhian Sánchez-Cruz,  
Laura Isabel Vázquez-Carrillo, Marco Antonio González-López,  
José de Jesús Olivares-Trejo

En la modalidad de cartel durante el  
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica  
4 - 9 de noviembre de 2018 en Ixtapa, Zihuatanejo, Gro.

Atentamente  
Por el Comité Organizador

**Dra. Irene B. Castaño Navarro**  
Presidente