



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

DESARROLLO DE UNA VACUNA MULTI-EPÍTOPO,
MULTI-ANTÍGENO Y MULTIESTADO CONTRA LA
INFECCIÓN DE *Helicobacter pylori*

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Beatriz Meza Márquez

La Paz, Baja California Sur, mayo de 2019

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 14 del Mes de mayo del 2019, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Desarrollo de una vacuna multi-epítipo, multi-antígeno y multiestado contra la infección de *Helicobacter pylori*"


Presentada por el alumno:

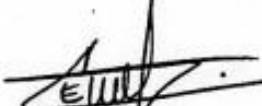
Beatriz Meza Márquez

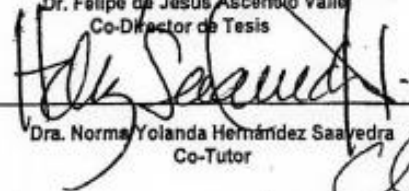
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología


Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

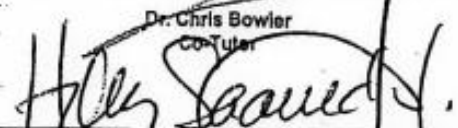

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis


Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Co-Tutor


Dr. Francisco Javier Torres López
Co-Tutor


Dr. Chris Bowler
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité tutorial

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Co-tutora
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Chris Bowler
Co-tutor
Ecole Normale Supérieure, ENS

Dr. Francisco Javier Torres López
Co-tutor
Instituto Mexicano del Seguro Social

Comité Revisor de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dr. Chris Bowler
Dr. Francisco Javier Torres López

Jurado de Examen

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra
Dr. Chris Bowler
Dr. Francisco Javier Torres López

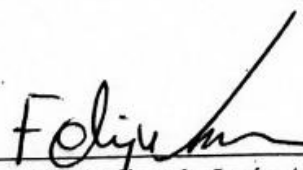
Suplentes


Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Resumen

Helicobacter pylori es una bacteria que coloniza el estómago de aproximadamente el 50% de la población mundial, que está asociada con enfermedades gastroduodenales que van desde gastritis hasta cáncer, y clasificada como un carcinógeno tipo I por la Organización Mundial de la Salud. La resistencia a los antibióticos de *H. pylori* es un problema creciente y el desarrollo de vacunas podría ser una opción adecuada. El objetivo de esta investigación fue desarrollar una vacuna utilizando varios epítomos de antígenos inmunogénicos de *H. pylori*, involucrados en diferentes etapas del proceso de patogénesis. Mediante herramientas bioinformáticas se diseñó "CTB-multiHp"; una vacuna multi-epítomo, multi-antígeno y mutiestado, compuesta por la subunidad B de la toxina del cólera (CTB) fusionada con epítomos de 7 antígenos principales (Ureasa B, CagA, NapA, VacA, HpaA, HspA, GGT) de *H. pylori*. La clonación, expresión y purificación de CTB-multiHp dieron como resultado una proteína de ~40 kDa. Las propiedades inmunológicas de la vacuna CTB-multiHp fueron caracterizadas. La proteína quimérica exhibió inmunorreactividad con sueros de pacientes con diferentes grados de infección por *H. pylori*. Además, se inmunizaron ratones con CTB-multiHp; lo cual probó su inmunogenicidad y la inducción de anticuerpos neutralizantes que revelaron efectos inhibitorios en la actividad de Ureasa, HpaA y VacA. La respuesta a CTB-multiHp se estudió en líneas celulares humanas THP-1 diferenciadas a macrófagos. Las células THP-1 reaccionaron ante la presencia de CTB-multiHp induciendo la producción de citocinas proinflamatorias. El efecto profiláctico fue evaluado en gerbos de Mongolia inmunizados intragástricamente con CTB-multiHp y posteriormente infectados con *H. pylori*. Los resultados experimentales indicaron que la inmunización con CTB-multiHp ocasionó una reducción significativa de la colonización de *H. pylori* en el estómago de los gerbos de Mongolia. La protección de CTB-multiHp se asoció con la ausencia de patología gástrica característica, la producción de anticuerpos IgA, IgG e IgM, y la posible inducción de una respuesta mixta de células Th1-Th2. Estos resultados demuestran que la vacuna CTB-multiHp basada en epítomos de células T y B de varios antígenos de *H. pylori* podría ser un candidato prometedor contra la infección por *H. pylori*.

Palabras clave: *Helicobacter pylori*, vacunas, multi-epítomo, multi-antígeno, multiestado.

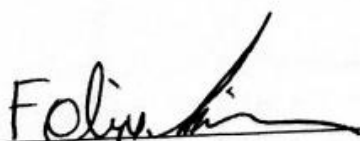

Vo. Bo. Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis

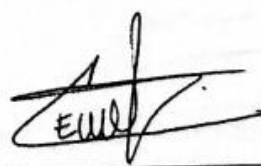

Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis

Summary

Helicobacter pylori is a bacterium that colonizes the stomach of approximately 50% of the population worldwide; It is associated with gastroduodenal diseases ranging from gastritis to cancer, classified as a type I carcinogen by World Health Organization. The resistance to *H. pylori* antibiotics is a growing problem and the development of vaccines could be a suitable option. The objective of this research was to develop a vaccine using several epitopes of immunogenic *H. pylori* antigens, involved in different stages of the pathogenesis process. Using bioinformatic tools "CTB-multiHp" was designed; a multi-epitope, multi-antigen and multistate vaccine, composed of the B subunit of cholera toxin (CTB) fused with epitopes of 7 major antigens (Urease B, CagA, NapA, VacA, HpaA, HspA, GGT) of *H. pylori*. The cloning, expression, and purification of CTB-multiHp resulted in a ~40 kDa protein. The immunological properties of CTB-multiHp vaccine were characterized. The chimeric protein exhibited immunoreactivity with sera from patients with different degrees of *H. pylori* infection. In addition, mice were immunized with CTB-multiHp; which proved its immunogenicity and the induction of neutralizing antibodies that revealed inhibitory effects on the activity of Urease, HpaA, and VacA. The response to CTB-multiHp was studied in THP-1 human cells differentiated to macrophages. THP-1 cells reacted to the presence of CTB-multiHp by inducing the production of proinflammatory cytokines. The prophylactic effect was evaluated in Mongolian gerbils immunized intragastrically with CTB-multiHp and subsequently infected with *H. pylori*. The experimental results indicated that immunization with CTB-multiHp caused a significant reduction of colonization of *H. pylori* in the stomach of Mongolian gerbils. The protection of CTB-multiHp was associated with the absence of gastric pathology, the production of IgA, IgG and IgM antibodies, and a possible mixed response of Th1-Th2 cells. These results indicate that the CTB-multiHp vaccine based on T and B cell epitopes of several *H. pylori* antigens could be a promising candidate against *H. pylori* infection.

Keywords: *Helicobacter pylori*, vaccine, multi-epitope, multi-antigen, multistage.


Vo. Bo. Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director de Tesis


Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis

Este trabajo está dedicado a la memoria de:

Mi abuela Rosario Ceseña Aguilar (1923-2016)

Mi mentor Dr. Yoav Bashan (1952-2018)

Agradecimientos

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR La Paz, B.C.S.) por las facilidades otorgadas, para la realización de este trabajo.

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada de nivel doctorado #379031.

A todo el personal de la Dirección de Estudios de Posgrado, CIBNOR, y su directora la Dra. Norma Y. Hernández Saavedra.

Al CONACyT por el financiamiento a los proyectos: CIBNOR PAC, CIBNOR PAZA, IMSS FIS/IMSS/PROT/G16/1600, CONACyT – INFR-2014-01/225924, SEP-CONACyT 258122 y SEP-CONACyT 151818, que me permitieron la realización de esta tesis.

Al Comité Tutorial: Dr. Felipe Ascencio, Dr. Carlos Angulo, Dra. Norma Hernández, Dr. Javier Torres y Dr. Chris Bowler.

A todo el grupo de Patogénesis Microbiana y también a personal diverso del CIBNOR. A Arturo Sierra Beltrán, Dra. Norma Estrada, Dra. Gracia Gómez, M.C. Julio Hernández, M.C. Delia Rojas, Dr. Amaury Cordero, Tec. Ariel Cruz, Lic. Gabriel González, M.C. Diana Dorantes, Lic. Horacio Sandoval, Lic. Osvelia Ibarra. Al Dr. Mario Rojas por todo su apoyo.

A toda la Unidad Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, IMSS México: Dra. Camorlinga, Dr. de La Cruz, Dra. Yépez, Dra. Cárdenas, Dra. Romo, Dr. Matadamas, Dra. Pompa, Dr. Avilés, Dra. Rios, Dra. Gordillo. Así como al personal de laboratorio y estudiantes.

A Dra. Carmen Maldonado (Hospital Infantil de México), Dra. Ingeborg Becker y su personal de bioterio (Hospital General de México), Dra. Alejandra Mantilla (Hospital de Oncología CMNSXXI), Adrián Palma. A Anne DeGroot y Ryan Tassone (EpiVax).

A la base más importante de todo, mi familia: Luis Meza, María Antonieta Márquez, Antonieta Meza, Lilia Meza.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Agradecimientos	iv
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	viii
Abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Historia de <i>H. pylori</i>	3
2.2 Modo transmisión y prevalencia de <i>H. pylori</i>	3
2.3 Patogénesis de la infección por <i>H. pylori</i>	4
2.4 Respuesta del hospedero contra <i>H. pylori</i>	5
2.4.1 Inmunidad innata.....	5
2.4.2 Inmunidad adaptativa.....	6
2.4.3 Inmuno-modulación por <i>H. pylori</i>	6
2.5 Asociación de <i>H. pylori</i> con enfermedades gástricas y extragástricas.....	7
2.6 Diagnóstico de <i>H. pylori</i>	9
2.7 Tratamiento contra <i>H. pylori</i>	10
2.8 Vacunas contra <i>H. pylori</i>	11
2.8.1 Adyuvante CTB.....	15
2.8.2 Modelo <i>in vitro</i> para evaluar vacunas.....	15
2.8.3 Modelo animal para evaluar la infección por <i>H. pylori</i>	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general.....	18
5.2 Objetivos particulares.....	18
6. MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1 Diseño y construcción de una proteína quimérica a base de factores de virulencia de <i>H. pylori</i> (Objetivo específico 1).	19
6.1.1 Selección de antígenos.....	19
6.1.2 Análisis de secuencia.....	19
6.1.3 Predicción de epítomos.....	20
6.1.4 Diseño de la vacuna.....	20
6.1.5 Análisis de la vacuna.....	21
6.2 Producir una proteína vacunal a base de factores de virulencia de <i>H. pylori</i> (Objetivo específico 2).	21
6.2.1 Clonación, expresión y purificación de proteína.....	21

6.3 Evaluar <i>in vitro</i> la inmunogenicidad de la proteína vacunal producida contra <i>H. pylori</i> (Objetivo específico 3).....	22
6.3.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano	22
6.3.2 Cultivo de líneas celulares	23
6.3.3 Preparación de antisuero de proteína recombinante	23
6.3.4 Inmunoblot y análisis de ELISA.....	23
6.3.5 Inhibición de la actividad ureasa.	24
6.3.6 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación.	24
6.3.7 Neutralización de la actividad de citotoxinas vacuolizantes.	24
6.3.8 Análisis serológicos.	25
6.3.9 Experimentos de cultivo celular.	25
6.3.10 Ensayo de citocinas.....	26
6.3.11 Análisis estadísticos.....	26
6.4 Evaluar la inmunogenicidad y la inmunoprotección de la vacuna contra <i>H. pylori</i> en Gerbos de Mongolia (Objetivo específico 4).....	26
6.4.1 Animales y cultivo de <i>H. pylori</i>	26
6.4.2 Inmunización de Gerbos e infecciones experimentales con <i>H. pylori</i>	27
6.4.3 Análisis de anticuerpos específicos.	27
6.4.4 Examinaciones histopatológicas y detección de <i>H. pylori</i>	28
6.4.5 Análisis estadísticos.....	28
7. RESULTADOS	28
7.1 Análisis de las secuencias candidatas	28
7.2 Predicción de epítomos de células B y T.	29
7.3 Diseño y construcción de una vacuna multiepítome.....	33
7.4 Características de la vacuna	34
7.5 Predicción de la estructura secundaria y terciaria	35
7.6 Clonación, expresión y purificación de proteínas	36
7.7 Inmunotransferencia y ELISA	39
7.8 Inhibición de la actividad ureasa.....	39
7.9 Inhibición de la hemaglutinación.....	39
7.10 Neutralización de la actividad de citotoxinas vacuolizantes.....	39
7.11 Serología	40
7.12 Cuantificación de endotoxinas en línea celular de monocitos humanos THP-1	41
7.13 Respuesta de anticuerpos específicos.....	41
7.14 Histopatología e infección con <i>H. pylori</i>	44
8. DISCUSIÓN	46
9. CONCLUSIONES	56
10. LITERATURA CITADA	57
11. ANEXOS	69

Lista de figuras

Figura 1. Micrografía de transmisión electrónica de <i>H. pylori</i>	3
Figura 2. Asociación de <i>H. pylori</i> con enfermedades gástricas.....	8
Figura 3. Diagrama general de la estrategia metodológica.....	19
Figura 4. Diagrama esquemático de la construcción vacunal.....	34
Figura 5. Diagrama esquemático de la construcción CTB-UreB ₁₄₈₋₁₉₈	34
Figura 6. Secuencia de aminoácidos de CTB-multiHp.	34
Figura 7. Secuencia de aminoácidos de CTB-UreB ₁₄₅₋₁₉₅	34
Figura 8. Resultados gráficos de PSIPRED de la predicción de la estructura secundaria de CTB-multiHp.....	35
Figura 9. Validación del modelo 3D de CTB-multiHp.	36
Figura 10. Secuencia de nucleótidos CTB-UreB ₁₄₅₋₁₉₅	37
Figura 11. Secuencia de nucleótidos CTB-multiHp.....	37
Figura 12. Construcción, expresión, purificación e inmunodetección de proteínas recombinantes CTB-multiHp y CTB-UreB ₁₄₈₋₁₉₈	38
Figura 13. Inmunoblot; inhibición de la actividad: ureasa, hemaglutinación y vacuolización; serología.	40
Figura 14. Gráfico que representa la cantidad de citocinas en células de macrófagos THP-1 seguido de exposición a proteínas CTB-multiHp o CTB-UreB ₁₄₈₋₁₉₈	42
Figura 15. Respuesta específica de anticuerpos en suero, mucosa intestinal y bilis de gerbos de Mongolia inmunizados con CTB-multiHp o CTB-UreB ₁₄₈₋₁₉₈	43
Figura 16. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de las mucosas gástricas de Gerbos de Mongolia después de la inmunización.	45
Figura 17. Identificación de <i>H. pylori</i> en la mucosa gástrica de Gerbos de Mongolia vacunados con control (bicarbonato de sodio) o CTB-UreB ₁₄₈₋₁₉₅ o CTB-multiHp y post-desafío con <i>H. pylori</i> J99.	45

Lista de tablas

Tabla I. Etapas de la infección por <i>H. pylori</i> y principales factores de virulencia involucrados.....	5
Tabla II. Vacunas multigénicas contra <i>H. pylori</i>	12
Tabla III. Epítomos de antígenos <i>H. pylori</i> determinados <i>in silico</i>	13
Tabla IV. Cepas de <i>H. pylori</i> representativas en el mundo.	29
Tabla V. Epítomos de unión determinados por diferentes servidores.	30
Tabla V. Epítomos de unión determinados por diferentes servidores.	32
Tabla VI. Selección de epítomos finales y ordenamiento de los mismos.....	33

Abreviaturas

%	Por ciento	nro. de	Número de
°C	Grados centígrados	cat.	catálogo
µg	Microgramos	p/v	Peso por volumen
µL	Microlitros	pb	Pares de base
¹³ C	Carbono 13	pg/mL	Picogramos por
¹⁴ C	Carbono 14		mililitro
1β	Uno beta	pH	Potencial de
3D	Tridimensional		hidrógeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico	RE	Retículo
CagA	Citotoxina asociada al gen A		endoplasmático
CD4	Cúmulo de diferenciación 4	SDS	Dodecilsulfato de
CD8	Cúmulo de diferenciación 8		sodio
Cel	Célula	T4SS	Sistema de
CO ₂	Dióxido de carbono		secreción tipo 4
EE. UU.	Estados Unidos	Th1	T cooperadores 1
<i>et al.</i>	y colaboradores	Th2	T cooperadores 2
FASTA	Formato informático basado en texto	TNF-α	Factor de necrosis
g	Gramos		tumoral alfa
g/l	Gramos por litro	UE	Unidades de
GGT	Gama glutamiltranspeptidasa		enzima
GP	Glicina Prolina	UreB	Ureasa B
h	Horas	VacA	Citotoxina
HpaA	Proteína de adhesión de <i>H. pylori</i>		vacuolizante A
HRP	Peroxidasa de rábano		
HspA	Proteína de choque térmico A		
IgA	Inmunoglobulina A		
IgE	Inmunoglobulina E		
IgG	Inmunoglobulina G		
IgM	Inmunoglobulina M		
IL-	Interleucina		
INF-γ	Factor de necrosis tumoral alfa		
kDa	Kilodalton		
KK	Lisina Lisina		
Log	Logaritmo		
LPS	Lipopolisacáridos		
Mg	Miligramo		
mL	Mililitros		
mM	Milimolar		
N/A	No aplicable		
NapA	Proteína Activadora de Neutrófilos		
nm	Nanómetros		

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas causadas por diversas bacterias, virus y otros organismos patógenos siguen estando entre las principales causas de muerte en el mundo. La vacunación ofrece una de las estrategias más eficaces en la asistencia sanitaria global para abordar esta cuestión (Onishchenko *et al.*, 2019). La vacunación tiene como objetivo entrenar el sistema inmune del hospedero para protegerse contra el patógeno (Dubitzky *et al.*, 2013). Asimismo, la enorme complejidad de los microbios y la forma en que interactúan con las células hospedero, junto con las respuestas inmunes producidas por ellos, ha llevado a la búsqueda de metodologías lógicas y racionales para el diseño y desarrollo de vacunas, que incluyen múltiples proteínas (multiantigénica) o sus fragmentos que participan en las diferentes etapas de la infección microbiana de las células susceptibles (multietapa) (Patarroyo y Patarroyo, 2007). Varios enfoques modernos están surgiendo con el objetivo de generar vacunas más eficaces y más seguras; como resultado de esta tendencia ahora el desarrollo de vacunas es el resultado de múltiples disciplinas, tales como las tecnologías de ADN recombinante, genómica, biología estructural, inmunología humana y murina, adyuvantes, tecnologías de formulación, entre otras (Rappuoli y Medaglini, 2014). Investigaciones actuales se centran en el desarrollo de vacunas, especialmente para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. En este sentido, la bacteria *H. pylori* es considerada como un factor primario para el desarrollo del cáncer gástrico, ya que es clasificada como carcinogénico tipo I. Este microorganismo coloniza el estómago de la mitad de la población humana a nivel global y está asociado también con enfermedades gástricas y duodenales (Ferlay *et al.*, 2013). El control de esta enfermedad ha llegado a ser prioridad a nivel mundial. En México su prevalencia va en aumento y aún no se cuenta con tratamientos 100% efectivos para su erradicación. Los tratamientos que actualmente se utilizan son terapias triples o cuádruples de antibióticos, que no previenen una reinfección de *H. pylori* y además la bacteria puede desarrollar resistencia al antibiótico con el tiempo (Testerman y Morris, 2014). Por estas razones, la vacunación ha sido sugerida como una alternativa para la prevención y manejo de infección por *H. pylori*, donde el gerbo de Mongolia ha resultado ser un buen modelo de estudio para evaluar

formulación de vacunas (Sun *et al.*, 2018). Para el desarrollo de una vacuna segura y eficaz contra *H. pylori* se debe considerar la interferencia con los mecanismos clave de esta bacteria patógena. En otras palabras, la producción de enzimas, tales como la ureasa que promueve la supervivencia en el medio gástrico, la motilidad de flagelos, y la unión de las bacterias al epitelio a través de adhesiones, toxinas asociadas a la virulencia como CagA y VacA, y también como proteínas NAP que estimulan el reclutamiento de células inflamatorias, entre otros. La evidencia actual indica la necesidad de desarrollar vacunas que incluyan múltiples antígenos de fuerte protección o la construcción de cepas recombinantes que expresan estos antígenos en altas cantidades para una vacuna eficaz contra *H. pylori*; mientras que una administración óptima de la vacuna también es un factor crítico en la eficiencia de la misma (Czinn y Blanchard, 2011). Además, el desarrollo de vacunas se ha trasladado a la generación de vacunas de múltiples epítomos recombinantes como nueva estrategia. Una vacuna basada en epítomos también podría incluir moléculas antigénicas únicas combinadas de diferentes epítomos para aumentar la potencia y así poder conducir a una estrategia eficaz para el control de *H. pylori* (Stubljar *et al.*, 2018). Entre las preguntas que tenemos que resolver para el desarrollo de una vacuna contra *H. pylori* son las siguientes: ¿cuál es el tipo de respuesta inmune que induce la vacunación intragástrica, celular o humoral (anticuerpos)?, esta respuesta inmune evocada por la vacunación que expresa múltiples antígenos basado en factores de virulencia de *H. pylori* ¿será suficiente para proteger gerbos de Mongolia frente a la infección experimental producida por el patógeno?

2. ANTECEDENTES

2.1 Historia de *H. pylori*

La presencia de bacterias en estómagos de mamíferos ha sido reportada desde finales del siglo XIX; sin embargo, a principio de la década de 1980 Barry Marshall y Robin Warren describieron una bacteria aislada y cultivada a partir de biopsias gástricas humanas (Marshall y Warren, 1984). Poco después del descubrimiento de esta bacteria, se demostró su relación causal con la gastritis y úlcera péptica en humanos (Goodwin *et al.*, 1986). Inicialmente fue descrita como *Campylobacter pylori* y, después, como *Helicobacter pylori* (Fig. 1); una bacteria Gram negativa, catalasa, oxidasa y ureasa positivo. Tiene forma de espiral o cocoide que mide 2.5 μm de largo y 0.5 μm de ancho (Andersen y Wadström, 2001); tiene de 2 a 6 flagelos unipolares, de aproximadamente 3 μm de longitud, esenciales para la motilidad (O'Toole *et al.*, 2000). En 1994, *H. pylori* fue catalogado como un carcinógeno del grupo 1 por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y fue considerado como un factor primario para el desarrollo de cáncer gástrico. En 2005, Marshall y Warren recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por su revolucionario descubrimiento (Ferlay *et al.*, 2013).

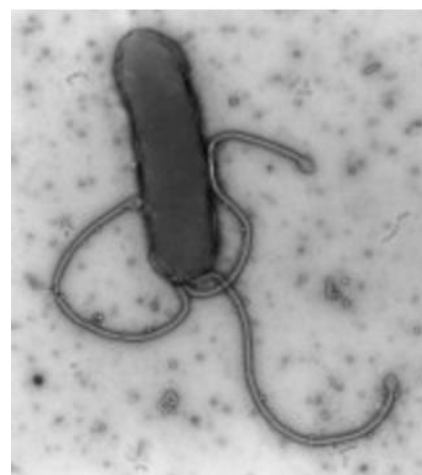


Figura 1. Micrografía de transmisión electrónica de *H. pylori*. (Eye of Science/Photo Researchers, Inc.).

2.2 Modo transmisión y prevalencia de *H. pylori*

El modo de transmisión de *H. pylori* aún no ha sido totalmente definido; sin embargo, se presume que la bacteria se transmite principalmente de persona a persona por vía fecal-oral u oral-oral (Elseweidy, 2012). Además, dado que *H. pylori* fue detectado en agua y leche, estas podrían representar posibles rutas adicionales de transmisión (Goh *et al.*, 2011). La mayoría de los datos indican que la transmisión es principalmente dentro de las familias,

por lo tanto, el contacto cercano y el nivel de saneamiento de la casa parecen ser las variables más importantes (Elseweidy, 2012).

La prevalencia de la infección por *H. pylori* varía de acuerdo a la región geográfica, edad, nivel socioeconómico, nivel educativo, condiciones de vida, y ocupación (Wang *et al.*, 2014). La mayoría de los individuos infectados adquieren la bacteria en la infancia y la infección es generalmente de por vida. La distribución de la infección por *H. pylori* es más frecuente en los países en desarrollo, donde el nivel socioeconómico es bajo comparado con los países considerados desarrollados. Por el contrario, en los países desarrollados hay una disminución constante de la tasa de infección en la niñez, y se estima que a los 20 años de edad sólo el 20% están infectados (Wang *et al.*, 2014). Según datos reportados desde el 2000 a la fecha, la prevalencia de adultos infectados por *H. pylori* va de 45 a 75% en África, 40 a 83% en Asia, 71 a 84% en Europa, y 68 a 80% en América (Mentis *et al.*, 2015). Se estima que la prevalencia media mundial de la infección por *H. pylori* es del 58% (Carter *et al.*, 2011).

2.3 Patogénesis de la infección por H. pylori

La acidez gástrica y movimientos peristálticos inhiben la colonización bacteriana al estómago. No obstante, *H. pylori* utiliza un conjunto de proteínas secretadas y translocadas como factores de virulencia para mediar su patogenicidad en el estómago del hospedero. Estudios recientes han revelado que al menos tres etapas distintas y secuenciales son obligatorias para que *H. pylori* ejerza su virulencia en el estómago colonizado: 1) la adhesión y colonización de la superficie de las células gástricas epiteliales; 2) la evasión y atenuación de la defensa del hospedero; y 3) la invasión y daño a la mucosa gástrica (Tabla I). Básicamente, *H. pylori* tiene que eludir la actividad bactericida de los contenidos gástricos lumbinales y establecer contacto íntimo con la capa de la mucosa, por lo cual, la enzima ureasa metaboliza la urea en dióxido de carbono y amoníaco para tamponar el ácido gástrico. Los flagelos permiten a la bacteria nadar a través de la mucosa gástrica viscosa y alcanzar el pH más neutral por debajo de la mucosa. Una vez por debajo de la mucosa, *H. pylori* se adhiere fuertemente a las células subyacentes. La colonización persistente depende de la capacidad para responder a las condiciones cambiantes del ambiente y de

eludir los mecanismos de defensa del hospedero iniciadas durante la infección. *H. pylori* tiene la mayor tasa de recombinación genética de cualquier especie bacteriana conocida, lo que sugiere que este proceso confiere una ventaja selectiva en la colonización (He *et al.*, 2014).

Tabla I. Etapas de la infección por *H. pylori* y principales factores de virulencia involucrados.

Etapa	Factor de virulencia	Función patogénica	Referencia
Adhesión y colonización	Ureasa	Neutralización de pH ácido	Wang <i>et al.</i> , 2010
	Proteína de choque térmico A (HspA)	Se une al níquel el cuál es cofactor de la ureasa	Schauer <i>et al.</i> , 2010
	Adhesina A de <i>H. pylori</i> (HpaA)	Adherencia a los aceptores de las células gástricas epiteliales	Nyström y Svennerholm, 2007
Evasión inmune y atenuación	Proteína Activadora de Neutrófilos (NapA)	Activador de células, evade la respuesta inmune	Amedei <i>et al.</i> , 2006
Invasión y daño a la mucosa	Citotoxina asociada al gen A (CagA)	Inyecta toxinas a las células, inflamación, úlceras, promueve carcinogénesis.	Stein <i>et al.</i> , 2013
	Citotoxina vacuolizante A (VacA)	Produce vacuolas tóxicas, forma poros en las células, apoptosis.	Junaid <i>et al.</i> , 2016
	Gama glutamil-transpeptidasa (GGT)	Apoptosis, promueve la inflamación, promueve carcinogénesis	Zhang <i>et al.</i> , 2015

2.4 Respuesta del hospedero contra *H. pylori*

La respuesta inmune hacia los patógenos bacterianos puede ser dividida en respuesta innata y adaptativa. La respuesta innata es un proceso que reacciona rápidamente con varias moléculas bacterianas por alguna señal infecciosa con el objetivo de matar a los patógenos, en este caso, las bacterias. Por el contrario, la respuesta inmune adaptativa es un proceso posterior, es específica al antígeno, y conduce a la activación de células de memoria T y B (Portal-Celhay y Perez-Perez, 2006)

2.4.1 Inmunidad innata

El reconocimiento de moléculas bacterianas por el sistema inmune innato está mediado por receptores, entre ellos, los del tipo-Toll expresado en las células presentadoras de antígeno (APC), tales como monocitos y células dendríticas (DC). El contacto bacteriano con monocitos y APC conduce a la secreción de citocinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interlucina (IL)-1 β e IL-8. Se ha demostrado que la infección por *H. pylori* se asocia con un aumento en los niveles de estas citocinas que, a su vez, actúan como quimio atrayentes locales para la inducción de infiltración de células granulocíticas (Blosse *et al.*, 2018).

2.4.2 Inmunidad adaptativa

H. pylori causa inflamación gástrica continua en todas las personas infectadas. Esta respuesta inflamatoria consiste inicialmente en neutrófilos, seguidos por linfocitos (células T y B), células plasmáticas y macrófagos, junto con diversos grados de degeneración de las células epiteliales y lesiones (Goodwin *et al.*, 1986). *H. pylori* produce una serie de sustancias antigénicas, incluyendo proteínas de choque térmico (HSP), ureasa y LPS, que pueden ser absorbidas y procesadas por los macrófagos y activar a las células T (Wilson y Crabtree *et al.*, 2007). La disrupción celular, especialmente junto a uniones epiteliales mejora la presentación de antígenos y facilita la estimulación inmune. El resultado neto es aumento en la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1, IL-6, TNF- α e IL-8 (Wang *et al.*, 2010). La gastritis crónica activa se asocia con un aumento de la relación CD4/CD8 de las células T dentro de la mucosa gástrica, en gran parte debido a la acumulación de linfocitos CD4+ T-cooperadores. La infección por *H. pylori* resulta en una respuesta inmune Th1 predominante en la mucosa gástrica, que se caracteriza por la inducción de interferón γ (INF- γ) y genes relacionados con INF- γ . Una respuesta inmune Th1 predominante está asociada con niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias IL-12, IL-18 e INF- γ (Tummala *et al.*, 2004). Además, en individuos colonizados con *H. pylori* conduce a una fuerte respuesta de anticuerpos local y sistémica específica a la infección.

2.4.3 Inmuno-modulación por *H. pylori*

Para mantener la colonización prolongada de la mucosa gástrica humana, *H. pylori* debe evadir la respuesta inmune innata y adaptativa. Después de la infección con *H. pylori*, DC

fagocitan proteínas bacterianas, degradan, seleccionan y presentan y péptidos en su superficie, junto con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y moléculas co-estimuladoras. Esta presentación de antígenos conduce eficazmente a la activación de las células T CD4+ que reaccionan hacia estos antígenos y desencadenan la respuesta inmune (Sayi *et al.*, 2009). Las células T CD4 pueden diferenciarse tras la activación en cualquiera de las células Th1 o Th2, que difieren en el tipo de citocinas que producen y por lo tanto en su función (Guo *et al.*, 2017). Las consecuencias de la inducción de respuestas Th1 frente a Th2 son profundas: la producción de clases de anticuerpos opsonizantes (predominantemente IgG), mientras que la producción de células predominantemente Th2 proporcionan inmunidad humoral, especialmente IgM, IgA e IgE. La mayoría de las bacterias intracelulares inducen respuestas Th1, mientras que los patógenos extracelulares estimulan las respuestas de tipo Th2. Basado en el hecho de que *H. pylori* no es invasivo y que la infección va acompañada por una respuesta humoral exuberante, se podría predecir que una respuesta Th2 sería predominante dentro de la mucosa gástrica colonizada por *H. pylori* (Zhou *et al.*, 2017). Paradójicamente, la mayoría de las clonas de células T aisladas de antígenos específicos de *H. pylori* producen niveles más altos de IFN- γ que de IL-4, lo cual es un reflejo de una respuesta de tipo Th1. *H. pylori* también estimula la producción *in vitro* de IL-12, una citocina que promueve la diferenciación de Th1. Estos resultados plantean la hipótesis de una respuesta (Th1) del hospedero a un organismo para inducir respuestas inmunes secretoras (Th2) pueden influir y perpetúan la inflamación gástrica (Guo *et al.*, 2017).

2.5 Asociación de H. pylori con enfermedades gástricas y extragástricas

Si bien, más de la mitad de la población mundial está infectada por *H. pylori*, aunque la mayoría permanecen asintomáticos durante toda su vida, esencialmente todos desarrollan inflamación crónica, es decir, gastritis crónica (Fig. 2) (Conteduca *et al.*, 2013). La gastritis se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias agudas (leucocitos polimorfonucleares) y células inflamatorias crónicas (linfocitos, células plasmáticas y macrófagos) de la mucosa gástrica (Shiotani *et al.*, 2013). La progresión y gravedad de la gastritis depende de una interacción de múltiples factores que incluyen: (1) factores de la

bacteria como la plasticidad genómica que dispone *H. pylori*, la capacidad de adaptación a las condiciones individuales del hospedero, la modulación de la respuesta del sistema inmunológico del hospedero, y, la producción de varios factores de virulencia; (2) factores del hospedero, por ejemplo, antecedentes genéticos o estado fisiológico e inmunológico, especialmente aquellos que aumentan o reducen la respuesta inflamatoria a la infección; (3) los factores ambientales como el tabaquismo, la dieta alta en sal, y el consumo de carne (Hnatyszyn *et al.*, 2013; Sampieri, 2013; Shiotani *et al.*, 2013).

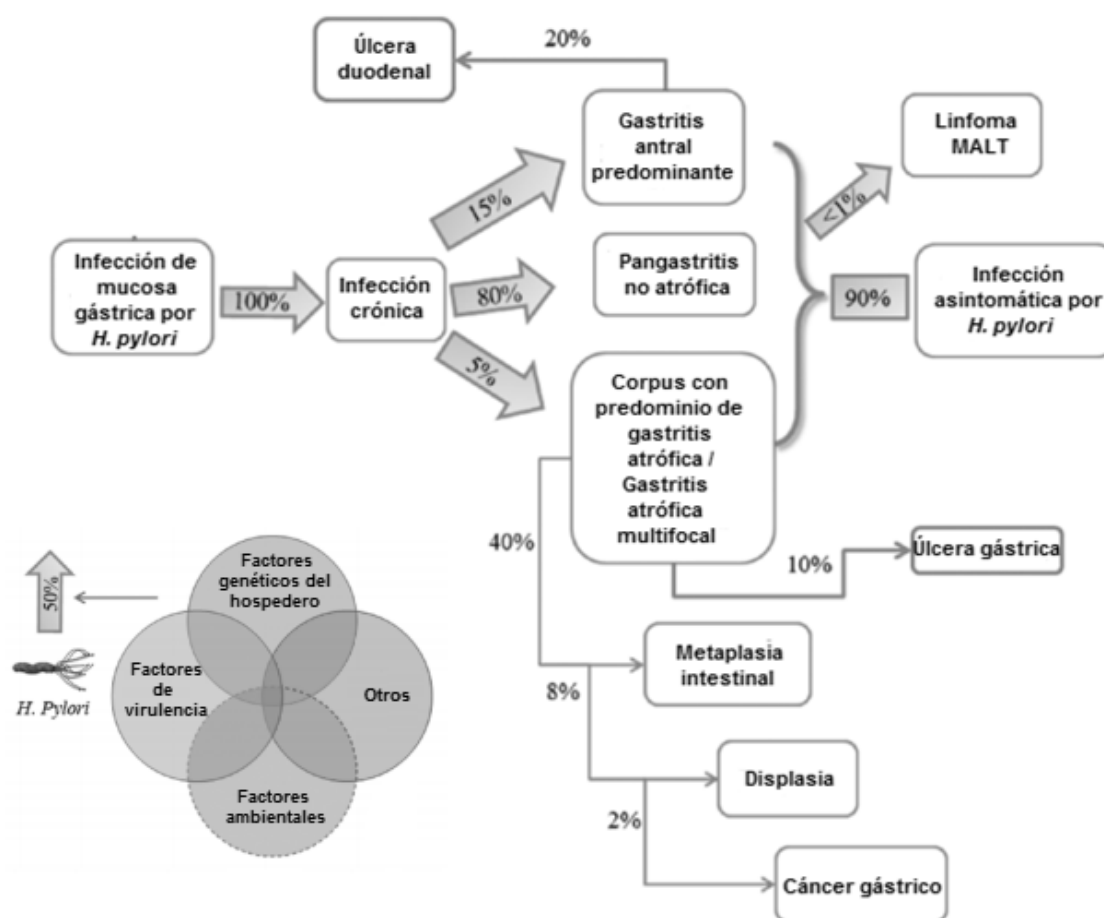


Figura 2. Asociación de *H. pylori* con enfermedades gástricas. (Modificado de Conteduca *et al.*, 2013).

Los pacientes con aumento en la secreción de ácido clorhídrico en el jugo gástrico (hiperclorhidria) son más propensos a tener gastritis antral-predominante, que predispone a las úlceras duodenales y confiere menor riesgo a desarrollar cáncer gástrico (Noto y Peek, 2012). Las infecciones de *H. pylori* inicialmente causan gastritis antral, pero en infecciones

persistentes, se desarrolla una disminución de la acidez normal del jugo gástrico (hipoclorhidria) permitiendo a las bacterias migrar proximalmente, lo que resulta en pangastritis. Por otra parte, la inflamación persistente del cuerpo del estómago, el aumento en pH e hipoclorhidria, da como resultado gastritis atrófica. Este ambiente alcalino facilita la colonización y proliferación de *H. pylori* (Parreira *et al.*, 2013), y, por lo tanto, existe una predisposición a desarrollar úlcera gástrica. Además, esto puede dar lugar metaplasia intestinal (presencia de células caliciformes), displasia (células epiteliales que varían en tamaño, forma, orientación) y finalmente, cáncer gástrico (crecimiento celular maligno) en casos raros. Alternativamente, una complicación poco frecuente que induce la infección por *H. pylori* es la formación de tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) en la mucosa gástrica (Parreira *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

Algunos estudios indican que la infección por *H. pylori* en realidad puede ser beneficiosa para la resistencia a asma infantil o enfermedades esofágicas (Chen y Blaser, 2008; Dellon *et al.*, 2011). Por otra parte, estudios han demostrado el posible papel de *H. pylori* en varias enfermedades extra-gástricas y aunque todavía no se han sacado conclusiones decisivas, la evidencia no puede ser ignorada (Franceschi *et al.*, 2014; Testerman y Morris, 2014). Por ejemplo, la asociación entre *H. pylori* y anemia por deficiencia de hierro ha sido bien establecida; el mecanismo más obvio de esta causa es a través de la competencia de hierro en la dieta (Huang *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2010). La púrpura trombocitopénica idiopática se caracteriza por la destrucción autoinmune de las plaquetas, lo que lleva a contusiones; la evidencia apunta a *H. pylori* como el agente causal, ya que se ha visto un aumento el recuento de plaquetas en pacientes que estaban infectados con *H. pylori* y recibieron tratamiento de erradicación (Asahi *et al.*, 2008). La rosácea es la enfermedad de la piel más común asociada con *H. pylori*; en un estudio, *H. pylori* estuvo presente en el 81% de los pacientes con rosácea que también tenía quejas gástricas, y casi todos los pacientes albergaban cepas CagA+ (Argenziano *et al.*, 2003).

2.6 Diagnóstico de *H. pylori*

H. pylori primariamente coloniza el estómago, pero la evidencia sugiere ocasional o persistente colonización en otros sitios. *H. pylori* ha sido encontrado en la cavidad oral,

vesícula biliar, intestino grueso, oído medio, ojos, cavidad nasal, arterias coronarias, piel, hígado, y peritoneo (Testerman *et al.*, 2014). Se han desarrollado numerosos métodos de detección de la presencia de *H. pylori*. Dentro de las pruebas no invasivas tenemos a la serología, prueba de aliento con urea ^{13}C y pruebas de antígeno en heces (Garza-González *et al.*, 2014). Las pruebas serológicas comerciales se basan en la detección de IgG, con valores de sensibilidad y especificidad de 60 a 100% (Harris *et al.*, 2005). En la prueba del aliento con urea la sensibilidad y especificidad exceden 90% en la mayoría de los estudios, ésta técnica se basa en la capacidad de *H. pylori*, si está presente en el entorno gástrico, de descomponer por vía oral el ^{13}C absorbido o urea marcada con ^{14}C en CO_2 y amoníaco (Gisbert y Pajares, 2004). La prueba de antígeno en heces utiliza un inmuno-ensayo enzimático para detectar la presencia de antígenos contra *H. pylori* (Veijola *et al.*, 2005). Por su parte, histología, cultivo de *H. pylori*, prueba rápida de la ureasa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son pruebas que se realizan en biopsias antrales recolectadas por medios invasivos (Garza-González *et al.*, 2014). La histología es muy sensible y específica (varía de 53% a 90%), las bacterias son determinadas por morfología en el microscopio (El-Zimaity y Graham, 1999). El cultivo de *H. pylori* tiene una sensibilidad mayor a 90% y una especificidad del 100% (Hirschl y Makristathis, 2007), usualmente se cultiva en medios complejos con sangre, suero y antibióticos (Blanchard y Nedrud, 2012). La prueba rápida de la ureasa (RUT), tiene especificidad de 95% a 100% y sensibilidad de 85% al 95%; el principio se basa en la descomposición de urea en dióxido de carbono y amoníaco, lo cual aumenta el pH del medio y cambia el color en el indicador de pH (Garza-González *et al.*, 2014). Por último, la técnica de PCR permite identificar *H. pylori* en muestras pequeñas que tienen pocas bacterias presentes. Se puede realizar en muestras obtenidas por ambos métodos invasivos y no invasivos. (Rimbara *et al.*, 2013).

2.7 Tratamiento contra *H. pylori*

Los tratamientos utilizados para la erradicar la infección de *H. pylori*, constan de una combinación de varios antibióticos en combinación con agentes anti-secretorios, tales como los inhibidores de la bomba de protones (IBP), o con sales de bismuto. Los regímenes sugeridos son la terapia triple, terapia cuádruple y terapia secuencial (Garza-González *et*

al., 2014). La estrategia más utilizada es la terapia triple. Esta terapia se compone de un IBP (lansoprazol, omeprazol, pantoprazol, rabeprazol, o esomeprazol), claritromicina, y amoxicilina, tomada durante 7 a 14 días (Loyd y McClellan, 2011). En áreas que tienen alta resistencia a la claritromicina, una terapia cuádruple puede ser utilizada. Esta terapia incluye una combinación de un IBP, subsalicilato de bismuto, y 2 antibióticos, metronidazol y tetraciclina, durante 10 a 14 días. Este régimen es bien tolerado, sin embargo, este tratamiento no está disponible en todas las áreas (Malfertheiner *et al.*, 2012). Por lo cual, un equivalente sería la terapia secuencial, que incluye la combinación de un IBP y amoxicilina durante 5 días, seguido de un IBP y tinidazol claritromicina / metronidazol durante 5 días (Loyd y McClellan, 2011). A pesar de su validez, el tratamiento con antibióticos plantea varias dificultades. En primer lugar, el elevado número de medicamentos que deben tomarse todos los días puede reducir el cumplimiento de los pacientes. En segundo lugar, el tipo y las cantidades de los antibióticos utilizados pueden conducir a efectos secundarios, tales como dolor abdominal, náuseas, diarrea, etc., que pueden limitar la utilidad del tratamiento (O'connor *et al.*, 2015). En tercer lugar, cada vez son reportadas más cepas de *H. pylori* resistentes a antibióticos de uso común (por ejemplo, claritromicina, metronidazol, ampicilina) (Testerman y Morris, 2014). La erradicación de la infección por *H. pylori* no proporciona una protección continua contra la reinfección. Algunos países han reportado tasas de reinfección tan altos como 15% a 30% por año (Zamani *et al.*, 2018). Finalmente, el tratamiento se da únicamente a pacientes con síntomas gastrointestinales. Claramente, los pacientes que permanecen asintomáticos de *H. pylori* están en riesgo de desarrollar gastritis crónica y cáncer gástrico (Sutton y Boag, 2018). Por lo cual, es necesaria una vacuna contra la infección por *H. pylori*.

2.8 Vacunas contra *H. pylori*

El diseño de una vacuna eficaz contra *H. pylori* debe considerar la interferencia con los mecanismos de las bacterias patógenas. Por lo tanto, el diseño de la vacuna debe contener moléculas derivadas de diferentes etapas (múltiples etapas) de la patogénesis de *H. pylori*. Recientemente, se ha logrado un progreso significativo en la comprensión de la patogénesis de *H. pylori* y el papel de sus factores de virulencia en las enfermedades gástricas. Varios

estudios han revelado que se requieren al menos tres etapas distintas y secuenciales para que *H. pylori* ejerza su virulencia sobre el estómago colonizado: adherirse y colonizar la superficie de las células epiteliales gástricas, evitando y atenuando la defensa del huésped, e invadiendo y dañando mucosa (He *et al.*, 2014). Muchas formulaciones y estrategias de vacunación han sido probadas contra *H. pylori*, resultando en una reducción significativa de la carga bacteriana (Tabla II).

Tabla II. Vacunas multigénicas contra *H. pylori*.

Antígenos	Administración	Pruebas	Respuesta	Protección	Referencia
agA+ VacA + NAP	Intramuscular	Perros Beagle	Celular	Sólo la retrasa	Rossi <i>et al.</i> , 2004
HpaA + UreB	Oral	Raton	Humoral	UFC: 40%	Nyström y Svennerholm, 2007
UreB + HspA + HpaA	Intragástrica / intramuscular	Jerbos mongolia	Humoral y celular	PCR 89.4%	Wu <i>et al.</i> , 2008
VacA + CagA + NAP	Intramuscular	Humanos	Humoral y celular	N/A	Malfertheiner <i>et al.</i> , 2008
Epítos de HpaA- UreB	Oral	Raton BALB/c	Humoral	UFC: aprox.33%	Zhou <i>et al.</i> , 2009
HspA + HpaA + epítos UreB ₄₁₄	Intramuscular	Raton BALB/c	N/A	PCR 89.6%	Wang <i>et al.</i> , 2010
Epítos de Caga- VacA- UreB	Oral	Raton BALB/c	Humoral y celular	qPCR: aprox.20%	Liu <i>et al.</i> , 2011
Epítos de HpaA, UreB y CagA	Subcutánea	Raton BALB/c	Humoral	qPCR: aprox. 20%	Li <i>et al.</i> , 2012
Epítos UreB	Oral	Raton BALB/c	N/A	qPCR y UFC 34%	Zhang <i>et al.</i> , 2014
rOmp22- HpaA	Oral	Raton	N/A	Histología aprox. 67%	Huang <i>et al.</i> , 2013
HspA-GGT	Intranasal	Raton	Humoral y celular	PCR 40%	Zhang <i>et al.</i> , 2015

Algunos factores de virulencia individuales, como Urease B, CagA, VacA y otros, en sus formas nativas o recombinantes pueden conferir cierto nivel de protección contra *H. pylori* (Del Giudice *et al.*, 2009). Sin embargo, un solo antígeno recombinante ha demostrado

inducir una inmunidad insuficiente con un efecto protector limitado (Czinn y Blanchard, 2011). Por lo tanto, muchas estrategias de formulación han sido probadas, resultando en una reducción significativa de la carga bacteriana. Se han informado fuertes respuestas inmunitarias con el uso de una vacuna multiantigénica (como VacA, CagA, NAP), que actualmente está en desarrollo para uso humano; otra vacuna multiantigénica incorpora UreB, HspA, HpaA con adyuvante por administración oral en ratones (Wang *et al.*, 2010). También la *Salmonella* atenuada que expresa VacA, CagA y UreB ha mostrado una reducción de la colonización por *H. pylori* (Liu *et al.*, 2011), entre otros. Nuevas estrategias de vacunas destinadas a evitar la respuesta inmunorreguladora de acogida puede ofrecer la mejor oportunidad de desarrollar una vacuna eficaz contra *H. pylori*. Un enfoque alternativo es la generación de vacunas recombinantes con múltiples epítomos (Tabla III).

Tabla III. Epítomos de antígenos *H. pylori* determinados *in silico*.

Antígeno	Epítomos	Respuesta	Referencia
VacA	AEEANKTPDKPD, KDSADRTTR,	Humoral	Liu <i>et al.</i> , 2004
NapA	TPTENGGN FEILKHLQADAIIVLFMKVHNF, ILEDYKHLE	Humoral	Gong <i>et al.</i> , 2007
Ureasa B	GGGTGPADGTNATTI, WMLRAAEEYSMNLGF, TLHDMGIFSITSSDS	Humoral	Qiu <i>et al.</i> , 2010
Ureasa B	DTLNEAGCVEDTMAAIAGRTMHTFHTEG AGGGHAPDIIKVAGEHNILPASTNPTIPFT VNTEAEHMDMLMVCHHLDKSIKEDVQF ADSRIRPQTIAAEDTLHDMGIFSITSSDSQ AMGRVGEVITRTWQTADKNKKEF	Humoral y celular	Wang <i>et al.</i> , 2010
Ureasa B	GKGGNKDMQDGVKNN, IGGGTGPADGTNATTITPGR, NASNDASLADQIEAG, TDTLNEAGCVEDTMAA, GRLKEEKGDNDNFRIKRY	Celular	Li <i>et al.</i> , 2012
CagA	DPDQKPIVDKNDRDNRQAFDGIS, AQQAQKNEDFNTGKNSE	Celular	Li <i>et al.</i> , 2012
HapA	EQILQNQGYKVI, TIQKKSEPLLSTG, SFTMDLSELDIQEKFLKT, THSSHSGGLVSTMVKG, FANIMQEIDKKLT	Celular	Li <i>et al.</i> , 2012

Los beneficios potenciales de las vacunas basadas en epítomos incluyen una respuesta inmune específica que evita los efectos secundarios de otros epítomos desfavorables en el

antígeno completo y aumenta la seguridad (Sbai, 2001). Una vacuna basada en epítipo también podría incluir moléculas antigénicas únicas combinadas de diferentes epítipos para aumentar la potencia y podría conducir a una estrategia eficaz para el control de *H. pylori* (Sette y Fikes, 2003). Los estudios inmunológicos han demostrado que la infección por *H. pylori* induce una activación de las respuestas adaptativas de las células B y T (Backert y Yamaoka, 2016). Como ya sabemos, los epítipos de proteínas reconocidos por las células T y B son los mejores candidatos para las vacunas debido a sus propiedades de alta especificidad (Olsen *et al.*, 2011). En este contexto, las herramientas bioinformáticas en la actualidad tienen un papel importante para identificar epítipos apropiados, además de ahorrar tiempo y ser rentables comparado con las herramientas convencionales de selección de epítipos (Li *et al.*, 2005). Estudios recientes han permitido la predicción de epítipos de *H. pylori* utilizando bioinformática. Moise *et al.* (2008) predijeron epítipos de células T conservados entre dos genomas de *H. pylori*; Ardito *et al.* (2011) identificaron un genoma central de siete cepas de *H. pylori* y predijeron epítipos de células T de consenso; Naz *et al.* (2015) predijeron vacunas candidatas, y luego, analizaron el grado de conservación de sus epítipos entre 39 genomas de *H. pylori*, lo que sugiere la posibilidad de desarrollo de una vacuna multi-epítipo o multi-componente. De manera similar, varios grupos de investigación se han centrado en el diseño de genes quiméricos que contienen diferentes epítipos para el desarrollo de vacunas contra *H. pylori*. Moss *et al.* (2011) diseñaron un constructo multi-epítipo que contenía 25 epítipos de células T (identificados previamente) y optimizó el orden de los epítipos. Después, Haghighi *et al.* (2013) diseñaron una construcción quimérica que consta de tres fragmentos de CagA, NaPA y OipA con una alta densidad de epítipos de células B y T. El constructo se fusionó con el dominio D3 de la flagellina de *Pseudomonas* como adyuvante. Recientemente, Mohammad *et al.* (2016) diseñaron una construcción quimérica que consta de cuatro fragmentos de FliD, Urease B, VacA y CagA con una alta densidad de epítipos de células B y T. Varios enfoques modernos están surgiendo con el objetivo de generar vacunas más eficaces y más seguras (Talmadge, 2011). Como resultado de esta tendencia ahora es complejo descubrir vacunas puesto que son el resultado de múltiples disciplinas, tales como las tecnologías de ADN

recombinante, genómica, biología estructural, inmunología humana y de ratón, adyuvantes y tecnologías de formulación (Rappuoli y Medaglini, 2014).

2.8.1 Adyuvante CTB

Ya que la colonización de *H. pylori* ocurre a nivel de la mucosa, se ha dado particular énfasis a la inmunización oral, además de otras rutas de inmunización de la mucosa. La inmunización de la mucosa requiere el uso de fuertes adyuvantes como la subunidad B de la toxina del cólera. La toxina del cólera es secretada por la bacteria Gram negativa *Vibrio cholerae*. La toxina se compone de dos proteínas, la subunidad A (CTA) que existe como un monómero complejo, y la subunidad B (CTB) que forma un pentámero (Stratmann, 2015). CTB forma una estructura de anillo compuesta de cinco monómeros. Cada monómero interactúa con dos moléculas vecinas a través de enlaces de hidrógeno. El centro de esta formación pentamérica adopta una estructura en forma de túnel, la pared está formada por cinco hélices alfa, cada una pertenece a un monómero diferente (Sixma *et al.*, 1993). La captación celular de la toxina del cólera está regulada por el reconocimiento de su receptor, el monosialotetrahexosilgangliósido (GM1) (Chester, 1998), el cual se encuentra en una amplia variedad de tipos de células (Kozireski-Chuback *et al.*, 1999). La presencia de este gangliósido en la superficie de las células epiteliales del intestino facilita la entrada de CTB (usada en formulaciones de vacunas orales) en el cuerpo y el acceso al sistema inmunológico (Moreno-Altamirano *et al.*, 2007). Al usar CTB como adyuvante para dirigir la proteína de interés a las células deseadas, una forma común es fusionar CTB recombinante con el antígeno de interés. CTB se ha utilizado para mejorar la inmunidad protectora contra las enfermedades infecciosas. Su capacidad para reducir las cantidades de antígeno de hasta 100 veces para la inmunización, debido a la unión eficaz a las células presentadoras de antígenos y las superficies del epitelio debe hacer a CTB un adyuvante rentable. La falta de toxicidad combinada con la estabilidad y la facilidad relativa para expresar CTB, ya sea sola o fusionada a péptidos o proteínas ha hecho a CTB un adyuvante fácil de manejar. CTB como adyuvante para vacunas humanas ha sido aprobado en Europa y Canadá (Stratmann, 2015).

2.8.2 Modelo *in vitro* para evaluar vacunas

Neutrófilos, monocitos y macrófagos, y células dendríticas son las primeras células reclutadas en la lámina propia gástrica durante la infección por *H. pylori* (Blosse *et al.*, 2018). Los macrófagos desempeñan un papel central en la respuesta inflamatoria a la infección por *H. pylori* (Gobert *et al.*, 2002). Varios mediadores inflamatorios son producidos por macrófagos en respuesta a este patógeno gástrico (Luo *et al.*, 2013). Pruebas *in vitro* en líneas celulares humanas es una nueva forma de evaluar la respuesta inmune a las formulaciones de vacunas (Brookes *et al.*, 2014). THP-1, una línea celular de leucemia monocítica aguda humana, es una de las líneas celulares más utilizadas para investigar la función y regulación de los monocitos y macrófagos en el estudio de la patogenicidad bacteriana. Esta línea celular de monocitos se puede diferenciar en macrófagos mediante el tratamiento con forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Park *et al.* 2007). Por lo cual, se pueden usar macrófagos humanos diferenciados, ya que *H. pylori* recluta y excita considerablemente los macrófagos en la submucosa gástrica para iniciar un rastreo crónico y persistente de actividades inflamatorias que conducen a ciertos cambios patofisiológicos (Luo *et al.*, 2013). Por lo tanto, es posible evaluar la capacidad de una vacuna para inducir la producción de citocinas proinflamatorias por macrófagos humanos (THP-1).

2.8.3 Modelo animal para evaluar la infección por *H. pylori*

Para entender la patogénesis de la infección por *H. pylori* y desarrollar nuevas vacunas, se requiere un modelo animal adecuado para reproducir los diversos aspectos de la enfermedad por *H. pylori* (Zhang y Moss, 2012). La mayoría de los investigadores han optado por utilizar modelos de ratones debido a que es pequeño, barato y conveniente. Sin embargo, el modelo de ratón no es ideal para descifrar la patogenia de la infección por *H. pylori* en seres humanos porque la actividad del sistema de secreción de tipo Cag IV (T4SS) a menudo se pierde durante la infección murina (Philpott *et al.*, 2002). La pérdida de la función T4SS ocurre con menos frecuencia en el gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), lo que indica que el modelo de gerbo de Mongolia puede ser más adecuado para estudiar la infección por *H. pylori* que el ratón (Rieder *et al.*, 2005). Además, los gerbos de Mongolia se colonizan fácilmente por *H. pylori*, y la infección induce diversos

cambios en la mucosa gástrica, como gastritis atrófica, úlceras y metaplasia intestinal, que imitan los resultados finales de la infección por *H. pylori* en humanos (Jang *et al.*, 2017). Lo anterior ha permitido la validación del modelo, y proyectar su uso en la búsqueda de nuevas vacunas profilácticas y terapéuticas contra la infección de *H. pylori* (Guo *et al.*, 2017). Con base en la información anterior, este proyecto de investigación propone el desarrollo de vacunas utilizando múltiples antígenos contra la infección por *H. pylori* para la evaluación en gerbos de Mongolia.

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la mayor parte de los inconvenientes del tratamiento farmacológico podrían superarse por la disponibilidad de vacunas eficaces y, aún más, de vacunas capaces de trabajar tanto profiláctica como terapéuticamente. Una vacuna anti- *H. pylori* podría ser especialmente útil en los países menos desarrollados, donde la infección por *H. pylori* es más frecuente y donde el alto costo de los tratamientos farmacológicos puede ser costado por sólo unos pocos (Blanchard y Czinn, 2015; Del Giudice *et al.*, 2001). Por lo tanto, la necesidad de una vacuna eficaz contra *H. pylori* es urgente y de primordial importancia para la salud pública mundial (Del Giudice *et al.*, 2009). La evidencia actual indica la necesidad de desarrollar vacunas que incluyan múltiples antígenos de fuerte protección o la construcción de cepas recombinantes que expresan estos antígenos en altas cantidades para una vacuna eficaz contra *H. pylori* (Czinn y Blanchard, 2011). Actualmente la biotecnología de vacunas se enfrenta a desarrollar innovaciones de bajo costo, por lo que, la disponibilidad de herramientas bioinformáticas, inmunoinformáticas y moleculares nos permitirá explorar tecnologías más efectivas, seguras y económicas para desarrollar nuevas vacunas recombinantes que contribuyan en la prevención de infecciones por *H. pylori*. Creemos que el desarrollo de una vacuna, a base de múltiples epítomos de antígenos inmunogénicos de *H. pylori*, puede estimular el sistema inmune humoral-celular del hospedero y contribuir a la promoción de su estado de salud. El conocimiento generado será importante para contribuir al desarrollo de una única y nueva vacuna multi-epítomo, multi-antigénica y multiestado contra la infección por *H. pylori*.

4. HIPÓTESIS

Debido a la complejidad de *H. pylori* y sus respuestas inmunes desencadenadas, una vacuna contra este patógeno debe incluir múltiples proteínas o varios de sus epítomos implicados en las diferentes etapas de la patogénesis. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna multi-antigénica, multiestado y multi-epítomo será una alternativa inmunoproliférica para prevenir infecciones producidas por *H. pylori*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

El propósito del presente proyecto de investigación se enfoca en el desarrollo de una vacuna con múltiples antígenos inmunogénicos en *H. pylori* y su validación en el modelo de infección de *H. pylori*.

5.2 Objetivos particulares

1. Diseñar *in silico* y construir una proteína quimérica vacunal a base de factores de virulencia de *H. pylori* (CTB-multiHp).
2. Producir una proteína vacunal (CTB-multiHp) a base de factores de virulencia de *H. pylori*.
3. Evaluar *in vitro* la inmunogenicidad de CTB-multiHp producida contra *H. pylori* (monocitos humanos THP-1).
4. Evaluar la inmunogenicidad y la inmunoprotección de la vacuna CTB-multiHp contra *H. pylori* en Gerbos de Mongolia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Como se muestra en la figura 3, para el desarrollo de una vacuna contra *H. pylori* se siguió una estrategia metodológica que abarcó diversas disciplinas.

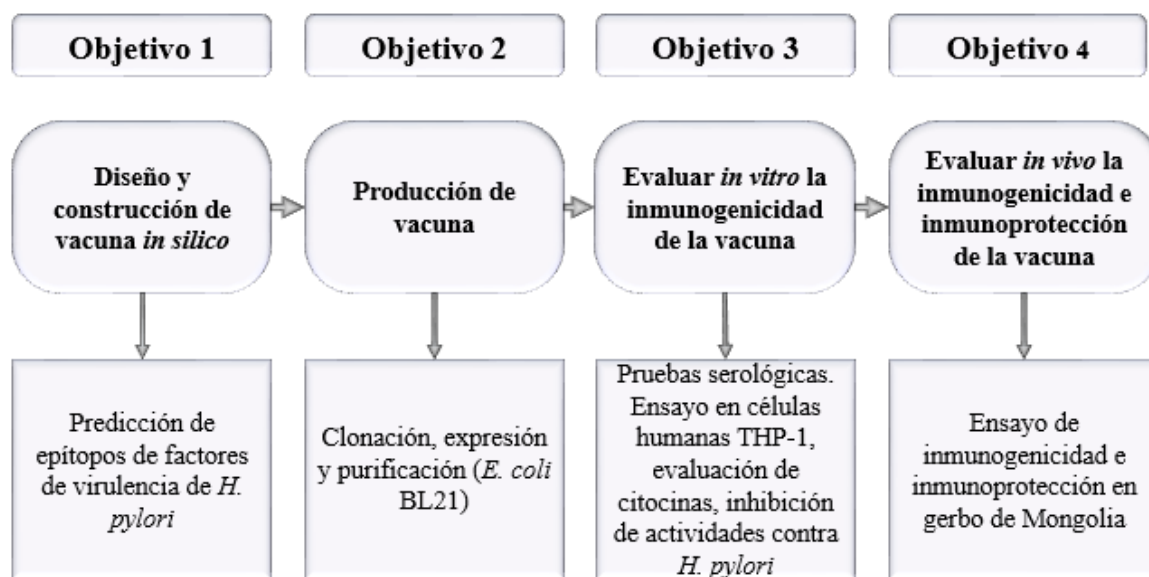


Figura 3. Diagrama general de la estrategia metodológica.

6.1 Diseño y construcción de una proteína quimérica a base de factores de virulencia de *H. pylori* (Objetivo específico 1).

6.1.1 Selección de antígenos.

La selección de antígenos fue basada en dos criterios principales: (1) antígenos involucrados en los estados de patogénesis de acuerdo con He *et al.* (2014), y (2) el potencial de ser candidato vacunal (antígeno esencial derivado de *H. pylori*, que cuente con función propuesta, inmunogenicidad y protección en el modelo animal) a través de la búsqueda en la literatura.

6.1.2 Análisis de secuencia.

Secuencias de proteínas antigénicas se obtuvieron de la base de datos de proteínas del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>) en formato FASTA. Para antígenos con secuencias variables, se generó una secuencia consenso, utilizando secuencias de cepas representativas de *H. pylori* en el mundo. La alineación de secuencias múltiples se realizó

utilizando los programas EMBOSS CONST (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons>), T-COFFE (<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>) y CLUSTALW-JALVIEW (<http://www.hongyu.org/software/clustal.html>).

6.1.3 Predicción de epítomos.

Todas las secuencias antigénicas fueron analizadas por separado para identificar los mejores segmentos que contengan epítomos de células B y T, usando programas bioinformáticos disponibles en la web.

Para la predicción de epítomos de unión a MHCI se utiliza los servidores: ProPred-I (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred1/>), RANKPEP (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.HTML>) y NetMHC I pan (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>). Para la predicción de epítomos de unión a MHCII se utilizaron los servidores: MetaMHCII (<http://www.biokdd.fudan.edu.cn/Service/MetaMHCII/server.html>), Rankpep II (<http://imed.med.ucm.es/Tools/rankpep.HTML>), ProPred-II (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/index.html>) y NetMHC II pan (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCIIpan/>). Para la predicción de epítomos de CTL (linfocitos citotóxicos) se utilizaron los servidores: CTL-Pred (<http://www.imtech.res.in/raghava/ctlpred/index.html>) y PAComplex (<http://pacomplex.life.nctu.edu.tw/>). Para la predicción de epítomos de células B se utilizó: ABCpred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>), Bcepred (<http://www.imtech.res.in/raghava/bcepred/>) y BCPREDS (<http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/>).

6.1.4 Diseño de la vacuna.

El constructo final se llamó “CTB-multiHp”, se diseñó fusionando epítomos con los espaciadores GPGPG y KK. El ordenamiento de epítomos fue realizado con el programa vaccineCAD (EpiVax Inc.). Se añadió señal de retención DELL para su retención en el retículo endoplásmico, y la secuencia del adyuvante CTB (AIE88420.1) para formar la vacuna candidata. Además, como control para análisis posteriores, se diseñó una proteína

de fusión llamada “CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈”, compuesta por el adyuvante CTB y un fragmento multi-epítopo (UreB₁₄₈₋₁₉₈) de Ureasa B.

6.1.5 Análisis de la vacuna.

Para la predicción de antigenicidad de CTB-multiHp fueron utilizados los programas ANTIGENpro (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>) y VaxiJen v2.0. Con el fin de predecir la alergenicidad se utilizó el servidor AlgPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/>). La solubilidad se evaluó con el servidor PROSO II (mips.helmholtz-muenchen.de/prosoII). Para la predicción de estructura secundaria se utilizó el programa PSIPRED V3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipredtest>) y para la estructura terciaria con Phyer2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=in>). Para el refinamiento de la estructura terciaria se utilizó el programa GalaxyLoop (<http://galaxy.seoklab.org/>). Con el fin de encontrar errores potenciales se utilizaron PROCHECK (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=tools_structureassessment1) y ERRAT (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/ERRATv2/>).

6.2 *Producir una proteína vacunal a base de factores de virulencia de H. pylori (Objetivo específico 2).*

6.2.1 Clonación, expresión y purificación de proteína

Las secuencias sintéticas que codifican los genes quiméricos CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ se optimizaron para la expresión procariota o eucariota (*Escherichia coli*, *Phaeodactylum tricornutum*) con el algoritmo Genescript Optimun Gene 8484 (www.genescript.com) y JCAT, Java Codon Adaptation Tool (<http://www.jcat.de/>). La secuencia de los genes quiméricos fue sintetizada por GenScript (http://www.genscript.com/gene_synthesis.html). Los genes sintéticos se amplificaron mediante PCR utilizando los cebadores MultiFw 5'-ATGACGCCCCAGAACATTAC-3' y MultiRv 5'-TTAGAGTTCATCGTCCTTCTTCT-3', y se clonó en el vector pENTR pCRTM8 /GW/TOPO® (Invitrogen, Carlsband, USA, nro. de cat. K250020) el marco de

lectura correcto y luego se subclonó en el vector de expresión pDEST17 (Invitrogen, Carlsband, USA, nro. de cat. 11803012). Después de esto, el plásmido recombinante se transformó en *E. coli* BL21-AITM (Invitrogen, Carlsband, USA, nro. de cat. C607003), se indujo la síntesis de proteína recombinante mediante la adición de L-arabinosa al 0.2%, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*E. coli* Expression System with Gateway® Technology, Carlsband, USA, nro. de cat. 11824026) y se evaluó en electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio al 12% (SDS-PAGE). Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad (His) en una columna de Ni-Sefarosa (Bio-Scale MT Colums; BioRad, nro. de cat. 7510081) y se confirmó mediante Western Blot usando anticuerpo monoclonal anti-His (Sigma, nro. de cat. SAB1305538) como primer anticuerpo y IgG anti-ratón conjugado con HRP (Sigma, nro. de cat. RABHRP2) como segundo anticuerpo, después de la separación en SDS-PAGE al 12% y transferido a una membrana de nitrocelulosa. La cantidad de endotoxina de las proteínas fue determinada mediante el kit de cuantificación de endotoxinas cromogénicas LAL (Thermo Scientific Pierce), de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

6.3 Evaluar in vitro la inmunogenicidad de la proteína vacunal producida contra H. pylori (Objetivo específico 3).

6.3.1 Cepas y condiciones de cultivo bacteriano

Para este estudio se utilizaron tres cepas de *H. pylori*: cepas obtenidas de American Type Culture Collection 60190 (ATCC® 49503TM), J99 (ATCC® 700824TM) y GC-IMSS-2012 (Méndez-Tenorio *et al.*, 2014). *H. pylori* se cultivó en placas de agar enriquecidas con 10% de sangre de oveja defibrinada, en condiciones microaeróbicas, 10% de CO₂ a 37 °C durante 3-5 días. Para la preparación del lisado de GC-IMSS-2012 y J99 se recolectaron de las placas y se suspendieron en buffer de fosfato (PBS). La mezcla en suspensión se sonicó (Thomas Scientific, EE. UU., nro. de cat. 9655A03) durante 4 minutos a una capacidad del 30% mientras se mantenía en un baño de hielo. El lisado de *H. pylori* se mantuvo a -70 °C hasta su uso. La cepa *H. pylori* 60190 se cultivó en líquido en caldo de brucela (Difco Laboratories, Detroit, nro. de cat. 211086) que contenía un 5% de suero fetal bovino (SFB)

(Gibco BRL, EE. UU., nro. de cat. 10270098), 48 horas a 10% de CO₂ a 37 °C. Los cultivos se centrifugaron y se concentraron como se ha descrito anteriormente (Donati *et al.*, 1997), y se almacenaron a -70 °C.

6.3.2 Cultivo de líneas celulares

Las líneas celulares de adenocarcinoma AGS (ATCC® CRL-1739TM) y monocitos humanos THP-1 (ATCC® TB-202 TM) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%. Los cultivos se mantuvieron a una densidad de aproximadamente 2x10⁶ células / ml a 37° C en una incubadora de CO₂ al 10%, y fueron pasados cada 3 días.

6.3.3 Preparación de antisuero de proteína recombinante

El antisuero de ratón se preparó contra la proteína CTB-multiHp purificada en ratones de 6 semanas de edad. Ratones se inmunizaron con 100 µg de proteína purificada en un intervalo de 8 semanas por vía intraperitoneal. Como control, ratones fueron inmunizados con el mismo procedimiento usando únicamente solución salina. El antisuero fue recolectado por punción cardiaca una semana después de la inmunización final, y se realizó western blot para CTB-multiHp y CTB- UreB₁₄₈₋₁₉₈ usando anticuerpo policlonal obtenido (denominado anti-CTB-multiHp) como primer anticuerpo, y IgG anti-ratón conjugado con HRP (Sigma, nro. de cat. RABHRP2), como segundo anticuerpo, después de la separación en SDS-PAGE al 12% y transferido a una membrana de nitrocelulosa.

6.3.4 Inmunoblot y análisis de ELISA

Para determinar qué epítomos de la proteína CTB-multiHp estaban reaccionando, se realizó una inmunotransferencia. Brevemente, el extracto libre de células de *H. pylori* GC-IMSS-2012 se separó mediante SDS-PAGE al 12% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Milipore). El suero anti-CTB-multiHp a una dilución de 1: 250 fue el anticuerpo primario. HRP conjugado anti-IgG de ratón (General Bioscience Corporation, EE. UU., nro. de cat. GM5271) como anticuerpo secundario. La membrana se reveló utilizando tetrahidrocloreuro de 3,3'-diaminobencidina (Sigma-Aldrich, EE. UU., nro. de cat. D5905). Para corroborar esto, se realizaron pruebas ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Las placas de ELISA se recubrieron con 1 µg / pocillo de NapA, HspA,

HpaA, CagA, Urease (Camorlinga-Ponce *et al.*, 1998) a 4 °C durante la noche. Se utilizaron sueros anti-CTB-multiHp a una dilución de 1: 500 como primer anticuerpo y se utilizó IgG anti-ratón conjugada con HRP a una dilución de 1: 2000 como anticuerpo secundario. La absorbancia a 450 nm se midió mediante un lector de microplacas. Las muestras de suero se analizaron por triplicado.

6.3.5 Inhibición de la actividad ureasa.

El lisado de *H. pylori* J99, que contiene ureasa, junto con diferentes concentraciones (0, 3.15, 6.25, 12.5, 25 y 50 µg) de anti-CTB-multiHp se añadió a una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 4 °C durante una noche. Luego se agregaron 50 µL de medio (urea 500 mM más 0.2 g/L de fenolsulohonftaleína (pH 6.8) en PBS), la placa se incubó a 37 °C durante 3 horas y se midió su absorbancia a 550 nm. Como controles (1) medio solo, (2) *H. pylori* solo y (3) también se usaron anti-CTB-multiHp solo. La siguiente fórmula se aplicó según Li *et al.* (2008):

$$\text{Inhibición} = \frac{(\text{actividad enzimática sin anticuerpo} - \text{actividad enzimática con anticuerpo})}{\text{actividad enzimática sin anticuerpo}} * 100\% \quad (1)$$

6.3.6 Ensayo de inhibición de la hemaglutinación.

El lisado de *H. pylori* J99 fue tratado con diluciones seriadas (1: 5 a 1: 5120) de sueros anti-CTB-multiHp durante una noche a 4 °C. Después se adicionaron 50 µL de estas mezclas en placas de 96 pocillos, seguidas de 50 µL de suspensión de eritrocitos humanos (2% en PBS). Los controles fueron (1) eritrocitos con PBS solo, (2) eritrocitos con fetuina (Sigma-Aldrich, EE. UU., nro. de cat. SRP6217) a 1 mg / mL. Se realizaron por duplicado todos los experimentos. La placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se determinó el título de hemaglutinación.

6.3.7 Neutralización de la actividad de citotoxinas vacuolizantes.

Los sueros anti-CTB-multiHp se incubaron en diluciones de 1: 5 a 1: 160 durante 1 hora a 37 °C con un volumen igual de sobrenadantes concentrados de *H. pylori* 60190. Las células AGS se incubaron durante 18 horas a 37 °C en placas de 96 pocillos con 50 µL de mezclas de suero y *H. pylori* más 50 µL de medio RPMI. Los controles incluyeron: (1) células AGS

con medio RPMI solo, y (2) células AGS con medio RPMI más sobrenadantes de *H. pylori* sin suero. Los experimentos se realizaron por duplicado. La neutralización de la vacuolización se evaluó mediante un ensayo de absorción de rojo neutro (Ayala *et al.*, 2008). Las células se fijaron con paraformaldehído al 3% (p/v) y se tiñeron con rojo neutro al 0.05% (Sigma-Aldrich, EE. UU., nro. de cat. N4638). La neutralización de la vacuolización se observó y fotografió utilizando un microscopio óptico. El rojo neutro se extrajo con alcohol ácido y la absorbancia se midió a 540 nm. Los resultados se expresaron como la media de los pozos experimentales A 540 nm.

6.3.8 Análisis serológicos.

Se utilizaron las proteínas purificadas CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ se diluyó hasta 25 µg/mL con buffer de fosfatos (pH 7.3) y fue colocado, en una placa de 96 pozos (ELISA), 0.1 mL (2.5 µg/ pocillo) de la dilución durante una noche. Se utilizaron muestras de suero de pacientes infectados con *H. pylori* con gastritis, úlcera gástrica, úlcera péptica, cáncer gástrico (todas diluidas 1:500) como primer anticuerpo y IgG anti-humano (dilución 1:1000) como el segundo anticuerpo. Cada muestra de suero fue probada por triplicado. El resultado de ELISA de la muestra de paciente se consideró positivo si la densidad óptica a 490 nm (A_{490}) fue superior a la media \pm 3SD de la muestra de suero negativo. También se presentaron los resultados finales restando el valor de absorbancia de los sueros de humanos negativos a *H. pylori* al valor de absorbancia de los sueros de humanos infectados con *H. pylori*.

6.3.9 Experimentos de cultivo celular.

Las células THP-1 se dispensaron en placas de cultivo celular a una densidad de aproximadamente 2×10^6 células por pocillo. Los macrófagos se diferenciaron de los monocitos con 10 ng / mL de forbol 12-miristato acetato de 13 (PMA, Sigma Aldrich, EE. UU., nro. de cat. ° P8139), durante 72 horas en una incubadora de CO₂ a 37 °C. Luego, se indujeron células con concentraciones crecientes (0,5, 1,0 y 2,5 µg/mL) de CTB-multiHp recombinante y de CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ de acuerdo con Ansari *et al.* (2014). Las células sin ningún estímulo se utilizaron como control negativo. Se utilizaron células con CTB (Sigma Aldrich, EE. UU., nro. de cat. C9903) a 0,14, 0,28 y 0,71 µg/mL (correspondientes a cada

concentración de proteína recombinante). Además, las células se trataron con LPS de *E. coli* 055: B5 (Sigma Aldrich, EE. UU., No de cat. L2880). Se usó la concentración de endotoxina determinada para CTB-multiHp y CTB-ureB₁₄₈₋₁₉₈, correspondiente a cada concentración de 0.5 µg, 1.0 µg y 2.5 µg. Los sobrenadantes de cultivo de cada tratamiento se recolectaron después de 10 horas de incubación y se almacenaron a -70 °C hasta su uso para el ensayo. Se hizo por triplicado.

6.3.10 Ensayo de citocinas.

La concentración de IL-1B, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α e INF- γ fue medida en el sobrenadante del cultivo por ELISA, utilizando kits disponibles comercialmente (BD Biosciences, EE. UU., nro. de cat. 557966, 554718, 56276, 557066, 566359, 743030) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración de citoquina se calculó en base a las curvas estándar proporcionadas con los kits, y los resultados se expresaron en pg/mL. Todas las muestras se analizaron por triplicado y se utilizaron valores promedio para el análisis. Los resultados finales se presentaron restando la concentración de citocinas del tratamiento con LPS y el control negativo a cada tratamiento de proteína recombinante.

6.3.11 Análisis estadísticos.

Para las pruebas de serología, se realizaron análisis de casos y controles mediante la prueba de chi cuadrada donde $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Para análisis de citocinas, los resultados se compararon mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando software Sigma Plot 14.0 (Systat Software, San Jose, CA, EE. UU.).

*6.4 Evaluar la inmunogenicidad y la inmunoprotección de la vacuna contra *H. pylori* en Gerbos de Mongolia (Objetivo específico 4).*

La meta planteada fue estimular el sistema inmune asociado con el tejido gastrointestinal, así como prevenir la patología del tejido y colonización por el organismo, en Gerbos de Mongolia infectados experimentalmente con *H. pylori*.

6.4.1 Animales y cultivo de *H. pylori*.

Gerbos de Mongolia libres de patógenos específicos, de 6 a 7 semanas de edad, se adquirieron del UPEAL-CINVESTAV (Ciudad de México). La cepa J99 de *H. pylori* adaptada al gerbo se obtuvo del Instituto Nacional de Pediatría (Ciudad de México). Las bacterias se cultivaron en placas de agar enriquecidas con sangre de oveja desfibrinada al 10%, en condiciones microaeróbicas, CO₂ al 10% a 37 °C durante 3-5 días.

6.4.2 Inmunización de Gerbos e infecciones experimentales con *H. pylori*.

Gerbos de Mongolia se dividieron aleatoriamente en tres grupos (n = 20 cada uno). Antes de la inmunización, los gerbos fueron privados de alimento durante 17 horas. Todos los grupos se inmunizaron por vía intragástrica con 10 µg de CTB-multiHp purificado (grupo I), o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ (grupo II), o 3% de bicarbonato de sodio (grupo III) usando agujas de alimentación. La primera dosis se realizó el día 0 y la dosis de refuerzo a los días 10 y 20. Diez días después de la última inmunización, se tomaron cinco gerbos por tratamiento y se extrajo sangre por punción en el corazón. Finalmente, los animales fueron sacrificados por exceso de anestesia con éter. Se recolectaron muestras de sangre, mucosa intestinal y bilis para el análisis de anticuerpos mediante ELISA. Además, se recolectó tejido gástrico para el análisis histológico y también para análisis futuro de citocinas. Los gerbos restantes, diez días después de la última inmunización, fueron desafiados intragástricamente con 1×10^9 UFC de *H. pylori* tres veces cada dos días. A intervalos de 15 días, se anestesiaron cinco gerbos de cada grupo, y nuevamente se recolectaron para análisis de anticuerpos: sangre, mucosa intestinal, bilis. Se recolectó tejido gástrico para la identificación de *H. pylori* mediante histopatología y para análisis futuros de citocinas.

6.4.3 Análisis de anticuerpos específicos.

Placas ELISA se recubrieron con 20 µg/ pocillo de las proteínas purificadas CTB-multiHp o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ a 4 °C durante una noche. Los niveles de IgG, IgA e IgM se midieron a partir de suero, mucosa intestinal y bilis. Fueron utilizados como segundo anticuerpo: Anticuerpo IgG de gerbo (HRP) (Biocarte, Medical, nro. de cat. GTX77588), Anticuerpo IgA de ratón (HRP) (Biocarte, Medical, nro. de cat. GTX77223), Anticuerpo IgM de ratón (Biocarte, Medical, nro. de cat. GTX77230). Los anticuerpos se detectaron con solución de

sustrato de o-fenilendiamina. La absorbancia a 450 nm se midió mediante un lector de microplacas. Las muestras de suero se analizaron por triplicado.

6.4.4 Examinaciones hitopatológicas y detección de *H. pylori*

Los estómagos de los Gerbos de Mongolia se abrieron a lo largo de la curvatura menor. Cada estómago se diseccionó en dos secciones longitudinales iguales. La mitad del tejido cortado de cada estómago se fijó con formalina al 10%. Después de ser incrustadas en parafina, las tiras de los estómagos fijadas con formalina, se cortaron, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). La clasificación de la patología gástrica y la identificación de *H. pylori* se llevó a cabo por un solo patólogo (experto), que desconocía la identidad de los grupos. El grado de inflamación se obtuvo en una escala de 0 a 6: grado 0, ausencia; grado 2, leve; grado 4, moderado; y grado 6, grave, basado en la presencia de células polimorfonucleares (inflamación aguda) y linfocíticas (inflamación crónica). Para la identificación de *H. pylori*, la densidad bacteriana en los Gerbos se evaluó mediante histología. El grado de *H. pylori* se obtuvo en una escala de 0 a 6: grado 0, normal; grado 2, leve; grado 4, moderado; y grado 6, marcado. El porcentaje de protección en los gerbos fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Nivel de protección (\%)} = 100 - \frac{\text{promedio del grado de } H.pylori \text{ final} \times 100}{\text{promedio del grado de } H.pylori \text{ inicial}} \quad (2)$$

6.4.5 Análisis estadísticos

Los resultados se compararon mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey, $p \leq 0.05$. El análisis estadístico se realizó utilizando software Sigma Plot 14.0 (Systat Software, San Jose, CA, EE. UU.).

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de las secuencias candidatas

La búsqueda bibliográfica condujo a la identificación de siete antígenos o factores de virulencia representativos y clave de las diferentes etapas de la infección por *H. pylori*

(UreB, HspA, HpaA, GGT, NapA, CagA, VacA). Los antígenos UreB, HspA, HpaA, GGT, NapA son muy conservados, en cambio CagA y VacA son altamente variables. Por consiguiente, se realizó una secuencia consenso para cada antígeno empleando las cepas de *H. pylori* con genoma secuenciado, representativas en todo el mundo (Europa, América, África, Asia), abarcando los principales síntomas clínicos ocasionados por *H. pylori* (Gastritis, úlcera duodenal, cáncer gástrico). Se eligió las cepas de *H. pylori* más virulentas, es decir, CagA+ (Tabla IV).

Tabla IV. Cepas de *H. pylori* representativas en el mundo.

Genoma	País	Continente	Síntoma	CagA +	Referencia
26695	Reino Unido	Europa	Gastritis	✓	Tomb <i>et al.</i> , 1997
HPAG1	Suecia	Europa	Gastritis crónica atrófica	✓	Oh <i>et al.</i> , 2006
P12	Alemania	Europa	Úlcera duodenal	✓	Fischer <i>et al.</i> , 2010
v225d	Venezuela	América	Gastritis aguda superficial	✓	Mane <i>et al.</i> , 2010
J99	USA	América	Úlcera duodenal	✓	Alm <i>et al.</i> , 1999
CG-IMSS-2012	México	América	Cáncer gástrico intestinal	✓	Méndez-Tenorio <i>et al.</i> , 2014
2018	África-Francia	África	Úlcera duodenal	✓	Avasthi <i>et al.</i> , 2011
F30	Japón	Asia	Úlcera duodenal	✓	Kawai <i>et al.</i> , 2011
F57	Japón	Asia	Cáncer gástrico	✓	Kawai <i>et al.</i> , 2011
XZ274	China	Asia	Cáncer gástrico	✓	Guo <i>et al.</i> , 2012

7.2 Predicción de epítomos de células B y T.

Una vez obtenidas las secuencias consenso para cada antígeno, éstas fueron utilizadas para la predicción de epítomos de células B y T utilizando diferentes programas bioinformáticos. Para aumentar la inmunogenicidad fueron necesarios múltiples epítomos para generar una respuesta inmune específica (células T y B). El análisis de las secuencias por programas

bioinformáticos para células T y B (utilizando alelos de humano y ratón BALB/c) arrojaron aproximadamente 16,000 epítomos. Se seleccionaron valores más altos de epítomos en cuanto a: puntaje, afinidad, nivel de unión (Tabla V). Los epítomos obtenidos fueron Ureasa B (residuos 148-158, 188-198), Citotoxina asociada al gen A (residuo 584-602, Proteína Activadora de Neutrófilos (residuos 4-28), Citotoxina Vacuolizante A (residuo 63-81), Adhesina A de *H. pylori* (residuo 77-99), proteína de choque térmico A (residuo 32-54, gama glutamil-transpeptidasa (residuo 271-293).

Tabla V. Epítomos de unión determinados por diferentes servidores.

		CagA		GGT		VacA	
Servidores	Posición	Mejor puntaje de epítomo en la región	Posición	Mejor puntaje de epítomo en la región	Posición	Mejor puntaje de epítomo en la región	
MHC I	Rankpep I	Mejor epítome clasificado		Mejor epítome clasificado		Puntaje	
	NetMHC I	Puntaje		Puntaje		Afinidad mM	
	Propred I	Afinidad mM		Afinidad mM		Puntaje Log	
	566-575	11.8	342-351	20	95-104	250	
	577-585	76					
	565-574	550	347-356	81.5	92-105	4.09	
	576-585	31.96					
MHC II	Rankpep II	Puntaje		Puntaje		Puntaje	
		566-581	11.8	342-358	16.9	63-72	11.8
		566-574	15.6	277-286	14.4	98-107	20.4
		591-600	20.1				
	Propred II	Puntaje Log		Puntaje Log		Puntaje Log	
		562-578	4.09	344-352	5.4	92-99	5.7
		567-579	7.6	271-293	3.9		
		584-591	6.37				
		594-602	4.08				
	NetMHC II	Afinidad mM		Afinidad mM		Afinidad mM	
	589-598	43.57	342-352	50.4	100-109	51.4	
			273-284	49.08			
MetaMHC II	MetaSVMp Puntaje		MetaSVMp Puntaje		MetaSVMp Puntaje		
	571-585		271-283		101-109		
	585-600						
Cel B	ABCpred	Puntaje		Puntaje		Puntaje	
		561-578	0.72	272-282	0.544	63-74	0.72
	BCEpred						
		562-568	0.80	289-293	0.495	69-80	0.84
	587-592	0.485			91-100	0.523	
	BCpred	Puntaje					
	562-574	0.294	346-358	0.85	63-81	0.489	

585-597	0.727	280-292	0.635	92-104	0.495
---------	-------	---------	-------	--------	-------

Tabla VI. Epítomos de unión determinados por diferentes servidores.

Servidores	NapA		UreB		HspA		HpaA		
	Posición	Mejor puntaje de epítopo en la región	Posición	Mejor puntaje de epítopo en la región	Posición	Mejor puntaje de epítopo en la región	Posición	Mejor puntaje de epítopo en la región	
MHC I	Rankpep I	Mejor epítopo clasificado	Posición	Mejor epítopo clasificado	Posición	Mejor epítopo clasificado	Posición	Mejor epítopo clasificado	
	NetMHC I	Puntaje		Puntaje		Puntaje		Puntaje	
		4-11 18-28	24.9 37.6	149-158 173-180	11.9 15.4	77-86	52	32-54	24
	Propred I	Afinidad mM		AfinidadmM		Afinidad mM		Afinidad mM	
		15-28	81.5	188-197	50.6	77-85	70.8	32-40	66.9
MHC II	Rankpep II	Puntaje Log		Puntaje Log		Puntaje Log		Puntaje Log	
		4-24	4.9	148-157 188-196	3.9 4.5	77-91	4.5	32-54	6.4
	Propred II	Puntaje		Puntaje		Puntaje		Puntaje	
		4-28	12.1	149-158 171-180 188-198	11.8 15.6 12.9	78-99	11.9	32-54	11.8
	NetMHC II	Puntaje Log		Puntaje Log		Puntaje Log		Puntaje Log	
	11-19	6.1	148-156 190-198	5.4 3.9	77-86 89-97	4.8 5.4	36-43 49-54	3.8 5.4	
	MetaMHC II	Afinidad mM		AfinidadmM		Afinidad mM		Afinidad mM	
		6-25	61.9	148-157 188-197	58.7 61.8	78-87 89-99	70.1 69.8	38-47	50.9
Cel B	ABCpred	MetaSVMp		MetaSVMp		MetaSVMp		MetaSVMp	
		15-23	Puntaje	174-180	Puntaje	79-87	Puntaje	---	Puntaje
	BCEpred	Puntaje		Puntaje		Puntaje		Puntaje	
		4-13	0.72	148-156 170-180 192-198	0.85 0.72 0.85	---		45-54	0.67
	BCpred	0.80				0.485			
		5-10	---			85-94		39-42	0.580

7.3 Diseño y construcción de una vacuna multiepitope

Debido a que el orden de epítomos afecta inmunogenicidad e inmunoprotección, se realizó el ordenamiento de epítomos (Tabla VII) para crear una secuencia inmunogénica óptima y no crear epítomos no intencionados. Además, se utilizaron ligandos específicos como GPGPG y KK, los cuáles evitan la formación de otros epítomos, aparte de optimizar el procesamiento de epítomos. Para el diseño de la vacuna (Figs. 4 y 5) se utilizó el adyuvante de la subunidad B de la toxina del cólera ya que antígenos acoplados a CTB incrementan la inmunogenicidad. Asimismo, una señal de retención DDEL en el retículo endoplásmico (RE) añadida en el extremo C-terminal para evitar formación de patrones de glicosilación complejos dentro del aparato de Golgi. Se diseñaron 2 vacunas, la primera denominada CTB-multiHp (Fig. 4) y la segunda nombrada CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ (Fig. 5). La vacuna CTB-multiHp está compuesta del adyuvante CTB fusionado a múltiples epítomos de *H. pylori* separados por enlazadores GPGPG y KK. La vacuna CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ está conformada por CTB fusionado a un fragmento multiepitópico de ureasa B₁₄₈₋₁₉₈, con respectivos enlazadores y péptido señal. En las figuras 6 y 7 se presenta la secuencia de aminoácidos que forman parte de las vacunas CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈.

Tabla VII. Selección de epítomos finales y ordenamiento de los mismos.

Orden	ID	Epítomos	Enlazador
1	GGT ₃₄₂₋₃₅₈	KLINKAYAKKIFDTIQP	
2	HpaA ₇₇₋₉₉	NKFKNQTTLKVEQILQNQGYKVI	GPGPG
3	UreB ₁₄₈₋₁₅₈	AFASGVTTMIG	GPGPG
4	HspA ₃₂₋₅₄	KEKPLMGVVKAVSHKISEGCKCV	
5	CagA ₅₈₄₋₆₀₂	LVGKASNFNKAVAEAKNTG	
6	CagA ₅₆₁₋₅₈₅	VAKGLSPQEANKLIKDFLNSNKELV	GPGPG
7	GGT ₂₇₁₋₂₉₃	YRGYKIISMSPSSGGTHLIQIL	GPGPG
8	NapA ₄₋₂₈	FEILKHLQADAIVLFMKVHNFHWNV	
9	VacA ₆₃₋₈₁	WGLKQAEAEANKTPDKPKDV	
10	VacA ₉₁₋₁₀₉	NEFPNKEYDLYKSLLSSKI	GPGPG
11	UreB ₁₅₇₋₁₈₀	IGGGTGPADGTNATTITPGRRNLK	
12	UreB ₁₈₈₋₁₉₈	EYSMNLGFLAK	KK

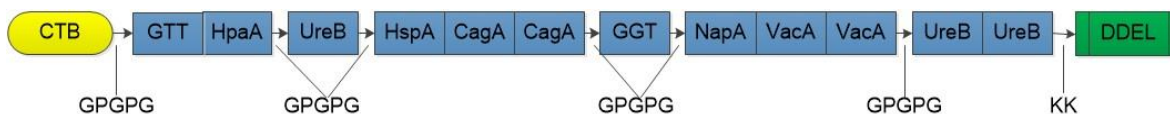


Figura 4. Diagrama esquemático de la construcción vacunal, CTB-multiHp, consistente de adyuvante CTB con ligando específicos unidos a epítomos para células B y T y una señal de retención DDEL.

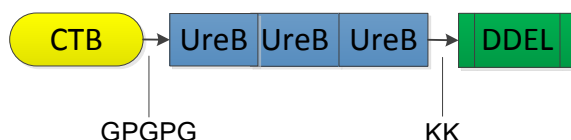


Figura 5. Diagrama esquemático de la construcción CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈. Consistente de adyuvante CTB con ligando específicos unidos a epítomos de la Ureasa B y una señal de retención DDEL.

MTPQNITDLCAEYHNTQIH^TLN^DKIFSYTESLAGKREMAITFKNGATFQVEVPGSQ
HIDSQKKAIERMKD^TLRIAYL^TEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANGPGPGKLI
NKAYAKKIFD^TIQPNKFKNQ^TTTLKVEQILQNQGYKVIGPGPGAFASGVTTMIGGP
GPGKEKPLMGVVKA^VSHKISEGCKCVL^VGKASNFNKAVAEAKNTGVAKGLSPQE
ANKLIKDFLNS^NKELVGPGPGYR^GYKII^SMSPPSSGGTHLIQILGPGPGFEILKHLQ
ADAIVLFMKVHNFHWN^VWGLKQAEANKTPDKPDKVNEFPNKEYDL^YKSLLSSK
IGPGPGIGGGTGPADGTNATTITPGRRLKEYSMNLGFLAKKKDDEL*

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de CTB-multiHp.

MTPQNITDLCAEYHNTQIH^TLN^DKIFSYTESLAGKREMAITFKNGATFQVEVPGSQ
HIDSQKKAIERMKD^TLRIAYL^TEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANGPGPGAFA
SGVTTMIGGGTGPADGTNATTITPGRRLKEYSMNLGFLAKKKDDEL*

Figura 7. Secuencia de aminoácidos de CTB-UreB₁₄₅₋₁₉₅.

7.4. Características de la vacuna

Los resultados de antigenicidad fueron avalados utilizando ANTIGENpro dando un valor de 0.905765 y, con VaxiJen v2.0 con un valor de 0.5811. La predicción de la alergenicidad indicó que la vacuna no es alérgeno. La solubilidad de la proteína quimérica se interpretó utilizando PROSO II, y se clasificó como proteína soluble.

7.5 Predicción de la estructura secundaria y terciaria

Basado en los resultados de PSIPRED, la proteína de la vacuna consistió de 41% de alfa hélice, 11% de láminas beta y 48% de bucles como elementos estructurales. La predicción de la estructura secundaria se presenta en la figura 8. La predicción de la estructura secundaria es usada para refinar la estructura terciaria de la proteína. La figura 9 se ilustra el mejor modelo terciario predicho para describir la proteína y la validación de la proteína vacunal con el gráfico de Ramachandran.

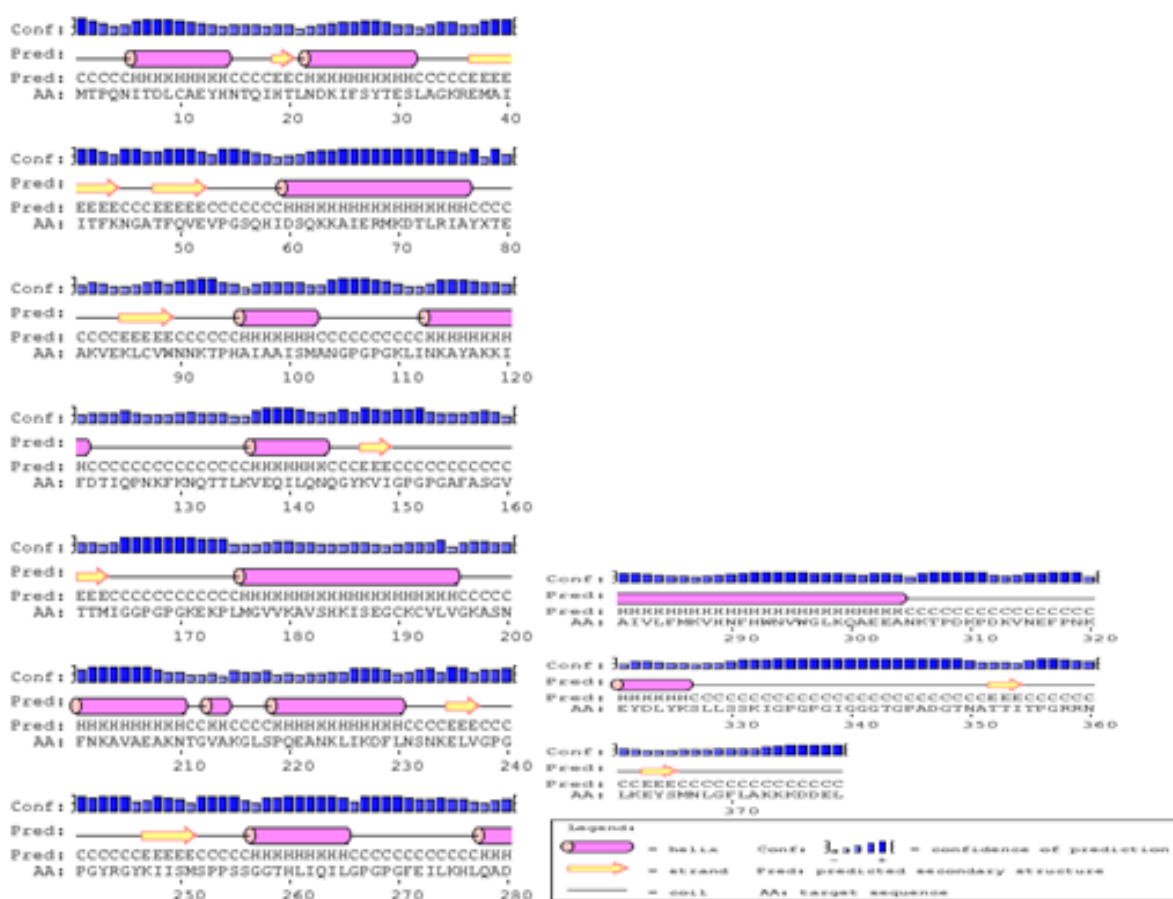


Figura 8. Resultados gráficos de PSIPRED de la predicción de la estructura secundaria de CTB-multiHp

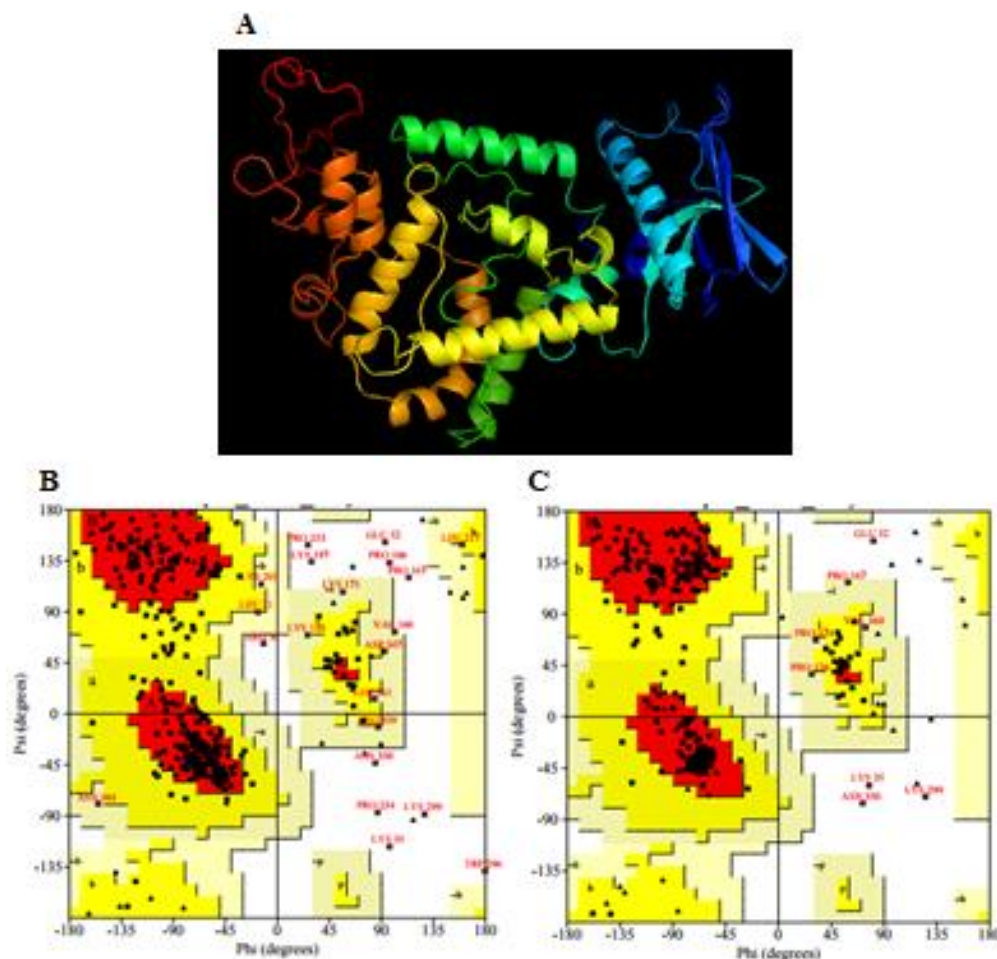


Figura 9. Validación del modelo 3D de CTB-multiHp. a) Predicción final de la estructura terciaria de la vacuna contra *H. pylori*. b) Modelo inicial evaluado con el gráfico de Ramachandran indicaron que el 74.4% de los residuos se encuentran en regiones más favorecidas, c) el modelo después del refinamiento reveló que el 87.5% de los residuos se encuentran en las regiones más favorecidas. Las regiones favorecidas y las más favorecidas se muestran con colores amarillo y rojo, respectivamente. Las regiones generosamente permitidas se indican en color amarillo pálido, y las regiones no permitidas en color blanco.

7.6 Clonación, expresión y purificación de proteínas

En este estudio, la optimización de codones se llevó a cabo para el sistema procariótico y eucariota. Debido a futuras investigaciones, se eligió la secuencia optimizada para *P. tricornutum* y el gen fue sintetizado por Gene script. CTB-UreB₁₄₅₋₁₉₅ tiene 492 pb (Fig. 10) y para CTB-multiHp son 1152 pb (Fig. 11). Además, se diseñaron oligonucleótidos específicos para su amplificación. La construcción multi-epítipo inicia con el adyuvante CTB y termina con un epítipo de ureasa B, coincidentemente con la construcción CTB-UreB₁₄₅₋₁₉₅, por lo cual que se diseñó un primer Forward y un primer Reverse para estas dos

construcciones. La proteína CTB-multiHp y CBT-UreB₁₄₈₋₁₉₈ se expresaron con éxito en *E. coli* BL21-AI y se identificó por su masa molecular (~40 y ~20 kDa) en PAGE. Una banda principal con el tamaño de ~40 kDa se observó en western blot, que era coherente con la expresión CTB-multiHp en el gel. Después de la purificación por columna cargada Ni₂₊ y cromatografía de intercambio aniónico, se analizó la pureza de la proteína de fusión CTB-multiHp que se muestra en la figura 12. Las concentraciones de endotoxinas para 1 µg de proteína recombinante fueron 16.1 UE/µg (CBT-multiHp) y 100 UE/µg (CBT-UreB₁₄₈₋₁₉₈).

```

ATGACGCCCCAGAACATTACGGACCTTTGCGCCGAATACCACAACACCCAGATCCACACGCTCAACGACAAGA
TTTTCTCCTACACGGAATCCCTTGCCGGAAAGCGTGAAATGGCCATTATCACCTTCAAGAACGGCGCCACGTT
TCAGGTGGAAGTCCCCGGTTCCCAGCACATTGACTCGCAAAAGAAGGCCATCGAACGTATGAAGGATACGCTC
CGCATTGCCTACTTGACCGAAGCCAAGGTGCAAAAAGTTGTGCGTCTGGAACAACAAGACCCCGCACGCCATTG
CCGCCATCTCGATGGCCAACGGACCCGGTCCGGGAGCCTTCGCCTCGGGTGTCAACACGATGATTGGTGGAGG
AACCGGACCCGCCGACGGTACGAACGCCACCACGATCACCCGGGGCCGTCGCAACCTCAAGGAATACTCCATG
AACCTCGGCTTTCTCGCCAAGAAGAAGGATGACGAACTCTAA

```

Figura 10. Secuencia de nucleótidos CTB-UreB₁₄₅₋₁₉₅ con optimización de codones para sistema eucariótico.

```

ATGACGCCCCAGAACATTACCGACCTTTGCGCCGAATACCACAACACCCAGATCCACACGCTCAACGACAAGA
TTTTCTCCTACACCGAATCCCTCGCCGGAAAGCGTGAAATGGCCATTATCACCTTCAAGAACGGAGCCACGTT
TCAGGTGGAAGTCCCCGGTTCCCAGCACATTGACTCGCAAAAGAAGGCCATCGAACGTATGAAGGATACGCTC
CGCATTGCCTACTTGACCGAAGCCAAGGTGCAAAAAGCTCTGCGTCTGGAACAACAAGACGCCCCACGCCATTG
CCGCCATCTCGATGGCCAACGGTCCCAGGACCCGGAAAGTTGATCAACAAGGCCTACGCCAAGAAGATTTTCGA
CACCATCCAGCCGAACAAGTTTAAGAACCACCACGTTGAAGGTGGAACAGATTCTTCAGAACCAAGGCTAC
AAGGTCATCGGTCCCAGGACCCGGAGCCTTCGCCTCCGGAGTCACCACGATGATTGGAGGACCCGGTCCGGGCA
AGGAAAAGCCCCTTATGGGTGTCTCAAGGCCGTCCTCCACAAGATTTCCGAAGGTGCAAGTGTCTCTCGT
CGGCAAGGCCTCGAACTTCAACAAGGCCGTCGCCGAAGCCAAGAACACCGGAGTCGCCAAGGGTTTGTCCCCG
CAAGAAGCCAACAAGCTCATTAAAGGACTTTCTCAACTCGAACAAGGAAGTTGTCGGACCCGGTCCGGGCTACC
GCGGTTACAAGATTATCTCCATGTGCCCCCGTCTCGGGCGGAACCCACTTGATTCAAATCCTTGGACCCGG
TCCGGGCTTCGAAATTCTTAAGCACTTGCAAGGCCGATGCCATCGTCTCTTCATGAAGGTCCACAACCTTTCAC
TGGAACGTCTGGGGCTTGAAGCAGGCCGAAGAAGCCAACAAGACCCCGGACAAGCCGGATAAGGTCAACGAAT
TTCCCAACAAGGAATACGACTTGTACAAGTCCCTCTTGTCTCGAAGATTGGACCCGGTCCGGGAATCGGTGG
CGGAACCGGACCCGCCGATGGAACGAACGCCACCACGATCACCCGGGACGTCGCAACCTCAAGGAATACTCC
ATGAACCTCGGATTTCTCGCCAAGAAGAAGGACGATGAACTCTAA

```

Figura 11. Secuencia de nucleótidos CTB-multiHp con optimización de codones para sistema eucariótico.

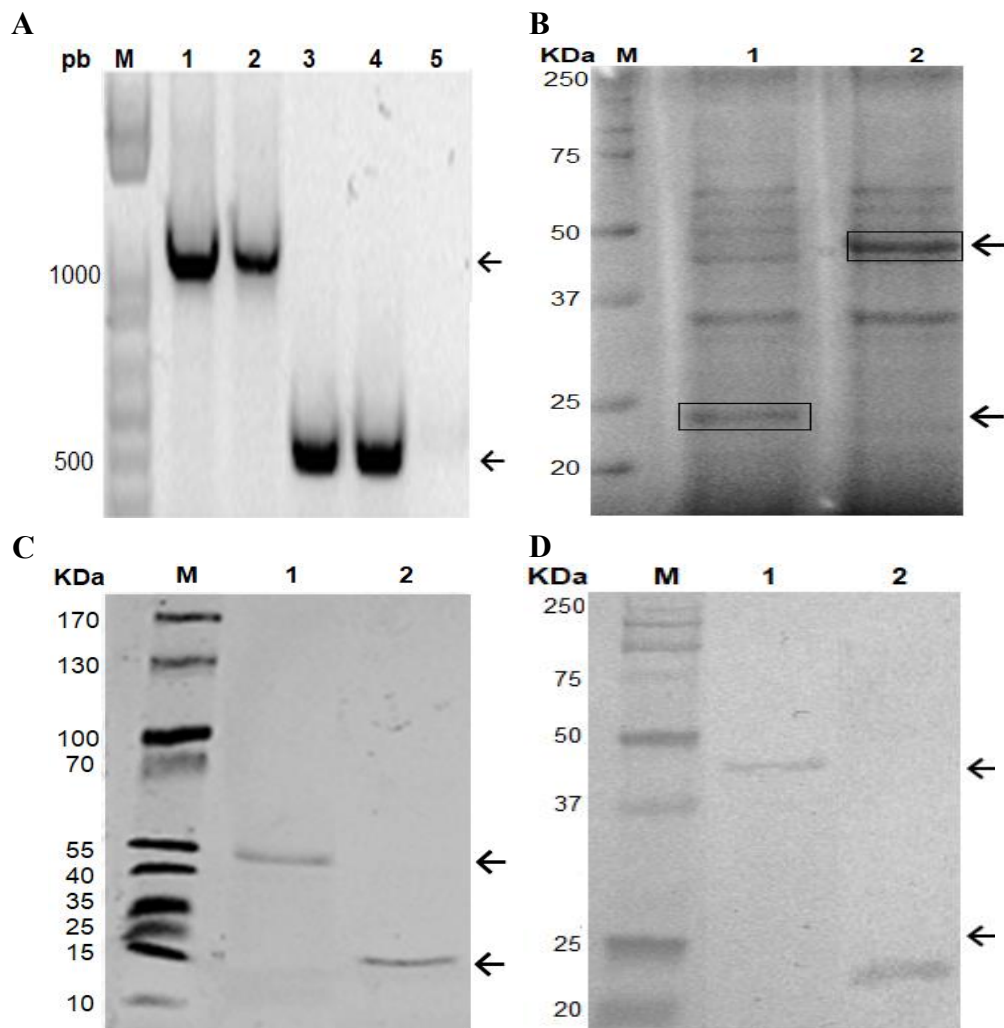


Figura 12. Construcción, expresión, purificación e inmunodetección de proteínas recombinantes CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈. (A) Construcción. Carril M, marcador de ADN 1 kb plus (InvitrogenTM, n° de cat. 10787018); carril 1, gen CTB-multiHp a 1042 pb; carril 3, CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ a 492 pb; carriles 2 y 4, controles positivos; carril 5, control negativo. (B) Células *E. coli* BL21-AITM expresando proteínas CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ por SDS-PAGE. Carril M, caleidoscopio Precision Plus ProteinTM (BioRad, nro. de cat. 1610375); los carriles 1 y 2, muestran lisados celulares de las células de *E. coli* inducidas; carril 2, banda de la proteína CTB-multiHp a ~40 kDa; carril 3, banda de la proteína CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ a ~20 kDa. (C) Purificación de proteínas recombinantes analizadas por SDS-PAGE. Carril M, PageRulerTM Escalera de proteínas precortadas (ThermoFisher Scientific, nro. de cat. 26616); carril 2, purificado CTB-MultiHp; carril 3, purificado CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈. (D) Western blot de proteínas purificadas CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ utilizando anticuerpos anti-CTB-multiHp. Carril M, caleidoscopio Precision Plus ProteinTM; carril 1, CTB-multiHp protein; carril 2, CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈.

7.7 Inmunotransferencia y ELISA

Con el fin de probar la inmunorreactividad de los epítomos (CagA, VacA, Ureasa, GGT, HpaA, NapA, HspA) de CTB-multiHp, se realizaron transferencias de Western y ELISA. En la inmunotransferencia, anti-CTB-multiHp reaccionó positivamente con proteínas (VacA, Ureasa, GGT, HpaA, NapA, HspA) de *H. pylori* (Fig. 13A). Y, por otro lado, se probaron cinco antígenos (NapA, HspA, HpaA, CagA y Ureasa) que reaccionaron con anti-CTB-multiHp en la prueba de ELISA. Se obtuvo la absorbancia absoluta de CagA (1.91 ± 0.01), Ureasa (1.61 ± 0.04), NapA (0.23 ± 0.03), HspA (2.69 ± 0.01), y HpaA (0.21 ± 0.03).

7.8 Inhibición de la actividad ureasa

Se evaluó el efecto inhibitorio de los sueros anti-CTB-multiHp en la actividad de la ureasa. El lisado de *H. pylori* se incubó con diluciones seriadas de anti-CTB-multiHp, y la actividad de la ureasa se midió a 550 nm mediante el indicador de rojo fenol. En la figura 13B se muestra que el anti-CTB-multiHp inhibió la actividad de la ureasa y esto fue dependiente de la dosis.

7.9 Inhibición de la hemaglutinación

Se ensayó la capacidad de los sueros anti-CTB-multiHp para inhibir la hemaglutinación por *H. pylori*. Para ello, *H. pylori* se trató con diluciones de sueros anti-CTB-multiHp y se incubó con glóbulos rojos. Se observó una notoria inhibición de la hemaglutinación a partir de diluciones 1: 1280 (Fig. 13C).

7.10 Neutralización de la actividad de citotoxinas vacuolizantes

En la figura 13D se muestra la capacidad de los sueros anti-CTB-multiHp para neutralizar la vacuolización en células AGS infectadas con *H. pylori*. Las células AGS incubadas con sobrenadante de *H. pylori* revelaron vacuolas grandes. En el caso de control de células AGS sin estimulación, no se desarrollaron vacuolas, y se presentó un efecto similar con el sobrenadante de anti-CTB-multiHp más *H. pylori* (diluciones 1:5). Estos mismos resultados fueron corroborados por un ensayo de captación de rojo neutro.

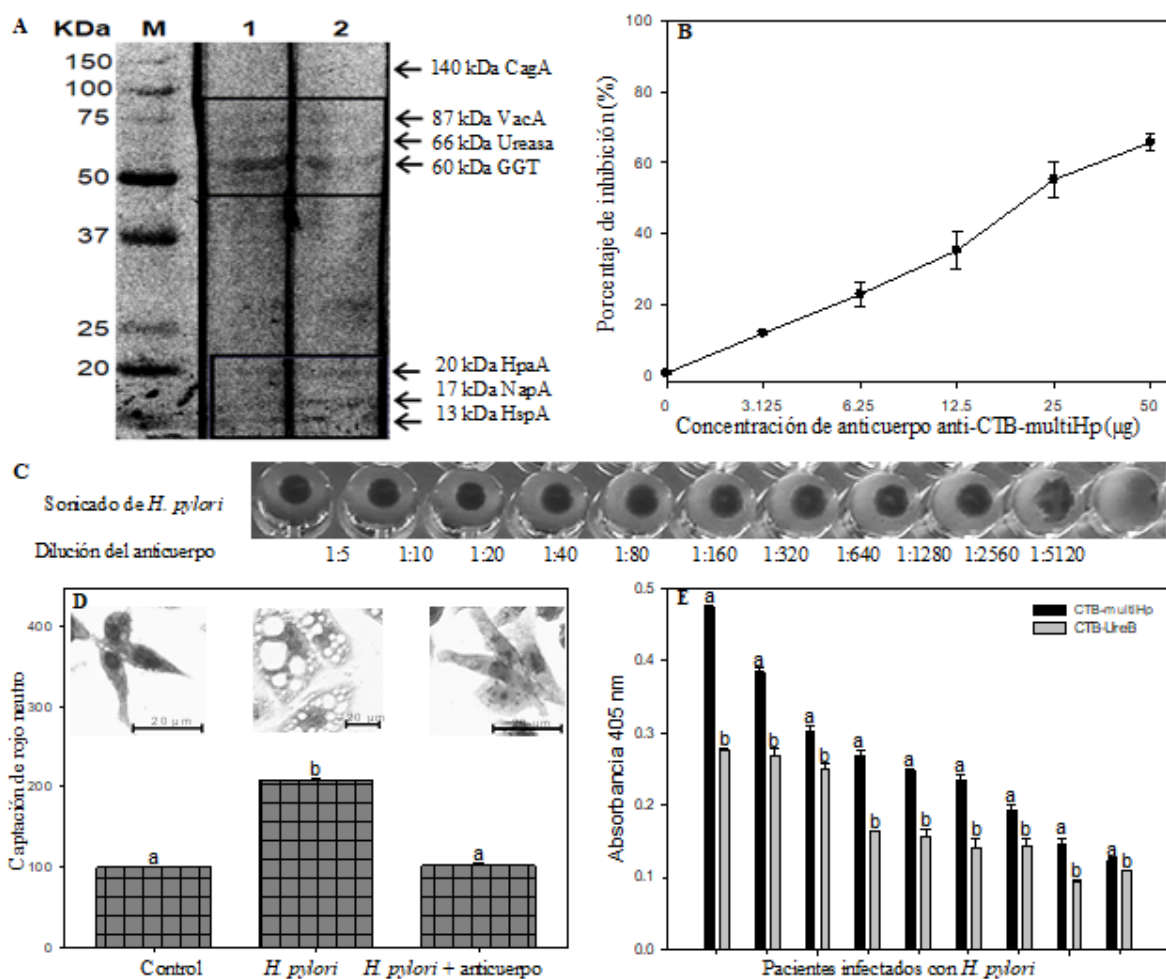


Figura 13. Inmunoblot; inhibición de la actividad: ureasa, hemaglutinación y vacuolización; serología. (A) Inmunoblot: reactividades de los principales antígenos de *H. pylori* con sueros anti-CTB-multiHp. Los siguientes patrones de reactividad se observaron cuando los sueros anti-CTB-multiHp se probaron con lisado de *H. pylori*. Línea M, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope; carril 1 y 2, positivo para bandas de 140, 87, 66, 60, 20, 17 y 13 kDa, correspondientes a CagA, VacA, ureasa, GGT, HpaA, NapA y HspA, respectivamente. (B) Neutralización de la actividad de la ureasa de *H. pylori* por el anti-CTB-multiHp. (C) Inhibición de la hemaglutinación del lisado de *H. pylori* con los sueros anti-CTB-multiHp. (D) Inhibición de la vacuolización mediante microscopía y ensayo de captación de rojo neutro en células AGS expuestas a sobrenadante de *H. pylori* más sueros anti-CTB-multiHp. (E) La respuesta humoral dirigida contra CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ (control) se analizó en sueros recolectados de pacientes infectados con *H. pylori* con gastritis.

7.11 Serología

El análisis serológico de la proteína purificada CTB-multiHp se evaluó mediante ELISA. La proteína CTB-multiHp reaccionó con el suero humano probado. La tasa positiva de anticuerpos IgG contra la proteína CTB-multiHp, en sueros de pacientes con gastritis,

úlceras gástricas, úlceras pépticas, cáncer gástrico y donantes sanos fue de 100% (5/5), 100% (5/5), 80% (4/5), 80% (4/5) y 0% (0/3), respectivamente. Además, se demostró que las proteínas CTB-multiHp y CTB-ureB₁₄₈₋₁₉₈ reaccionaron con sueros de humanos infectados con *H. pylori*. Los títulos de anticuerpos fueron mayores a CTB-multiHp en comparación con CTB-ureB₁₄₈₋₁₉₈. Las proteínas recombinantes no reaccionaron a los sueros de humanos negativos a *H. pylori* (Fig. 13E).

7.12 Cuantificación de endotoxinas en línea celular de monocitos humanos THP-1

Se midió la secreción *in vitro* de IL-1 β , IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α e INF- γ mediante células THP-1 (diferenciadas) tratadas con proteínas CTB-multiHp o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈, y el adyuvante como control se incubó durante 10 h. Se observó una secreción significativa de estas citocinas principalmente a 2,5 μ g/mL de concentración de proteína en comparación con células con CTB (Fig. 14). Las concentraciones de citocinas fueron mucho más altas en el grupo CTB-multiHp que en los grupos CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ y CTB, por lo que CTB-multiHp induce una respuesta más fuerte. En las células THP-1 estimuladas con CTB-multiHp, la concentración neta de citoquina fue de 40 pg/mL de IL-1 β , 16 pg/mL de IL-8, 200 pg/mL de INF- γ , y 100 pg/mL de TNF- α (Fig. 14A, 14B, 14E, 14F). Sin embargo, se detectaron cantidades deficientes de IL-10 (4 pg/mL) y MCP-1 (5 pg/mL) (Fig. 14C, 14D).

7.13 Respuesta de anticuerpos específicos

La respuesta inmune de los gerbos de Mongolia inmunizados por vía oral con las proteínas CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ se evaluó en suero, moco intestinal y bilis. Luego, se recolectaron muestras después de la inmunización y después de la infección para detectar IgA, IgG e IgM específicas del antígeno mediante ELISA. Se evidenció un aumento significativo en la respuesta inmune inducida por CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈. En general, la producción de anticuerpos de CTB-multiHp siempre fue mayor que CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ y éste a su vez fue mayor que el control. Como se muestra en la figura 15, en el suero la producción de IgG fue sustancialmente mayor que la de IgA e IgM. Además, la producción de IgG, la producción de IgM en todos los grupos mostró una respuesta sostenida. En el moco intestinal, los niveles de IgA, IgG e IgM aumentaron significativamente en todos los grupos y no mostraron diferencias significativas antes y después del desafío. Además, hay una buena respuesta de IgA en la bilis que se mantiene a

lo largo del tiempo. Estos hallazgos indican que la administración oral de CTB-multiHp recombinante o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ puede inducir inmunidad mucosa específica e inmunidad sistémica en gerbos.

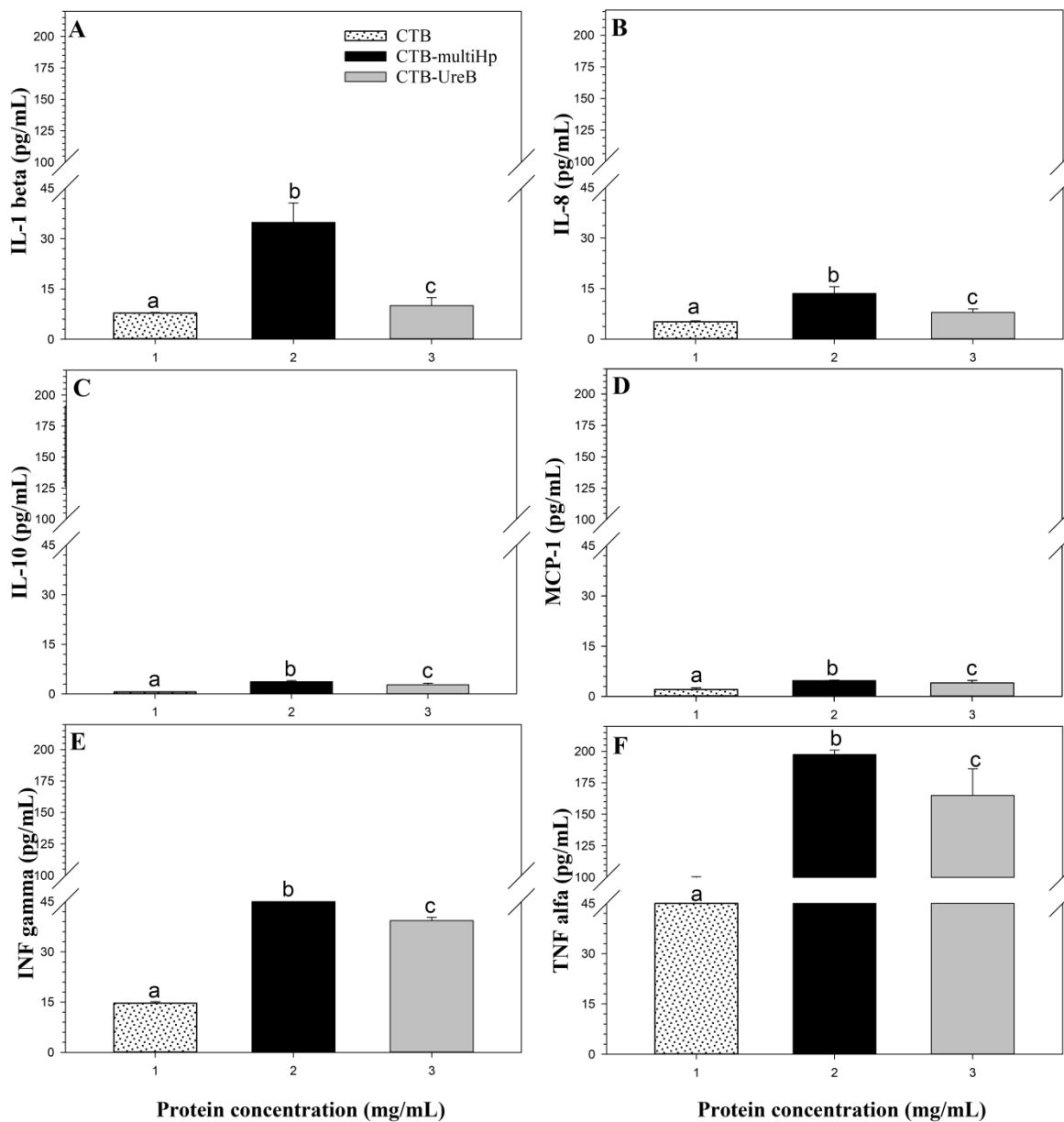


Figura 14. Gráfico que representa la cantidad de citocinas en células de macrófagos THP-1 seguido de exposición a proteínas CTB-multiHp o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈. Los niveles de (A) IL-1 β , (B) IL-8, (C) IL-10, (D) MCP-1, (E) INF- γ , (F) TNF- γ , se midieron mediante ELISA. Los resultados se muestran como media \pm SE. Barra 1: células no estimuladas, barra 2: células tratadas con 2.5 μ g/L de CTB-multiHp, barra 3: células tratadas con 2.5 μ g/mL de CTB-ureB₁₄₈₋₁₉₈. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Las medias con superíndice diferentes letras difieren significativamente (P < 0.05).

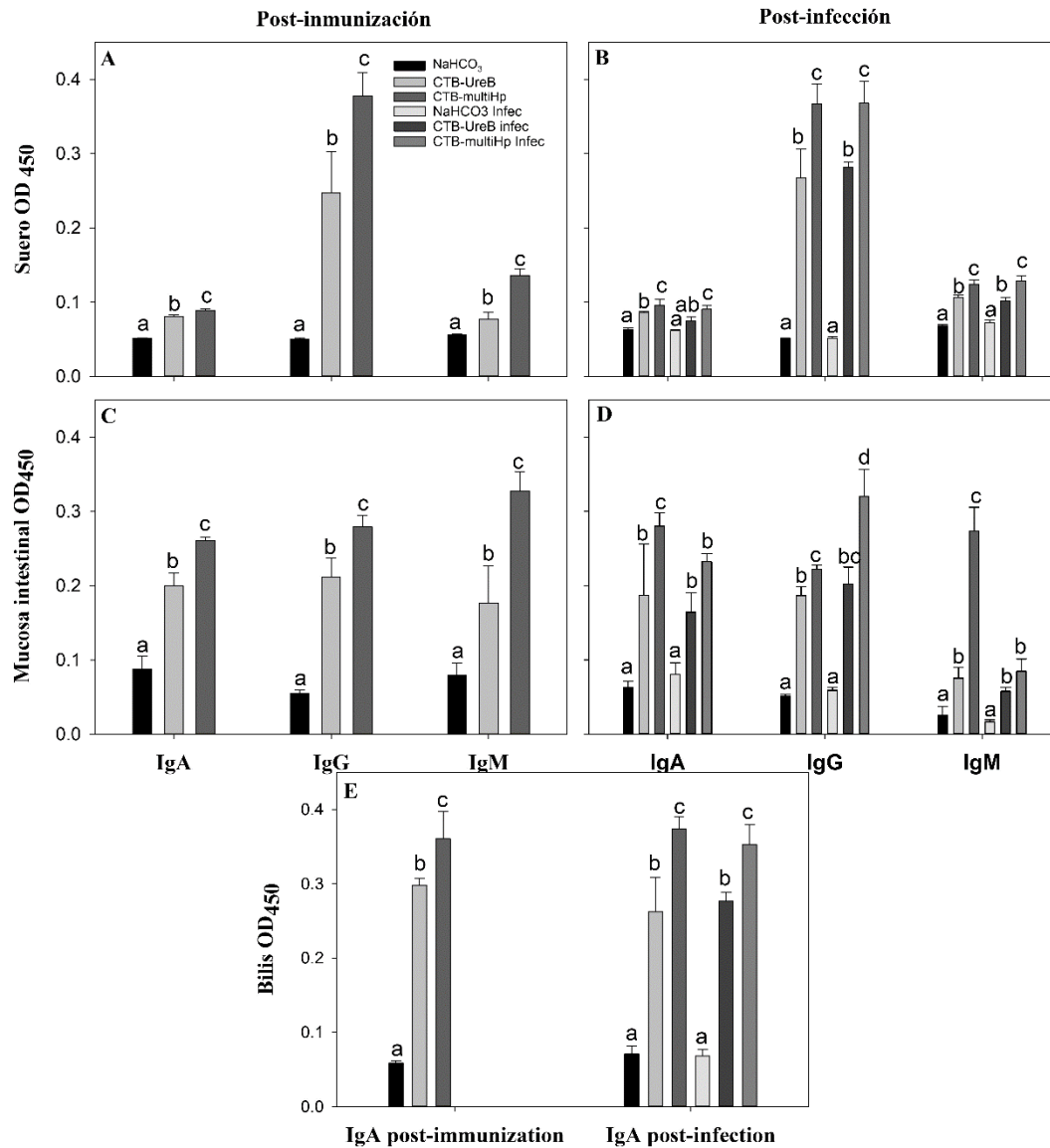


Figura 15. Respuesta específica de anticuerpos en suero, mucosa intestinal y bilis de gerbos de Mongolia inmunizados con CTB-multiHp o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈. Bicarbonato de sodio (como control), y luego infectados con *H. pylori* J99. (A) Respuesta específica (IgA, IgG, IgM) en suero posterior a la inmunización. (B) Respuesta específica (IgA, IgG, IgM) en el suero posterior a la infección. (C) Respuesta específica (IgA, IgG, IgM) en la mucosa intestinal posterior a la inmunización. (D) Respuesta específica (IgA, IgG, IgM) en la mucosa intestinal posterior a la infección. (E) Respuesta específica (IgA) en bilis posterior a la inmunización infección. Se ilustran las medias y las desviaciones estándar de las unidades de absorbancia por ELISA. Grupos de 3 o 6 columnas, en cada subfigura por separado, denotadas por una letra diferente, difieren significativamente por ANOVA de una vía y el análisis post-hoc HSD de Tukey a $p < 0.05$.

7.14 Histopatología e infección con *H. pylori*

Para determinar si la inmunización con CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ recombinante induce inflamación gástrica, el estómago de gerbos se evaluó mediante histología 10 días después de la última inmunización, y luego 30 días después de la infección con *H. pylori* (Fig. 16). Después de la inmunización, la evaluación histológica no reveló cambios en la mucosa gástrica de los gerbos inmunizados con CTB-multiHp o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ o bicarbonato de sodio, es decir, no hubo evidencia de inflamación post-inmunización. Después de la infección, se observó una marcada diferencia en la patología gástrica entre animales protegidos e infectados. En general, los gerbos en el grupo control de infección tenían una patología gástrica mayor que los grupos CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ y CTB-multiHp. En el grupo vacunado con CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈, solo uno de los gerbos infectados tenía una inflamación leve, mientras que los gerbos vacunados con CTB-multiHp no tenían inflamación gástrica. Además, mediante histología los resultados mostraron una mayor reducción en la colonización de *H. pylori* en gerbos vacunados con CTB-multiHp que con CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ (Fig. 17). El nivel de protección fue calculado, y para el grupo vacunados con CTB-multiHp fue de 83.3% y de 33.3% con CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈. No se observó efecto de protección para el grupo control de bicarbonato de sodio. Por lo tanto, éstos relevantes resultados mostraron que la vacunación profiláctica con CTB-multiHp proporcionó una mejor protección para el estómago del gerbo.

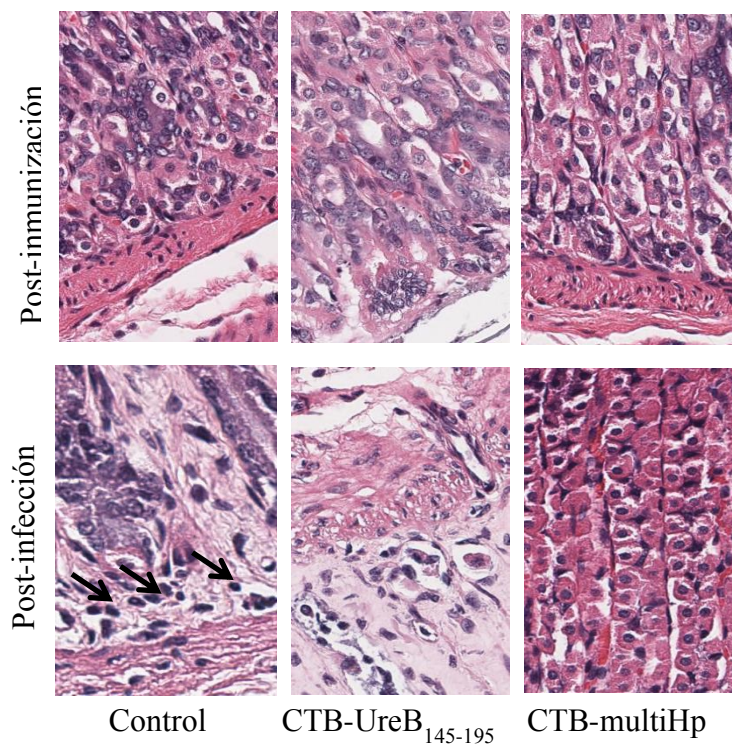


Figura 16. Secciones teñidas con hematoxilina y eosina de las mucosas gástricas de Gerbos de mongolia después de la inmunización. control (bicarbonato de sodio) o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₅ o CTB-multiHp, y después de la infección con *H. pylori*. Las flechas indican la presencia de células mononucleares. La evaluación histológica fue realizada por un patólogo con experiencia en que desconocía la identidad de los grupos. Imágenes a gran aumento (200x).

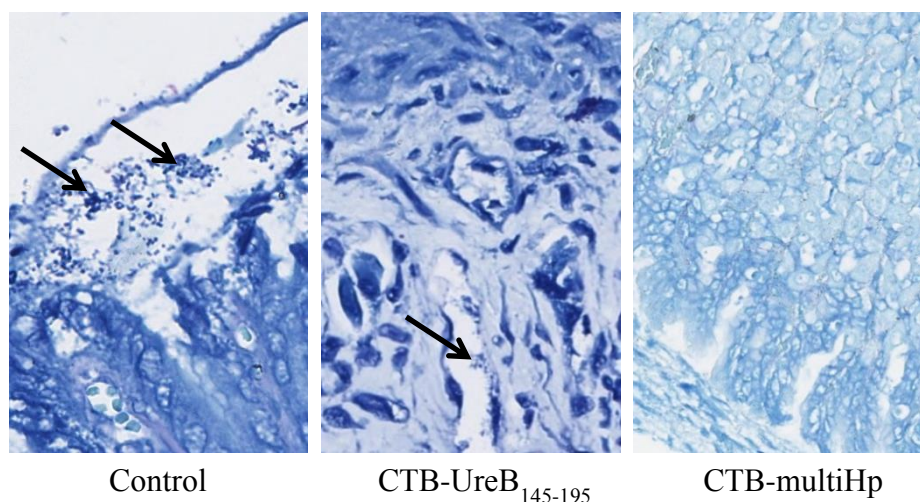


Figura 17. Identificación de *H. pylori* en la mucosa gástrica de Gerbos de Mongolia vacunados con control (bicarbonato de sodio) o CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₅ o CTB-multiHp y post-desafío con *H. pylori* J99. La presencia de la bacteria (flecha) fue realizada por un patólogo con experiencia que desconocía la identidad de los grupos. Secciones de mucosa gástrica teñidas con Giemsa, aumento de (200x).

8. DISCUSIÓN

Se han realizado considerables esfuerzos para desarrollar una vacuna eficaz contra *H. pylori*, aunque hasta ahora con un éxito limitado. Más de dos décadas de investigación intensiva de la vacuna contra *H. pylori* han identificado varios obstáculos importantes; estos son la compleja patogenicidad y la gran variabilidad de *H. pylori* que hacen del desarrollo de vacunas un desafío importante (Talebi, 2016).

Debido a la tremenda complejidad de *H. pylori*, diseñamos una vacuna que considera la interferencia con mecanismos clave de patogenicidad. Vacunas multietapa ha sido una estrategia efectiva en patógenos complicados (Cabrera-Mora *et al.*, 2016), por lo tanto, una vacuna multietapa contra *H. pylori* podría ser una manera de inducir una inmunidad protectora efectiva. La evidencia indica que es necesario incluir múltiples antígenos de fuerte protección para desarrollar vacunas contra *H. pylori* (Czinn y Blandchard, 2011). En consecuencia, para nuestro diseño, se seleccionaron siete antígenos inmunoprotectores principales involucrados en las diferentes etapas de la patogénesis de *H. pylori*. En la etapa de adhesión y colonización, se seleccionaron ureasa B, HspA y HpaA. Urease B ha sido ampliamente investigado como un posible antígeno para el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas (Wang *et al.*, 2010). Se cree que la HspA es esencial para la actividad de la ureasa y la colonización bacteriana, la investigación también indica que la HspA presenta fuertes propiedades antigénicas y confiere inmunidad protectora (Schauer *et al.*, 2010). HpaA está presente en la superficie bacteriana; es esencial para la colonización bacteriana y se considera un candidato de antígeno vacunal (Nyström y Svennerholm, 2007). En el segundo paso de evasión y atenuación, NapA; se asocia con lesión de la mucosa gastroduodenal grave y cáncer gástrico; es un potente inmunomodulador, un antígeno protector y una vacuna prometedora candidata (Amedei *et al.*, 2006). En la tercera etapa de invasión y daño se eligieron GGT, CagA y VacA. La GGT se asocia con el desarrollo de úlceras pépticas, la inducción de apoptosis y necrosis de las células epiteliales gástricas y es un componente de vacuna prometedor (Zhang *et al.*, 2015). CagA y VacA son esenciales en la patogénesis de *H. pylori*. CagA es uno de los elementos clave en una vacuna contra *H. pylori* ya que es producido por cepas asociadas con las manifestaciones más graves de enfermedad gástrica (Junaid *et al.*, 2016; Stein *et al.*, 2013).

Para el mejor diseño de una vacuna, se deben elegir los antígenos conservados (Gori *et al.*, 2013). De acuerdo con los resultados, las secuencias antigénicas de UreB, HspA, HpaA, GGT y NapA fueron altamente conservadas; sin embargo, CagA y VacA fueron variables. Estas variaciones en los genes están asociadas con variaciones geográficas específicas en todo el mundo, por lo que la población de *H. pylori* podría subdividirse en siete grupos principales. Además, se ha propuesto el uso de secuencias de consenso para minimizar las diferencias genéticas entre las cepas (Ashraf *et al.*, 2016). Por lo tanto, realizamos una secuencia de consenso para CagA y VacA utilizando cepas de *H. pylori* representativas de los grupos principales. Este mismo principio se ha aplicado con éxito a otros patógenos complejos (Abidi *et al.*, 2013; Badamchi-Zadeh *et al.*, 2016).

Recientemente, las vacunas basadas en epítomos representan una opción prometedora para el control de *H. pylori* (Zhou *et al.*, 2009). La identificación precisa de epítomos es un paso clave en la construcción de una vacuna de epítomos, y se están explorando nuevos métodos de combinación de epítomos en el diseño de vacunas (Hajighahramani *et al.*, 2016). Utilizamos una combinación de múltiples servidores, como RANKPEP, ProPred, NetMHC y otros con diferentes algoritmos para lograr péptidos de unión más precisos, que se unen a diferentes alelos de MHCI y MHCII. La combinación de los resultados de varios algoritmos aumenta la precisión general de la predicción. Además, algunos de nuestros epítomos predichos coinciden con los epítomos validados experimentalmente (Liu *et al.*, 2011). Estos resultados fortalecieron el valor predictivo de las herramientas de bioinformática utilizadas aquí para la selección de epítomos.

Por otro lado, en el diseño de una vacuna de epítomos, se ha demostrado que varios factores influyen en su éxito general en la inducción de una respuesta inmune contra la secuencia peptídica deseada. Para el diseño de nuestra vacuna se tomaron en cuenta el orden de los epítomos, los adyuvantes, los enlazadores y la orientación, entre otros.

En este estudio decidimos diseñar una vacuna que fusionara epítomos. Las vacunas de proteína de fusión representan una forma de elevar la respuesta inmune específica contra componentes multi-antigénicos. Sin embargo, varios estudios han demostrado que varias disposiciones de secuencias de aminoácidos pueden afectar las propiedades de las proteínas (Liu *et al.*, 2011). Por lo tanto, se han propuesto algoritmos para optimizar el orden de los

epítomos y estos se han utilizado en el diseño de la vacuna contra *H. pylori* (Moss *et al.*, 2011). Debido a que el orden de los epítomos afecta la inmunogenicidad y la protección inmunitaria, fue necesario realizar un reordenamiento de los epítomos en nuestro diseño con el propósito de crear una proteína de fusión útil. Además, se realizó el ordenamiento de los epítomos mediante el programa vaccineCAD para crear una secuencia inmunogénica óptima y no crear epítomos no intencionados.

Las vacunas con múltiples epítomos a menudo son poco inmunogénicas y requieren ser acopladas a adyuvantes. Por lo tanto, se usó CTB como adyuvante inmunitario para aumentar la inmunogenicidad en el diseño de nuestra vacuna multi-epítomo contra *H. pylori*. CTB, el componente no tóxico de la toxina del cólera es un adyuvante fuerte, que se puede usar como un inmunógeno (Stratman 2015); muchos experimentos han demostrado que es seguro como componente de la vacuna en humanos. Por lo tanto, CTB es uno de los adyuvantes ideales para la mucosa que muchos grupos de investigación han utilizado en las vacunas de epítomos contra *H. pylori* (Li *et al.*, 2016).

Una mejora en el diseño de vacunas es a través del uso de secuencias espaciadoras especializadas. La fusión en tándem de epítomos y el adyuvante apropiado sin enlaces puede dar lugar a la generación de una nueva proteína con otras características (Shamriz *et al.*, 2016). Con el fin de disminuir la interacción entre CTB y epítomos de *H. pylori*, un segmento de aminoácidos KK se utilizó como espaciador en los sitios de enlace entre ellos. Los espaciadores de GPGPG también se incorporaron entre los epítomos de *H. pylori* para producir secuencias con inmunogenicidad de unión minimizada y, por lo tanto, permitan la construcción racional del diseño de vacunas de múltiples epítomos. Además, otros diseños de vacunas contra *H. pylori* han utilizado con éxito enlaces para evitar la generación de nuevos epítomos en los sitios de enlace (Mojammad *et al.*, 2016; Moss *et al.*, 2011).

La orientación también tiene un alto impacto en la funcionalidad, especialmente cuando las proteínas de fusión requieren un terminador específico (Zhao *et al.*, 2007). En este estudio, construimos una vacuna llamada CTB-multiHp compuesta por el adyuvante de la mucosa CTB ubicado en el amino terminal, múltiples antígenos de *H. pylori* en el medio y la señal de retención DDEL en la RE agregada en el carboxilo terminal.

Por otro lado, las características inmunológicas, fisicoquímicas y estructurales de la vacuna se evaluaron utilizando herramientas bioinformáticas. Nuestros resultados sugirieron que la vacuna predicha en este estudio es un antígeno fuerte, lo que indica una buena probabilidad de ser una vacuna inmunogénica. Nuestra proteína quimérica demostró ser soluble, lo cual es un requisito esencial de muchas investigaciones bioquímicas y funcionales. El peso molecular fue el esperado de ~ 40.9 kDa, que proporciona información sobre la longitud completa de expresión de la proteína. El análisis de la estructura secundaria de la proteína juega un papel clave en la predicción de la estructura terciaria. El conocimiento de las estructuras tridimensionales (3-D) de las proteínas diana es esencial para el diseño racional de la vacuna. Pronosticamos la estructura 3D de la proteína CTB-multiHp usando varias herramientas informáticas estructurales. La precisión del modelo 3D final depende de la calidad de la alineación de la consulta con la plantilla. La estructura 3D de CTB-multiHp mejoró notablemente después de todos los procesos de refinación y mostró una estabilidad deseable basada en las predicciones del diagrama de Ramachandran.

Cabe resaltar que diseñamos una vacuna contra *H. pylori* considerando las características ideales de una vacuna. Según varios autores, una vacuna ideal debería ser segura, eficaz, universal y conferir un alto nivel de protección (Levine 2011). Nuestra proteína quimérica podría ser una vacuna protectora y efectiva porque consideramos interferir con los mecanismos clave de la patogénesis de *H. pylori* e incluir múltiples antígenos para mejorar la protección inmune fuerte. La vacuna CTB-multiHp podría ser universal porque los antígenos conservados y otros antígenos necesarios fueron elegidos para hacer una secuencia de consenso a partir de cepas de *H. pylori* representativas en el mundo. CTB-multiHp podría ser una vacuna segura porque se basa en tecnología recombinante, además de en epítomos que no permiten la participación de organismos patógenos.

Un enfoque atractivo para desarrollar vacunas seguras se basa en proteínas recombinantes que se expresaron. La tecnología recombinante permite que los antígenos se produzcan sin la participación del organismo patógeno. Hoy en día, la optimización del codón aumenta la eficiencia transcripcional y de traducción para alcanzar un alto nivel de expresión de la proteína recombinante (Gustafsson *et al.*, 2004). En este estudio, aunque utilizamos una secuencia optimizada para un sistema eucariótico, la proteína CTB-multiHp se expresó

correctamente en *E. coli* como una proteína soluble. Seguramente, la optimización del codón para *E. coli* aseguraría una mayor expresión de la proteína CTB-multiHp en el sistema de *E. coli*. La presencia de la etiqueta His 6x facilitó la purificación de la proteína de fusión para su uso en el análisis posterior.

Una de las primeras vías para la validación de la vacuna candidata consiste en la detección de la inmuno-reactividad a través de análisis serológico. En el caso de *H. pylori*, los individuos infectados producen grandes cantidades de anticuerpos específicos de inmunoglobulina G de larga duración en el suero. Debido a esto, los anticuerpos IgG son considerados como los más importantes. En este estudio, por ELISA se detectó anticuerpos IgG frente a CTB-multiHp en sueros de pacientes infectados por *H. pylori*. Los resultados mostraron que 80 a 100% del suero de pacientes infectados con *H. pylori* reaccionaron positivos frente a CTB-multiHp. Por lo tanto, la proteína CTB-multiHp recombinante expresada fue reconocida por anticuerpos en individuos clasificados clínicamente, mientras que ninguno de los donantes sanos (control negativo) mostró reactividad. El análisis serológico discutido aquí indicó que la proteína CTB-multiHp pudo mostrar inmuno-reactividad. Además, varios autores han revelado que una inducción significativa de respuestas inmunes humorales puede ser importante en el desarrollo de vacunas (Ikewaki *et al.*, 2000). En el presente estudio, nuestro análisis serológico mostró un fuerte y significativo aumento de los títulos de anticuerpos inducidos por CTB-multiHp y CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ en sueros de pacientes infectados con *H. pylori*. Esto es consecuente con las investigaciones donde los epítomos de las proteínas de *H. pylori* como Ureasa B, HpaA inducen una fuerte respuesta humoral. Además, examinamos la respuesta del anticuerpo anti-CTB-multiHp específico de CTB-multiHp. Al realizar la inmunodetección de proteínas recombinantes, el suero anti-CTB-multiHp reaccionó con la proteína CTB-multiHp mostrando solo una banda, como con la proteína CTB-ureB₁₄₈₋₁₉₈. Esto se explica, debido a que CTB-UreB₁₄₈₋₁₉₈ (diseñado como un control CTB-multiHp) tiene el adyuvante CTB y un fragmento multi-epítomo de Ureasa B que coincide con los epítomos en CTB-multiHp. Los resultados demostraron que la proteína CTB-multiHp purificada pudo responder al suero del ratón inmunizado, así como al suero de pacientes infectados con *H. pylori*, y esto refuerza el hecho de que CTB-multiHp es inmunogénico.

La proteína CTB-multiHp está compuesta por epítomos de siete proteínas importantes de *H. pylori* (CagA, VacA, Urease, GGT, NapA, HpaA y HspA). Por lo tanto, esto nos llevó a preguntarnos si el anticuerpo anti-CTB-multiHp reconocería a estas siete proteínas de *H. pylori*. Por lo tanto, se realizó un ensayo de inmunotransferencia y se detectaron bandas de proteínas, de diversos pesos moleculares y reactivas con anti-CTB-multiHp, en la cepa de *H. pylori*. Debido a que la inmunotransferencia solo permite la identificación presuntiva de proteínas de *H. pylori*, se realizó la prueba ELISA para identificar proteínas y tener certeza. Entonces, se demostró que el anticuerpo anti-CTB-multiHp reconocía las siete proteínas de *H. pylori*. Pero entonces, ¿los anticuerpos producidos contra los epítomos de CTB-multiHp podrían tener la capacidad de inhibir o neutralizar la actividad de *H. pylori*? Sobre esto, algunos estudios han demostrado que los epítomos de las proteínas de *H. pylori* inducen anticuerpos neutralizantes (Liu *et al.*, 2004). Por esta razón, se evaluó el potencial efecto neutralizante para algunas proteínas de *H. pylori* como, HpaA, VacA y ureasa. La adhesina HpaA es una hemaglutinina y se detecta cuando se mezcla en una suspensión de eritrocitos y se observa la aglutinación de los glóbulos rojos (Niehues *et al.*, 2010). Se generó un anticuerpo anti-CTB-multiHp y su eficacia se probó en experimentos *in vitro*, como la inhibición del ensayo de hemaglutinación. Anti-CTB-multiHp inhibió la hemaglutinación de *H. pylori* con glóbulos rojos humanos, y curiosamente, el título de inhibición de la hemaglutinación fue muy fuerte. Esto indica que el suero anti-CTB-multiHp contiene anticuerpos específicos contra el epítomo HpaA₇₇₋₉₉ para bloquear la adherencia de *H. pylori* a los glóbulos rojos humanos, que se espera que tenga un efecto protector contra *H. pylori*. La citotoxina VacA se caracteriza por su capacidad para provocar la vacuolización celular en células de cultivo, por lo general, la formación de vacuolización se mide mediante un ensayo de rojo neutro (Liu *et al.*, 2004). Utilizamos el anticuerpo anti-CTB-multiHp para contrarrestar a VacA, la cual que indujo a las células AGS a producir vacuolas celulares *in vitro*. Curiosamente, el anti-CTB-multiHp pudo inhibir la vacuolización de las células AGS y de esta manera contrarrestar eficazmente la toxicidad de VacA. Esto sugiere que los anti-CTB-multiHp contienen suficientes anticuerpos específicos de los epítomos VacA₆₃₋₈₁, ₉₁₋₁₀₉ para obstaculizar la vacuolización en las células por *H. pylori*. Además, la ureasa de *H. pylori* neutraliza el pH ácido hidrolizando la urea en amonio (Li *et al.*, 2008). Se sabe que los anticuerpos monoclonales de la ureasa pueden inhibir la actividad enzimática, mientras

que los anticuerpos policlonales específicos de la ureasa no (Moriyama *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2010). Sin embargo, los anticuerpos policlonales inducidos por epítomos específicos de la ureasa pueden inhibir la actividad de la ureasa (Guo *et al.*, 2012). Para probar el efecto de los anticuerpos inducidos por CTB-multiHp, se realizó una prueba de neutralización de la ureasa. La inhibición por los anticuerpos anti-CTB-multiHp fue dependiente de la dosis, lo que indica que los anticuerpos de los epítomos Ureasa B₁₄₈₋₁₅₈, B₁₅₇₋₁₈₀, B₁₈₈₋₁₉₈ tienen la capacidad de inhibir la actividad de la ureasa. Los epítomos de HpaA, VacA y Urease B, que forman parte de la proteína quimérica CTB-multiHp, se seleccionaron con respecto a la fuerza de unión y la mayor posibilidad de generar una respuesta inmune; sin embargo, la selección de epítomos no se determinó en función del sitio activo de la proteína. Algunos autores han informado sobre dos posibles mecanismos para la inhibición de las actividades de *H. pylori*; uno implica la unión de anticuerpos al sitio activo y el otro implica actividades de supresión a través de un efecto alostérico (Guo *et al.*, 2014). En consecuencia, la inhibición de las actividades de *H. pylori* por los anticuerpos anti-CTB-multiHp podría ser causada por un impedimento alostérico. Además, los autores han argumentado que los anticuerpos específicos y los anticuerpos neutralizantes de los factores de virulencia clave de *H. pylori* podrían tener un efecto protector durante la infección por *H. pylori* (Guo *et al.*, 2017). De acuerdo con las actividades contra *H. pylori* evaluadas aquí, la inhibición de la actividad de la ureasa podría desestabilizar el microentorno de *H. pylori*, el efecto antiadhesivo de *H. pylori* por HpaA podría ayudar a eliminar *H. pylori* y el efecto neutralizante de VacA podría evitar la invasión de la mucosa y daños por *H. pylori*. Además, sería muy interesante evaluar después los posibles efectos inhibidores de otras proteínas como CagA, NapA, GGT y HspA por anticuerpos anti-CTB-multiHp.

Por otro lado, se sabe que la infección por *H. pylori* puede llegar a producir la secreción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Blosse *et al.*, 2018). Algunos de los principales antígenos de virulencia de *H. pylori*, como CagA, NapA, Urease, HpaA, HspA, están relacionados con la secreción de citocinas proinflamatorias, o en el caso de VacA y GGT para la secreción de citocinas antiinflamatorias (Chen *et al.*, 2013; Wilson y Crabtree *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha informado que diferentes epítomos del mismo antígeno de *H. pylori* pueden tener diferentes respuestas proinflamatorias o antiinflamatorias (Shi *et al.*, 2007). La vacuna CTB-multiHp está formada por epítomos de las proteínas *H. pylori* más

representativas, como CagA, VacA, NapA, GGT, ureasa, HspA y HpaA. A pesar de esto, es importante saber si CTB-multiHp será suficientemente capaz de inducir una respuesta celular.

En este estudio, verificamos si CTB-multiHp tiene la capacidad de activar macrófagos para la producción de citocinas. Por lo tanto, determinamos la secreción *in vitro* de IL-1 β , TNF- α , IL-8, MCP-1, IFN- γ e IL-10 en células THP-1 (diferenciadas) tratadas con la proteína recombinante CTB-multiHp. IL-1 β y TNF- α son importantes citocinas proinflamatorias; La IL-1 β tiene un papel crucial al comienzo de la respuesta inmunitaria contra *H. pylori*, al igual que el TNF- α es uno de los reguladores clave de la inflamación (Hitzler *et al.*, 2012; Senthilkumar *et al.*, 2011). En el presente estudio, encontramos niveles significativos de IL-1 β y TNF- α en células THP-1 tratadas con CTB-multiHp, lo que concuerda con los informes anteriores sobre el requerimiento de estas citocinas para el control eficiente de la infección por *H. pylori* (Luo *et al.*, 2013). La IL-8 causa el reclutamiento de neutrófilos y desempeña un papel importante en el progreso de la respuesta inflamatoria (Gottipati *et al.*, 2015). Aquí informamos que para todos los tratamientos las concentraciones netas de IL-8 fueron bajas, pero con aumentos significativos. Esto demuestra que la proteína CTB-multiHp estimula la secreción de IL-8 en células THP-1 y también podría tener implicaciones importantes en la respuesta contra *H. pylori*. En contraste con las citocinas proinflamatorias anteriores, detectamos niveles ligeramente aumentados de MCP-1 en células THP-1 tratadas con CTB-multiHp. MCP-1 es un quimioatrayente para monocitos / macrófagos y linfocitos, que está implicado en el proceso de inflamación (Tonouchi *et al.*, 2002). Sin embargo, los cambios en la producción de MCP-1 aún son controvertidos, los estudios han informado que las expresiones altas de MCP-1 sugieren un papel en la protección (Mita *et al.*, 2008), mientras que otros estudios aseguran que los niveles altos de MCP-1 no están asociados con protección contra *H. pylori* (Garhart *et al.*, 2003). Por lo tanto, MCP-1 tendría una función intrincada durante la infección por *H. pylori*. Por otro lado, INF- γ es un indicador sobresaliente porque varios estudios han demostrado que las respuestas de citocinas INF- γ más fuertes están asociadas a la protección (Abadi *et al.*, 2018; Guo *et al.*, 2017; Milani *et al.*, 2015). En este estudio, informamos niveles más altos de producción de INF- γ en células diferenciadas con THP-1 estimuladas con CTB-multiHp, lo que podría ser un posible indicador de la protección de CTB-multiHp contra *H. pylori*.

Otra citoquina es la IL-10; es antiinflamatorio, suprime la secreción de citocinas proinflamatorias y tiene un papel en la infección persistente por *H. pylori* (Sánchez-Zauco *et al.*, 2017). En este estudio, la concentración de IL-10 se incrementó ligeramente en todos los tratamientos. En este sentido, los estudios en macrófagos tratados con *H. pylori* han informado un aumento o disminución de los niveles de IL-10, por lo que los cambios en el nivel de IL-10 son intrigantes porque tienen un papel complicado durante la infección con *H. pylori* (García-Castillo *et al.*, 2018). Como pudimos ver, todas las concentraciones de IL-1 β , TNF- α , IL-8 e IFN- γ , MCP-1 e IL-10 aumentaron significativamente en las células THP-1 (diferenciadas) tratadas con la proteína CTB-multiHp.

Se sabe que una clave importante para el desarrollo de vacunas contra *H. pylori* es inducir una respuesta efectiva de las células T CD4 + (Sayi *et al.*, 2009). Por lo tanto, previamente diseñamos la vacuna CTB-multiHp utilizando epítopos de células T CD4 + y epítopos de células B. En general, las células T CD4 + se polarizan a los auxiliares de las células T (Th1 o Th2 o Th17) de acuerdo con el perfil de citocinas (Milani *et al.*, 2015). Por lo que, la respuesta Th1 produce TNF- α , IL-2, IFN- γ ; La respuesta Th2 produce IL-4, IL-5, IL-10; La respuesta de Th17 produce IL-17, IL-22; Treg produce IL-10, TGF- β (Wang *et al.*, 2010). A este respecto, el IFN- γ también actúa sobre las células B para inducir anticuerpos IgG (Zarei *et al.*, 2017). Sin embargo, sigue siendo incierto cuál de las respuestas jugaría un papel crucial en la protección contra *H. pylori*. Durante mucho tiempo, se ha aceptado que una respuesta Th2 protege contra *H. pylori* (Ikewaki *et al.*, 2000). En este sentido, algunos autores han informado que una respuesta Th1 es necesaria para el desarrollo de una vacuna contra la infección por *H. pylori* (Guo *et al.*, 2014). Otras investigaciones han demostrado que las respuestas Th1 y Th2 están correlacionadas con la protección (Shi *et al.*, 2007). Inclusive, los informes han sugerido que una mezcla de las respuestas Th1, Th2 y Th17 contribuyen a la erradicación de *H. pylori* (Guo *et al.*, 2017). Por lo tanto, la respuesta de diversas células T podría estar involucrada en la protección. En el presente estudio, los perfiles de citocinas Th1 (IL-1 β , TNF- α , IL-8, MCP-1, IFN- γ) y Th2 (IL-10, IFN- γ) fueron todos inducidos significativamente por macrófagos THP-1 células tratadas con CTB-multiHp o CTB-ureB₁₄₈₋₁₉₈. Cabe señalar que, para este estudio, la respuesta Th17 no está confirmada y necesita más investigación. Por esta razón, los resultados indican que CTB-

multiHp y CTB-ureB₁₄₈₋₁₉₈ indujeron una respuesta inmune de Th1/Th2 mixta *in vitro*, que podría avanzar hacia la protección contra *H. pylori*.

Por otro lado, se ha documentado que la administración de una vacuna contra *H. pylori* por sonda oral puede inducir respuestas inmunes humorales y locales específicas de la mucosa (Lv *et al.*, 2014). En nuestros experimentos, la administración de CTB-multiHp por inmunización intragástrica indujo una respuesta inmune humoral específica y sistémica. Algunos autores han revelado que gerbos vacunados protegidos aumentaron los anticuerpos IgG séricos (Jeremy *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la producción de IgG en suero fue importante, lo que puede estar fuertemente relacionado con la protección. Asimismo, observamos una respuesta de la mucosa local con altos niveles de IgA, IgG e IgM, además de esta una buena respuesta IgA en la bilis. En este sentido, los estudios han sugerido que la IgA secretora producida localmente puede inhibir la infección y colonización por *H. pylori* (Zhou *et al.*, 2017). Igualmente, la respuesta biliar de IgA brinda mejores herramientas para que el animal reaccione contra este patógeno (Ruiz-Bustos *et al.*, 2000). La inmunidad mucosa juega un papel vital en la batalla contra la infección por *H. pylori*. Aquí, encontramos que la inmunización intragástrica con la proteína CTB-multiHp pudo inducir altos niveles de anticuerpos específicos IgA, IgG e IgM. El análisis de la respuesta celular en los animales vacunados antes y después de la infección con *H. pylori* será importante estudiar más adelante. La protección inmunitaria profiláctica de CTB-multiHp puede ser mediada por IgG séricos específicos y anticuerpos IgA, IgG, IgM en la mucosa y posiblemente una respuesta mixta de células Th1-Th2.

Adicionalmente, se ha informado que la protección inmune efectiva está asociada con una fuerte respuesta inflamatoria. En el presente estudio se reveló que después de la vacunación, no hubo inflamación gástrica y treinta días después de la infección en los grupos vacunados tampoco hubo inflamación gástrica. Sin embargo, la falta de patología gástrica en los gerbos vacunados es indicativa de protección contra la infección, en oposición a la eliminación de la carga bacteriana después del establecimiento de la infección (Jeremy *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2018). En este estudio, los resultados histológicos mostraron una mayor reducción en la colonización de *H. pylori* en gerbos vacunados con CTB-multiHp en comparación al grupo control. Por lo tanto, la inducción de una protección

significativa contra *H. pylori* se asoció también con una reducción concomitante en la patología gástrica. De esta manera, se logró constatar que gerbos de Mongolia pueden protegerse en un 83.3% de la infección provocada por *H. pylori* J99 mediante la vacunación intragástrica profiláctica con CTB-multiHp. No obstante, diversos autores han sugerido a las vacunas contra *H. pylori* con un nivel de protección superior al 80% como candidatos prometedores (Guo *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2008), por lo cual CTB-multiHp se perfila como una vacuna prometedora contra la infección por *H. pylori*. Aunado a esto, los estudios de vacunas en modelos animales y voluntarios humanos indican que el adyuvante, las dosis y la vía de administración desempeñan un papel crucial en la inducción de una respuesta inmune protectora (Wu *et al.*, 2008). Debido a esto, son necesarios más estudios para evaluar si la eficacia de la vacuna puede además ser incrementada al incorporar diferentes estrategias de vacunación, a fin de simplificar y optimizar las estrategias de vacunación actuales.

9. CONCLUSIONES

En este estudio, se diseñó y construyó una vacuna multiantigénica, multiestado y multi-epítopo contra *H. pylori* nombrada “CTB-multiHp”. La cual, probó ser inmunoreactiva e inmunogénica, además pudo inducir anticuerpos que inhibieron la actividad de Ureasa, HpaA y VacA. CTB-multiHp generó una respuesta específica humoral y celular, no ocasionó daño histopatológico y promovió una reducción importante de la colonización por *H. pylori* en la mucosa gástrica. Por lo tanto, la hipótesis planteada inicialmente es aceptada.

10. LITERATURA CITADA

Abidi, S. H., A. Shahid, L. S. Lakhani, M. R. Khanani, P. Ojwang, N. Okinda, R. Shah, F. Abbas, S. Rowland-Jones, S. Ali. 2013. Population-specific evolution of HIV Gag epitopes in genetically diverged patients. *Infect Genet Evol*, 16 (1): 78-86.

Alm, R.A., L. S. L. Ling, D. T. Moir, B. L. King, E. D. Brown, P. C. Doig, P. J. Tummino. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 397:176-180.

Amedei, A., A. Capon, G. Codolo, A. Cabrelle, A. Polenghi, M Benagiano, E. Tasca, A. Azzurri, M. Milco, G. Del Prete, M de Bernard. 2006. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J clin invest*. 116(4):1092-1101.

Andersen L.P., T. Wadstrom. 2001 Basic bacteriology and culture. En: Mobley HLT, G.L Mendz y S.L. Hazell. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington, DC: ASM Press. 27-38.

Ardito, M. J. Fueyo, R. Tassone, F. Terry, K. DaSilva, S. Zhang, W. Martin, A. S. De Groot, S. F. Moss, L. Moise. 2011. An Integrated Genomic and Immunoinformatic Approach to *H. pylori* Vaccine Design. *Immunome. Res.* 7(2).

Argenziano G., G. Donnarumma, M.R. Iovene, P. Arnese, M.A. Baldassarre, A. Baroni. 2003. Incidence of anti-*Helicobacter pylori* and anti-CagA antibodies in rosacea patients. *Int J Dermatol*. 42:601-604.

Asahi A., T. Nishimoto, Y. Okazaki, H. Suzuki, T. Masaoka, Y. Kawakami, Y. Ikeda, M. Kuwana. 2008. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocyte Fcγ receptor balance toward inhibitory FcγRIIB in immune thrombocytopenic purpura patients. *J Clin Invest*. 118:2939-2949.

Ashraf, N. M., M. Bilal, M. S. Mahmood, A. Hussain, M. Z. Mehboob. 2016. *In-silico* analysis of putative HCV epitopes against Pakistani human leukocyte antigen background: An approach towards development of future vaccines for Pakistani population. *Infect Genet Evol*. 43:58-66.

Avasthi, T.S., S. H. Devi, T. D. Taylor, N. Kumar, R. Baddam, S. Kondo, N. Ahmed. 2011. Genomes of Two Chronological Isolates (*Helicobacter pylori* 2017 and 2018) of the West African *Helicobacter pylori* Strain 908 Obtained from a Single Patient. *J Bacteriol*. 193:3385-3386.

Backert, S., Y. Yamaoka. 2016. *Helicobacter pylori* Research. Springer. Primera edicion. Japan. 601p.

Badamchi-Zadeh, A., P. F. McKay, B. T. Korber, G. Barinaga, A. A. Walters, A. Nunes, J. P. Gomes, F. Follmann, J. S. Tregoning, R. J. Shattock. 2016. Multi-component Prime-

- Boost Vaccination regimen with a consensus MOMP antigen enhances *Chlamydia trachomatis* clearance. *Front Immunol.* 7.
- Blanchard T., J. Nedrud. 2012. Laboratory maintenance of *Helicobacter* species. *Curr Protoc Microbiol.* suplemento 24.
- Blanchard, T.G., S.J. Czinn. 2015. Current Status and Prospects for a *Helicobacter pylori* Vaccine. *Gastroenterol Clin North Am.* 44(3):677-689.
- Blosse, A., P. Lehours, K. T. Wilson, A. P. Gobert. 2018. *Helicobacter*: Inflammation, immunology, and vaccines. *Helicobacter.* 23:e12517.
- Brookes, R. H., J. Hakimi, Y. Ha, S. Aboutorabian, S. F. Ausar, M. Hasija, N. Rahman. 2014. Screening vaccine formulations for biological activity using fresh human whole blood. *Hum Vaccin Immunother.* 10(4):1129-1135.
- Cabrera-Mora, M., J. A. Fonseca, B. Singh, C. Zhao, N. Makarova, I. Dmitriev, D. T. Curiel, J. Blackwell, A. Moreno. 2016. A Recombinant Chimeric Ad5/3 Vector Expressing a Multistage *Plasmodium* Antigen Induces Protective Immunity in Mice Using Heterologous Prime-Boost Immunization Regimens. *J Immunol.* 197(7):2748-2761.
- Carlsohn, E., J. Nyström, I. Bölin, C.L. Nilsson, A.M. Svennerholm. 2006. HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. *Infect. Immun.* 74(2):920-926.
- Carter T.F.P., J. Frankson, B. Pintard. Edgecombe. 2011. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in adults in the Bahamas. *West Indian Med. J.* 60:662-665.
- Chen Y., M.J. Blaser. 2008. *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *J Infect Dis.* 198:553-60.
- Chen, L., Li, B., Yang, W.C., He, J.L., Li, N.Y., Hu J., Y. F. He, S. Yu, Z. Zhao, P. Luo, J. Y. Zhang, H. B. Li, M. Zeng, D. S. Lu, B. S. Li, H. Guo, S. M. Yang, G. Guo, X. H. Mao, W. Chen, C. Wu, Q. M. Zou. 2013. A Dominant CD4+ T-Cell Response to *Helicobacter pylori* Reduces Risk for Gastric Disease in Humans. *Gastroenterology.* 144(3): 591-600.
- Chester M.A. 1998. IUPAC-IUB joint commission on biochemical nomenclature (JCBN) nomenclature of glycolipids. *Eur. J. Biochem.* 257:293-298.
- Conteduca, V., D. Sansonno, G. Lauletta, S. Russi, G. Ingravallo, F. Dammacco. 2013. *H. pylori* infection and gastric cancer: state of the art. *Int J Oncol.* 42(1):5-18
- Czinn S.J., T. Blanchard. 2011. Vaccinating against *Helicobacter pylori* infection. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8(3):133-140.
- Del Giudice G., A. Covacci J.L. Telford C. Montecucco R. Rappuoli. 2001. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Ann Rev. Immunol.* 19(1):523-563.
- Del Giudice, G., P. Malfertheiner, R. Rappuoli. 2009. Development of vaccines against *Helicobacter pylori*. *Expert Rev Vaccines* 8(8):1037-1049.

Dellon E.S., A.F. Peery, N.J. Shaheen. 2011. Inverse association of esophageal eosinophilia with *Helicobacter pylori* based on analysis of a US pathology database. *Gastroenterol.* 141:1586-92.

Donati, M., S. Moreno, E. Storni, A. Tucci, L. Poli, C. Mazzoni, O. Varoli, V. Sambri, A. Farencena, R. Cevenini. 1997. Detection of serum antibodies to CagA and VacA and of serum neutralizing activity for vacuolating cytotoxin in patients with *Helicobacter pylori*-induced gastritis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 4(4):478-482.

Dubitzky, W., O. Wolkenhauer, H. Yokota, K.H. Cho. 2013. *Encyclopedia of systems biology.* Springer Publishing Company, Incorporated.

Elseweidy, M. M. 2012. *Helicobacter pylori* Infection and Its Relevant to Chronic Gastritis. *Current Topics in Gastritis*, 40.

El-Zimaity, H. M., D.Y. Gham. 1999. Evaluation of gastric mucosal biopsy site and number for identification of *Helicobacter pylori* or intestinal metaplasia: role of the Sydney System. *Hum Pathol.* 30:72-77.

Ferlay, J., I. Soerjomataram, M. Ervik, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers. 2013. *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11.* Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

Fischer, W., L. Windhager, S. Rohrer, M. Zeiller, A. Karnholz, R. Hoffmann, R. Haas. 2010. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: genome evolution driven by a novel type IV secretion system and genomic island transfer. *Nucleic Acids Res* 38:6089-6101.

Franceschi F., A. Tortora, G. Gasbarrini, A. Gasbarrini. 2014. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Helicobacter.* 19(s1):52-58.

Gangwer K.A., D.J. Mushrush, D.L. Stauff, B. Spiller, M.S. McClain, T.L. Cover, D.B. Lacy. 2007. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proc Natl Acad Sci.* 104(41):16293-16298.

Garcia-Castillo, V., H. Zelaya, A. Ilabaca, M. Espinoza-Monje, R. Komatsu, L. Albarracín, H. Kitazawa, A. Garcia-Cancino, J. Villena. 2018. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Benef. Microbes.* 9(5):829-841.

Garhart, C. A., F. P. Heinzl, S. J. Czinn, J. G. Nedrud. 2003. Vaccine-induced reduction of *Helicobacter pylori* colonization in mice is interleukin-12 dependent but gamma interferon and inducible nitric oxide synthase independent. *Infect. Immun.* 71(2):910-921.

Garza-González, E., G.I. Perez-Perez, H.J. Maldonado-Garza, F.J. Bosques-Padilla. 2014. A review of *Helicobacter pylori* diagnosis, treatment, and methods to detect eradication. *World J Gastroenterol.* 20(6):1438.

Gisbert, J.P., J.M. Pajares. 2004. 13C-urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection - a critical review. *Aliment Pharmacol.* 20:1001-1017.

- Gobert, A.P., Y. Cheng, J. Y. Wang, J. L. Boucher, R. K. Iyer, S. D. Cederbaum, R. A. Casero, J. C. Newton, K. T. Wilson. 2002. *Helicobacter pylori* induces macrophage apoptosis by activation of arginase II. *J. Immunol.* 168(9):4692-4700.
- Goh, K.L., W.K. Chan, S. Shiota, Y. Yamaoka. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter.* 2011(16):1-9.
- Gong, C., Y. Li, M. Li, J. Luo, H. Cao, M. Long. 2007. B-cell epitope mapping of *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. En: *Frontiers in the Convergence of Bioscience and Information Technologies, 2007. FBIT 2007 (261-264p).* IEEE.
- Goodwin, C.S., J.A. Armstrong, B.J. Marshall. 1986. *Campylobacter pyloridis*, gastritis, and peptic ulceration. *J. Clin. Pathol.* 39:353-365
- Gori, A., R. Longhi, C. Peri, G. Colombo. 2013. Peptides for immunological purposes: design, strategies and applications. *Amino Acids.* 45(2):257-268.
- Gottipati, K. R., S. K. Bandari, M. W. Nonnenmann, J. L. Levin, G. P. Dooley, S. J. Reynolds, V. Boggaram. 2015. Transcriptional mechanisms and protein kinase signaling mediate organic dust induction of IL-8 expression in lung epithelial and THP-1 cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 308: L11-L21.
- Guo, L., R. Yin, G. Xu, X. Gong, Z. Chang, D. Hong, H. Liu, S. Ding, X. Han, Y. Li, F. Tang, K. Liu. 2017. Immunologic properties and therapeutic efficacy of a multivalent epitope-based vaccine against four *Helicobacter pylori* adhesins (urease, Lpp20, HpaA, and CagL) in Mongolian gerbils. *Helicobacter.* 22(6):e12428.
- Guo, L., R. Yin, K. Liu, X. Lv, Y. Li, X. Duan, Y. Chu, T. Xi, Y. Xing. 2014. Immunological features and efficacy of a multi-epitope vaccine CTB-UE against *Helicobacter pylori* in BALB/c mice model. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:3495-3507.
- Guo, L., H. Yang, F. Tang, R. Yin, H. Liu, X. Gong, K. Liu. 2017. Oral immunization with a multivalent epitope-based vaccine, based on NAP, Urease, HSP60, and HpaA, provides therapeutic effect on *H. pylori* infection in mongolian gerbils. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:349.
- Guo, Y., H. Wang, Y. Li, Y. Song, C. Chen, Y. Liao, M. Chen. 2012. Genome of *Helicobacter pylori* Strain XZ274, an Isolate from a Tibetan Patient with Gastric Cancer in China. *J Bacteriol.* 194:4146-4147.
- Gustafsson, C., S. Govindarajan, J. Minshull. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol.* 22 (7):346-353.
- Haghighi, M., A. M. Mobarez, A. H. Salmanian, M. Moazeni, M. R. Zali, Sadeghi M, Amani J. 2013. *In silico* experiment with an-antigen-toll like receptor-5 agonist fusion construct for immunogenic application to *Helicobacter pylori*. *Indian J Hum Genet.* 19(1):43-53.

- Hajjghahramani, N., N. Nezafat, M. Eslami, M. Negahdaripour, S. S. Rahmatabadi, Y. Ghasemi. 2016. Immunoinformatics analysis and *in silico* designing of a novel multi-epitope peptide vaccine against *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol.* 48:83-94.
- Harris, P., G. Perez-Perez, A. Zylberberg, A. Rollán, C. Serrano, F. Riera, H. Einisman, D. García, P. Viviani. 2005. Relevance of adjusted cut-off values in commercial serological immunoassays for *Helicobacter pylori* infection in children. *Dig Dis Sci.* 50:2103-2109.
- He, C., M. Chen, J. Liu, Y. Yuan. 2014. Host genetic factors respond to pathogenic step-specific virulence factors of *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis *Mutat. Res-Rev Mut.* 759:14-26.
- Hirschl, A.M., A. Makristathis. 2007. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicobacter.* 2007(12):6-11
- Hitzler, I., A. Sayi, E. Kholer, D. B. Engler, K. N. Koch, W. D. Hardt, A. Müller. 2012. Caspase-1 has both proinflammatory and regulatory properties in *Helicobacter* infections, which are differentially mediated by its substrates IL-1 β and IL-18. *J. Immunol.* 188(8):3594-3602.
- Hnatyszyn, A., K. Wielgus, M. Kaczmarek-Rys, M. Skrzypczak-Zielinska, M. Szalata, J. MikolajczykStecyna, J. Stanczyk, I. Dziuba, A. Mikstacki, R. Slomski. 2013. Interleukin-1 gene polymorphisms in chronic gastritis patients infected with *Helicobacter pylori* as risk factors of gastric cancer development. *Arch Immunol Ther. Exp.* 61:503-512
- Huang, X., B. Xu, G. Duan, C. Song. 2013. The rOmp22-HpaA Fusion Protein Confers Protective Immunity Against *Helicobacter pylori* in Mice. *Current microbiology.* 67(4):487-492.
- Huang, X., X. Qu, W. Yan, Y. Huang, M. Cai, B. Hu, L. Wu, H. Lin, Z. Chen, C. Zhu, L. Lu, X. Sun, L. Rong, Y. Jiang, D. Sun, L. Zhong, P. Xiong. 2010. Iron deficiency anaemia can be improved after eradication of *Helicobacter pylori*. *Postgrad Med J.* 86:272-278.
- Ikewaki, J., A. Nishizono, T. Goto, T. Fujioka, K. Mifune. 2000. Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol. Immunol.* 44(1):29-39.
- Jang, S., E. J. Bak, J. H. Cha. 2017. N-acetylcysteine prevents the development of gastritis induced by *Helicobacter pylori* infection. *J. Microbiol.* 55:396-402.
- Jeremy, A., H., T. Y. Du, M. F Dixon, P. A. Robinson, J. E. Crabtree, 2006. Protection against *Helicobacter pylori* infection in the Mongolian gerbil after prophylactic vaccination. *Microbes and infection,* 8(2):340-346.
- Junaid, M., A. K. Linn, M. B. Javadi, S. Al-Gubare, N. Ali, G. Katzenmeier. 2016. Vacuolating cytotoxin A (VacA)—A multi-talented pore-forming toxin from *Helicobacter pylori*. *Toxicon.* 118:27-35.

Kawai, M., Y. Furuta, K. Yahara, T. Tsuru, K. Oshima, N. Handa, I. Uchiyama. 2011. Evolution in an oncogenic bacterial species with extreme genome plasticity: *Helicobacter pylori* East Asian genomes. *BMC Microbiol.* 11:104.

Kozireski-Chuback. D., G. Wu, R.W. Ledeen. 1999. Developmental appearance of nuclear GM1 in neurons of the central and peripheral nervous systems. *Dev. Brain Res.* 115:201-208.

Lee, S. K., A. Stack, E. Katzowitsch, S.I. Aizawa, S. Suerbaum, C. Josenhans. 2003. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes Infect.* 5:1345-1356

Levine, M.M. 2011. "IDEAL" vaccines for resource poor settings. *Vaccine* 29:D116-D125.

Li, G.F., Y. Wang, Z. S. Zhang, X. J. Wang, M. J. Ji, X. Zhu, F. Liu, X. P. Cai, H. W. Wu, G. L. Wu. 2005. Identification of Immunodominant Th1-type T cell Epitopes from *Schistosoma japonicum* 28 kDa Glutathione-S-transferase, a Vaccine Candidate. *Acta Bioch Bioph Sin.* 37(11):751-758.

Li, H. B., J.Y. Zhang, Y.F. He, L. Chen, B. Li, K.Y. Liu, C. Wu. 2012. Systemic immunization with an epitope-based vaccine elicits a Th1-biased response and provides protection against *Helicobacter pylori* in mice. *Vaccine.* 31(1):120-126.

Li, H. X., X. H. Mao, Y. Shi, Y. Ma, Y. N. Wu, W. J. Zhang, P. Luo, S. Yu, W. Y. Zhou, Y. Guo, C. Wu, G. Guo, Q. M. Zou. 2008. Screening and identification of a novel B-cell neutralizing epitope from *Helicobacter pylori* UreB. *Vaccine.* 26(52):6945-6949.

Li, Y., Z. Chen, J. Ye, L. Ning, J. Luo, L. Zhang, Y. Jiang, Y. Xi, Y. Ning. 2016. Antibody Production and Th1-biased Response Induced by an Epitope Vaccine Composed of Cholera Toxin B Unit and *Helicobacter pylori* Lpp20 Epitopes. *Helicobacter.* 21:234-248.

Ling, S. S. M., K. G. Yeoh, B. Ho. 2013. *Helicobacter pylori* γ -glutamyl transpeptidase: A formidable virulence factor. *World J. Gastroenterol.* 19(45):8203-8210.

Liu, K.Y. Y. Shi, P. Luo, S. Yu, L. Chen, Z. Zhao, X.H. Mao, G. Guo, C. Wu, Q. M. Zou. 2011. Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model. *Vaccine* 29(38):6679-6685.

Liu, W., Z. Peng, Z. Liu, Y. Lu, J. Ding, Y. H. Chen. 2004. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine.* 23(3):366-371.

Liu, X. L., S. Q. Li, C. J. Liu, H. X. Tao, Z. S. Zhang. 2004. Antigen epitope of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin A. *World. J. Gastroenterol.* 10(16):2340-2343.

Lloyd, R. A., D. A. McClellan. 2011. Update on the evaluation and management of functional dyspepsia. *Am Fam Physician.* 83:547-552.

- Lozano, J. M., M. E. Patarroyo. 2007. A rational strategy for a malarial vaccine development. *Microb Infect.* 9(6):751-760.
- Luo, J. J., C. Y. Li, S. Liu, W. Yu, S. Y. Tang, H. L. Cai, Y. Zhang. 2013. Overexpression of *Helicobacter pylori* VacA N-terminal fragment induces proinflammatory cytokine expression and apoptosis in human monocytic cell line through activation of NF- κ B. *Can. J. Microbiol.* 59(8):523-533.
- Lv, X., J. Yang, H. Song, T. Li, L. Guo, Y. Xing, T. Xi. 2014. Therapeutic efficacy of the multi-epitope vaccine CTB-UE against *Helicobacter pylori* infection in a Mongolian gerbil model and its microRNA-155-associated immuno-protective mechanism. *Vaccine.* 32(41):5343-5352.
- Malfertheiner P., F. Megraud, C.A. O'Morain, J. Atherton, A.T. Axon, F. Bazzoli, G.F. Gensini, J.P. Gisbert, D.Y. Graham, T. Rokkas, E.M. El-Omar, E.J. Kuipers. 2012. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV Florence. Consensus Report. *Gut.* 61:646-664.
- Malfertheiner, P., V. Schultze, B. Rosenkranz, S.H. Kaufmann, T. Ulrichs, D. Novicki, D. Tornese. 2008. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: a phase I study. *Gastroenterol.* 135(3):787-795.
- Mane, S.P., M. G. Dominguez-Bello, M. J. Blaser, B. W. Sobral, R. Hontecillas, J. Skoneczka, S. Shallom. 2010. Host-Interactive Genes in Amerindian *Helicobacter pylori* Diverge from Their Old World Homologs and Mediate Inflammatory Responses. *J Bacteriol* 192:3078-3092.
- Marshall, B.J., J.R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1:1311-1315.
- Méndez-Tenorio, A., V. Larios-Serrato, G. E. Olguín-Ruiz, C. J. Sánchez-Vallejo, R. C. Torres-López, F. Avilés-Jiménez, M. Camorlinga-Ponce, J. Torres. 2014. Genome sequence of a *Helicobacter pylori* strain isolated from a Mexican patient with intestinal gastric cancer. *Genome Announc.* 2(1):e01214-13.
- Mentis, A., P. Lehours, F. Mégraud. 2015. Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 20:1-7.
- Milani, M., Y. Sharifi, M. Rahmati-Yamchi, M. H. Somi, A. Akbarzadeh. 2015. Immunology and vaccines and nanovaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Expert. Rev. Vaccines.* 14(6):833-840.
- Mita, M., M. Satoh, A. Shimada, M. Okajima, S. Azuma, J. S. Suzuki, S. Himeno. 2008. Metallothionein is a crucial protective factor against *Helicobacter pylori*-induced gastric erosive lesions in a mouse model. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294(4):G877-G884.
- Mohammad, N., N. Mohammad, M. T. Karsabet, J. Amani, A. Ardjmand, M. R. Zadeh, M. K. Gholi, M. Saffari, A. Ghasemi. 2016. *In Silico* Design of a Chimeric Protein Containing

Antigenic Fragments of *Helicobacter pylori*; A Bioinformatic Approach. Open Microbiol J. 10(1):97-112.

Moise, L., J. A. McMurry, J. Pappo, D. S. Lee, S. F. Moss, W. D. Martin, A. S. De Groot. 2008. Identification of genome-derived vaccine candidates conserved between human and mouse-adapted strains of *H. pylori*. Hum Vaccin. 4(3):219-223.

Moreno-Altamirano, M.M.B., I. Aguilar-Carmona, F.J. Sánchez-García. 2007. Expression of GM1, a marker of lipid rafts, defines two subsets of human monocytes with differential endocytic capacity and lipopolysaccharide responsiveness. Immunology. 120:536-543.

Morihara, F., R. Fujii, E. Hifumi, A. Nishizono, T. Uda. 2007. Effects of vaccination by a recombinant antigen ureB138 (a segment of the beta-subunit of urease) against *Helicobacter pylori* infection. J Med Microbiol. 56(Pt 6):847-53.

Moss, S. F., L. Moise, D. S. Lee, W. Kim, S. Zhang, J. Lee, A. B. Rogers, W. Martin, A. S. De Groot. 2011. HelicoVax: Epitope-based therapeutic *H. pylori* vaccination in a mouse model. Vaccine 29(11):2085-2091.

Naz, A., F. M. Awan, A. Obaid, S. A. Muhammad, R. Z. Paracha, J. Ahmad, A. Ali. 2015. Identification of putative vaccine candidates against *Helicobacter pylori* exploiting exoproteome and secretome: A reverse vaccinology based approach Infection. Infect Genet Evol. 32:280-291.

Niehues, M., M. Euler, G. Georgi, M. Mank, B. Stahl, A. Hensel. 2010. Peptides from *Pisum sativum* L. enzymatic protein digest with anti-adhesive activity against *Helicobacter pylori*: Structure-activity and inhibitory activity against BabA, SabA, HpaA and a fibronectin-binding adhesin. Mol. Nutr. Food Res. 54(12):1851-1861.

Noto, J.M., R.M. Peek. 2012. *Helicobacter pylori*: an overview. Methods Mol. Biol. 921:7-10.

Nyström, J., A.-M. Svennerholm. 2007. Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. Vaccine 25(14):2591-2598.

O'Toole, P. W., M. C. Lane, S. Porwollik. 2000. *Helicobacter pylori* motility. Microbes Infect. 2:1207-1214.

O'connor, A., J. P. Gisbert, C. O'morain, S. Ladas. 2015. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2015. *Helicobacter*. 20:54-61.

Oh, J. D., H. Kling-Bäckhed, M. Giannakis, J. Xu, R. S. Fulton, L. A. Fulton, E. R. Mardis. 2006. The complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter pylori* strain: Evolution during disease progression. Proc Natl Acad Sci USA 103:9999-10004.

Olsen, L. G., L. Zhang, D. B. Keskin, E. L. Reinherz, V. Brusica. 2011. Conservation Analysis of Dengue Virus T-cell Epitope-Based Vaccine Candidates Using Peptide Block Entropy. Front Immunol. 2:69.

- Onishchenko, K., S. Hill, M. Wasserman, C. Jones, M. Moffatt, L. Ruff, S. J. Pugh. 2019. Trends in vaccine investment in middle income countries, Hum Vaccin Immunother. “En prensa”
- Park, E.K., H. S. Jung, H. I. Yang, M. C. Yoo, C. Kim, K. S. Kim. 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. Inflamm. Res. 56(1):45-50.
- Parreira, P., A. Magalhaes, C.A. Reis, T. Boren, D. Leckband, M.C. Martins. 2013. Bioengineered surfaces promote specific protein-glycan mediated binding of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Acta Biomater. 9:8885-8893.
- Pece S., G. Giuliani, A. Di Leo, D. Fumarola, S. Antonaci, E. Jirillo. 1997. Role of lipopolysaccharide and related cytokines in *Helicobacter pylori* infection. Recent Prog. Med. 88:237-241.
- Philpott, D. J., D. Belaid, P. Troubadour, J. M. Thiberge, J. Tankovic, A. Labigne. 2002. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. Cell. Microbiol. 4:285-296.
- Portal-Celhay, C., G. Perez-Perez. 2006. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. Clinical science. 110:305-314.
- Qiu, Y., Y.C. Wang, H.X. Tao, D.W. Zhan, S.L. Yuan, P. Wang, L.C. Wang, X.P. Han, C.S. Li, J.K. Li, C.J. Liu. 2010. Identification of B-cell epitopes in urease B subunit of *Helicobacter pylori* bound by neutralizing antibodies. Vaccine. 28(32):5220-5227.
- Rappuoli, R., D. Medaglini. 2014. Big science for vaccine development. Vaccine. 32(37):4705-4707.
- Rieder, G., J. L. Merchant, R. Haas. 2005. *Helicobacter pylori* cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. Gastroenterol. 128:1229-1242.
- Rimbara, E., M. Sasatsu, D.Y. Graham. 2013. PCR detection of *Helicobacter pylori* in clinical samples. Methods Mol Biol. 943:279-287.
- Rossi, G., P. Ruggiero, S. Peppoloni, L. Pancotto, D. Fortuna, L. Lauretti, F. Di Pisa. 2004. Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. Infect. Immun. 72(6):3252-3259.
- Ruiz-Bustos, E., A. Sierra-Beltran, M. J. Romero, C. Rodriguez-Jaramillo, F. Ascencio. 2000. Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunisation with *H. pylori* heparan sulphate-binding proteins coupled to cholera toxin β -subunit. J. Med. Microbiol. 49(6):535-541.
- Sampieri, C.L. 2013. *Helicobacter pylori* and gastritis: The role of extracellular matrix metalloproteases, their inhibitors, and the disintegrins and metalloproteases - A systematic literature review. Dig Dis Sci. 58:2777-2783.

- Sánchez-Zauco, N., J. Torres, A. Gómez, M. Camorlinga-Ponce, L. Muñoz-Pérez, R. Herrera-Goepfert, R. Medrano-Guzmán, S. Giono-Cerezo, C. Maldonado-Bernal. 2017. Circulating blood levels of IL-6, IFN- γ , and IL-10 as potential diagnostic biomarkers in gastric cancer: a controlled study. *BMC cancer*. 17(1):384.
- Satin B., G. Del Giudice, V. Della Bianca, S. Dusi, C. Laudanna, F. Tonello, F. Rossi. 2000. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J. Exp Med*. 191(9):1467-1476.
- Sayi, A., E. Kohler, I. Hitzler, I. Arnold, R. Schwendener, H. Rehrauer, A. Müller. 2009. The CD4+ T cell-mediated IFN-gamma response to *Helicobacter* infection is essential for clearance and determines gastric cancer risk. *J. Immunol*. 182(11):7085-7101.
- Sbai, H., A. Mehta, A. S. DeGroot. 2001. Use of T Cell Epitopes for Vaccine Development. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 1(3):303-313.
- Schauer, K., C. Muller, M. Carrière, A. Labigne, C. Cavazza, H. De Reuse. 2010. The *Helicobacter pylori* GroES cochaperonin HspA functions as a specialized nickel chaperone and sequestration protein through its unique C-terminal extension. *J. Bacteriol*. 192(5):1231-1237.
- Senthilkumar, C., S. Niranjali, V. Jayanthi, T. Ramesh, H. Devaraj. 2011. Molecular and histological evaluation of tumor necrosis factor-alpha expression in *Helicobacter pylori*-mediated gastric carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 137(4):577-583.
- Sette, A., J. Fikes. 2003. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery. *Curr Opin Immunol*. 15(4):461-470.
- Shamriz, S., H. Ofoghi, N. Moazami. 2016. Effect of linker length and residues on the structure and stability of a fusion protein with malaria vaccine application. *Comput Biol Med* 76:24-29.
- Shi, Y., C. Wu, W. Y. Zhou, X. H. Mao, G. Guo, Q. M. Zou. 2007. Identification of H-2d restricted Th epitopes in Urease B subunit of *Helicobacter pylori*. *Vaccine*. 25(14):2583-2590.
- Shiotani, A., P. Cen, D.Y. Graham. 2013. Eradication of gastric cancer is now both possible and practical. *Semin Cancer Biol*. 23:492-501.
- Sixma, T.K., K.H. Kalk, B.A.M. van Zanten, Z. Dauter, J. Kingma, B. Witholt, W.G.J. Hol. 1993. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. *J. Mol. Biol*. 230:890-918.
- Stein M., P. Ruggiero, R. Rappuoli, F. Bagnoli. 2013. *Helicobacter pylori* CagA: from pathogenic mechanisms to its use as an anti-cancer vaccine. *Front Immunol*. 15(4):328
- Stratmann, T. 2015. Cholera Toxin Subunit B as Adjuvant—An Accelerator in Protective Immunity and a Break in Autoimmunity. *Vaccines*. 3(3):579-596.

- Stubljär, D., T. Jukic, A. Ihan. 2018. How far are we from vaccination against *Helicobacter pylori* infection?. *Expert Rev Vaccines*. 17(10):935-945.
- Sun, H., H. Yuan, R. Tan, B. Li, G. Guo, J. Zhang, C. Wu. 2018. Immunodominant antigens that induce Th1 and Th17 responses protect mice against *Helicobacter pylori* infection. *Oncotarget*, 9(15):12050.
- Sutton, P., J. M. Boag. 2018. Status of vaccine research and development for *Helicobacter pylori*. *Vaccine*.
- Talebi, B. A. A. 2016. Vaccine against *Helicobacter pylori*: Inevitable approach *World. J. Gastroenterol*. 22(11):3150-3157.
- Talmadge, J.E. 2011. Immunostimulants in cancer therapy. En: Nijkamp, F.P., M.J. Parnham. (Eds.). *Principles of Immunopharmacology*. Birkhauser. Segunda edición. Alemania. 345-368.
- Testerman, T.L., J. Morris. 2014. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *W. J. Gastroenterol*. 20(36):12781-12808.
- Thompson, L.J., S.J. Danon, J.E. Wilson. 2004. Chronic *Helicobacter pylori* infection with Sydney strain 1 and a newly identified mouse-adapted strain (Sydney strain 2000) in C57BL/6 and BALB/c mice. *Infect Immun*. 72:4668-4679.
- Tomb, J. F., O. White, A. R. Kerlavage, R. A. Clayton, G. G. Sutton, R. D. Fleischmann, K. Nelson. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547.
- Tonouchi, H., C. Miki, K. Tanaka, M. Kusunoki. 2009. Profile of monocyte chemoattractant protein-1 circulating levels in gastric cancer patients. *Scand. J. Gastroenterol*. 37(7):830-833.
- Tummala S., S. Keates, C.P. Kelly. 2004. Update on the immunologic basis of *Helicobacter pylori* gastritis. *Curr. Opin. Gastroenterol*. 20:592-597.
- Veijola, L., A. Oksanen, T. Löfgren, P. Sipponen, A.L. Karvonen, H. Rautelin. 2005. Comparison of three stool antigen tests in confirming *Helicobacter pylori* eradication in adults. *Scand J Gastroenterol*. 40:395-401.
- Wang, F., W. Meng, B. Wang, L. Qiao. 2014. *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett*. 345:196-202.
- Wang, L., X. F. Liu, S. Yun, X. P. Yuan, X. H. Mao, C. Wu, W. J. Zhang, K. Y. Liu, G. Guo, D. S. Lu, W. D. Tong, A. D. Wen, Q. M. Zou. 2010. Protection against *Helicobacter pylori* infection by a trivalent fusion vaccine based on a fragment of urease B-UreB414. *J. Microbiol*. 48(2):223-228.
- Wilson, K. T., J. E. Crabtree. 2007. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterol*. 133(1):288-308.

- Wu C., Y. Shi, H. Guo, W.Y. Zou, G. Guo, Q.H. Xie, Q.M. Zou. 2008. Protection against *Helicobacter pylori* infection in mongolian gerbil by intragastric or intramuscular administration of *H. pylori* multicomponent vaccine. *Helicobacter*. 13(3):191-199.
- Yuan W., D. Li Yumin, L. Yang. 2010. Iron deficiency anemia in *Helicobacter pylori* infection: meta-analysis of randomized controlled trials. *Scand J Gastroenterol*. 45:665-676.
- Zamani, M., F. Ebrahimitabar, V. Zamani, W. H. Miller, R. Alizadeh- Navaei, J. Shokri-Shirvani, M. H. Derakhshan. 2018. Systematic review with meta- analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Alimen Pharm Ther*. 47(7):868-876.
- Zarei, M., G. Mosayebi, B. Khansarinejad, H. Abtahi. 2017. Antigenic and immunogenic evaluation of *Helicobacter pylori* FlaA epitopes. *Iran. J. Basic. Med. Sci*. 20(8):920-926.
- Zhang, H. X., Y. Y. Qiu, Y. H. Zhao, X. T. Liu, M. Liu, A. L. Yu. 2014. Immunogenicity of oral vaccination with *Lactococcus lactis* derived vaccine candidate antigen (UreB) of *Helicobacter pylori* fused with the human interleukin 2 as adjuvant. *Molecul. Cell. Probes*. 28(1):25-30.
- Zhang, S., S.F. Moss. 2012. Rodent models of *Helicobacter* infection, inflammation, and disease. En: Zhang, S., S.F. Moss (Eds.). *Helicobacter Species*. Human Press. 89-98.
- Zhang, X. J. Zhang, F. Yang, W. Wu, H. Sun, Q. Xie, W. Si, Q. Zou, Z. Yang. 2015. Immunization with Heat Shock Protein A and γ -Glutamyl Transpeptidase Induces Reduction on the *Helicobacter pylori* Colonization in Mice. *PLoS One* 10(6):e0130391.
- Zhao, H.L., C. Xue, Y. Wang, X. Y. Li, X. H. Xiong, X. Q. Yao, Z. M. Liu. 2007. Circumventing the heterogeneity and instability of human serum albumin-interferon- α 2b fusion protein by altering its orientation. *J. Biotechnol*. 131(3):245-252.
- Zhou, W.Y., Y. Shi, C. Wu, W. J. Zhang, X. H. Mao, G. Guo, H. X. Li, Q. M. Zou. 2009. Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccine*. 27(36):5013-5019.
- Zhou, Z., H. Dong, Y. Huang, S. Yao, B. Liang, Y. Xie, S. Gong. 2017. Recombinant *Bacillus subtilis* spores expressing cholera toxin B subunit and *Helicobacter pylori* urease B confer protection against *H. pylori* in mice. *J. Med. Microbiol*. 66(1):83-89.