

Análisis y predicción de epítopes T y B en proteínas de *Helicobacter pylori*: Una aproximación inicial al diseño racional de estrategias terapéuticas alternativas sin uso de antibióticos

Analysis and prediction of T and B epitopes in *Helicobacter pylori* proteins: An initial approach to the rational design of alternative therapeutic strategies without the use of antibiotics

Elkin Navarro-Quiroz^{1,3}, Roberto Navarro-Quiroz²,
Pierine España-Puccini^{3,4}, Mostapha Ahmad¹,
Margarita Rios-Anillo⁴, Valeria Olave-Jaller¹, Anderson Diaz¹

Resumen

Helicobacter pylori (H. pylori) es un bacteria de forma espiral gram negativa que se estima afecta a más de la mitad de la población mundial, estableciendo una infección crónica en el estómago, debido a diversos mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Este microorganismo se ha asociado con diversos trastornos gástricos que van desde gastritis hasta cáncer, por lo que es reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como carcinógeno clase I. Regímenes de tratamiento convencionales involucran el uso de antibióticos, y estos fracasan cada vez más en el control de la infección, debido a que H. pylori ha adquirido de forma progresiva resistencia a los compuestos utilizados, lo cual sugiere la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, lo cual implica la identificación de nuevos blancos terapéuticos. Este estudio tuvo como propósito la evaluación in silico de epítopes T y B en proteínas del *Helicobacter pylori*. Para ello fueron identificadas 22 proteínas de membrana externas de *Helicobacter pylori* Cepa 26695 con número de acceso NC_000915; en la selección se empleó la herramienta web Vaxign (disponible gratis en <http://www.violinet.org/vaxign/>), en las que se predijeron 100 epítopes (60 epítopes clases I y 40 epítopes clase II), que potencialmente podrían ser utilizados en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos de la infección por H. pylori sin uso de antibióticos.

Fecha de recepción: 22 de agosto de 2017
Fecha de aceptación: 10 de octubre de 2017

¹ Universidad Simón Bolívar, Barranquilla (Colombia).

² Universidad Cooperativa de Colombia, Santa Marta (Colombia).

³ Fundación ACCONP – E Biotechnologies

⁴ Universidad del Norte, Barranquilla (Colombia).

Correspondence: Profesor asistente, Universidad Simón Bolívar, carrera 59 n° 59-65, Tel. 300 5324251. enavarro26@unisimonbolivar.edu.co,

Abstract

Helicobacter pylori (*H. pylori*) is a gram-negative spiral bacterium, estimated to affect more than half the world population, establishing chronic infection in the stomach, due to diverse mechanisms of immune response evasion. This microorganism has been associated with various gastric disorders ranging from gastritis to cancer, and is recognized by the World Health Organization (WHO) as a class I carcinogen. Conventional treatment regimes involve the use of antibiotics and these fail every time but in the control of the infection, because *H. pylori* has progressively acquired resistance to the compounds used, suggesting the need to develop new therapeutic strategies, which implies the identification of new therapeutic targets. The present study aimed at the *in silico* evaluation of T and B epitopes in *Helicobacter pylori* proteins. For this, 22 external membrane proteins of *Helicobacter pylori* Strain 26695 with accession number NC_000915 were identified, in the selection the web tool Vaxign (was available free at <http://www.violinet.org/vaxign/>), in which they were predicted 100 epitopes (60 class I epitopes and 40 class II epitopes), which could potentially be used in the development of new therapeutic approaches to *H. pylori* infection without the use of antibiotics.

INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) fue aislado por primera vez por Warren y Marshall en 1982 (1,2); es un organismo microaerófilo, de crecimiento lento, Gram-negativo, flagelado en forma de espiral (3), presenta de dos a seis flagelos que le dan la movilidad para soportar las contracciones rítmicas en el estómago y lograr con esto penetrar en la mucosa gástrica (4). Mide alrededor de 2,4 - 4,0 µm largo y 0,5-1,0 µm de ancho (5-7).

H. pylori es una causa importante de enfermedades gástricas; numerosos estudios han demostrado que está presente en aproximadamente el 50 % de la población mundial (8,9). En países en desarrollo, la prevalencia de infección puede superar el 90 % en la edad adulta (10).

La respuesta inmunitaria inducida por la infección de *H. pylori* se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos, seguido por macrófagos, mastocitos, eosinófilos, linfocitos T y B (11,12), producción elevada de IL-1, IL-8, e IL-6, baja producción de IL-17 (13-19).

El esquema de tratamiento actual utiliza una combinación de al menos dos o tres compuestos,

que incluyen un inhibidor de la bomba de protones y dos antibióticos. Sin embargo, se ha documentado una pérdida de eficiencia de este tratamiento, principalmente por aumento progresivo en la resistencia del *H. pylori* (13,14). Por tanto, es de imperiosa necesidad desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para hacer frente a este problema a nivel mundial.

El diseño racional de vacunas a base de la predicción *in silico* de epítopes es una vía prometedora para el abordaje de esta problemática (20-22) Una posible estrategia para reducir el riesgo asociado con una vacuna de *H. pylori* y aumentar la eficiencia de la misma es el diseño y desarrollo de una vacuna compuesta por epítomos inmunogénicos de diversas proteínas de superficie. Estos péptidos portadores de epítopes candidatos deben tener características para unirse con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y/o clase II, para ser presentados a la superficie celular para el reconocimiento por linfocitos (23).

Vaxign es un sistema de diseño de vacunas en línea que predice proteínas blancas para

el diseño de vacunas basado en secuencias de genomas usando la estrategia de vacunología inversa (30) Las características predichas en Vaxign incluyen la localización subcelular de la proteína blanco y la identificación de epítopes que se unen a MHC clase I y clase II(30,31).

Este estudio tuvo por objetivo la predicción de epítopes T y B en proteínas de membrana externa de *Helicobacter pylori*; los cuales puedan ser usados en posteriores trabajos en los que se empleen inmunógenos que contengan determinantes antigénicos de diversas proteínas de este microorganismo patógeno.

METODOLOGÍA

Obtención de las secuencias genómicas de *H. pylori*

Se hizo una búsqueda de la secuencia completa de genomas de *Helicobacter pylori* en RefSeq (38) y GenBank (39).

Identificación de proteínas de membrana externa

Se identificaron proteínas de membrana externa de *H. pylori* usando PSORTb 3.0 (40) y SPAAN (41-42) El análisis topología hélice transmembrana se llevó a cabo utilizando HMMTOP optimizado (31).

Identificación de secuencias conservadas

OrthoMCL se usó para encontrar proteínas conservadas (43). El valor de E-105 se estableció como valor predeterminado para el procesamiento de OrthoMCL. Fueron descartadas todas las proteínas que pudieran tener reacciones cruzadas con proteínas humanas, de ratón y cerdo.

Predicción de epítopes

Se utilizó Vaxitop (URL: <http://www.violinet.org/vaxign/vaxitop>) calculado con un punto de corte de $p \leq 0,05$ que proporciona un punto de corte con alta sensibilidad, especificidad y equilibrado(30).

RESULTADOS

Genomas de *H. pylori*

En total fueron halladas 683 anotaciones de genomas de *Helicobacter pylori*; de estos se seleccionaron 61 secuencias de cepas que contenían genoma completo, las cuales tenían en promedio 1571 genes y 1454 proteínas (tabla 1).

Tabla 1. Genomas de cepas *H. pylori*

Strain	Assembly	Genes	Proteínas
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	GCA_000008525.1	1555	1445
<i>Helicobacter pylori</i> J99	GCA_000008785.1	1607	1469
<i>Helicobacter pylori</i> Shi470	GCA_000020245.1	1584	1442
<i>Helicobacter pylori</i> B38	GCA_000091345.1	1545	1432
<i>Helicobacter pylori</i> 51	GCA_000011725.1	1545	1433
<i>Helicobacter pylori</i> 52	GCA_000023805.1	1522	1392
<i>Helicobacter pylori</i> 908	GCA_000148665.1	1501	1360
<i>Helicobacter pylori</i> SJM180	GCA_000148855.1	1579	1488
<i>Helicobacter pylori</i> Cuz20	GCA_000148895.1	1580	1487
<i>Helicobacter pylori</i> 35 ^a	GCA_000178935.2	1530	1414

Continúa...

Strain	Assembly	Genes	Proteínas	Strain	Assembly	Genes	Proteínas
<i>Helicobacter pylori</i> India7	GCA_000185185.1	1602	1487	<i>Helicobacter pylori</i> UM298	GCA_000439295.2	1551	1440
<i>Helicobacter pylori</i> F16	GCA_000270005.1	1531	1421	<i>Helicobacter pylori</i> SouthAfrica20	GCA_000590775.1	1552	1361
<i>Helicobacter pylori</i> F57	GCA_000270065.1	1560	1456	<i>Helicobacter pylori</i> 26695-1	GCA_000829095.1	1629	1539
<i>Helicobacter pylori</i> 2017	GCA_000192315.1	1506	1382	<i>Helicobacter pylori</i> 26695-1CL	GCA_000829115.1	1628	1538
<i>Helicobacter pylori</i> 2018	GCA_000192335.1	1516	1393	<i>Helicobacter pylori</i> 26695-1CH	GCA_000829135.1	1628	1538
<i>Helicobacter pylori</i> 83	GCA_000213135.1	1562	1441	<i>Helicobacter pylori</i> BM012A	GCA_000498315.1	1632	1495
<i>Helicobacter pylori</i> Puno135	GCA_000224555.1	1585	1493	<i>Helicobacter pylori</i> BM012S	GCA_000498335.1	1632	1495
<i>Helicobacter pylori</i> Shi417	GCA_000277365.1	1586	1490	<i>Helicobacter pylori</i> oki102	GCA_000600045.1	1566	1464
<i>Helicobacter pylori</i> Shi169	GCA_000277385.1	1559	1460	<i>Helicobacter pylori</i> oki112	GCA_000600085.1	1569	1456
<i>Helicobacter pylori</i> Shi112	GCA_000277405.1	1607	1499	<i>Helicobacter pylori</i> oki128	GCA_000600125.1	1496	1364
<i>Helicobacter pylori</i> PeCan18	GCA_000277425.1	1581	1480	<i>Helicobacter pylori</i> oki154	GCA_000600145.1	1543	1412
<i>Helicobacter pylori</i> 26695	GCA_000307795.1	1632	1538	<i>Helicobacter pylori</i> oki422	GCA_000600165.1	1570	1441
<i>Helicobacter pylori</i> Rif1	GCA_000307815.1	1630	1532	<i>Helicobacter pylori</i> oki673	GCA_000600185.1	1534	1400
<i>Helicobacter pylori</i> Rif2	GCA_000307835.1	1630	1534	<i>Helicobacter pylori</i> oki828	GCA_000600205.1	1536	1399
<i>Helicobacter pylori</i> OK113	GCA_000348865.1	1553	1418	<i>Helicobacter pylori</i> oki898	GCA_000600225.1	1563	1463
<i>Helicobacter pylori</i> UM032	GCA_000392455.3	1549	1438	<i>Helicobacter pylori</i> J166	GCA_000685625.1	1569	1466
<i>Helicobacter pylori</i> UM299	GCA_000392475.3	1550	1439	<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_000685665.1	1551	1453
<i>Helicobacter pylori</i> UM037	GCA_000392515.3	1634	1509				
<i>Helicobacter pylori</i> UM066	GCA_000392535.3	1587	1474				

Continúa...

Continúa...

Strain	Assembly	Genes	Proteínas
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_000685705.1	1626	1490
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_000685745.1	1551	1452
<i>Helicobacter pylori</i> NY40	GCA_000828955.1	1643	1476
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_000817025.1	1541	1413
<i>Helicobacter pylori</i> 26695-1	GCA_000826985.1	1630	1542
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_000827025.1	1631	1542
<i>Helicobacter pylori</i> J99	GCA_000982695.1	1594	1491
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_001433495.1	1617	1451
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_001653375.1	1584	1456
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_001653395.1	1573	1441
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_001653415.1	1590	1471
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_001653435.1	1462	1353
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_001653455.1	1498	1392
<i>Helicobacter pylori</i>	GCA_001653475.1	1491	1354

Predicción de proteínas *H. pylori* candidatos a vacunas

Se seleccionó de forma arbitraria la Cepa 26695 de *Helicobacter pylori* (número de acceso NC_000915), para la cual se han descrito 1445 proteínas en la que obtuvimos 42 proteínas de membrana externa de la bacteria, con una probabilidad adhesina ≥ 0.51 , las cuales no tenían homología significativa a proteínas de cerdo, ratón o humano (tabla 2).

Tabla 2. selección de las proteínas de membrana externas de *Helicobacter pylori* conservadas, con probabilidad de adherencia ≥ 0.51

Protein Accession	Localization	Adhesin Probability
NP_206827.1	Outer Membrane	0.685
NP_207052.1	Outer Membrane	0.656
NP_207115.1	Outer Membrane	0.705
NP_207284.1	Outer Membrane	0.681
NP_207405.1	Outer Membrane	0.737
NP_207432.1	Outer Membrane	0.544
NP_207480.1	Outer Membrane	0.620
NP_207504.1	Outer Membrane	0.610
NP_207516.1	Outer Membrane	0.653
NP_207519.1	Outer Membrane	0.640
NP_207575.1	Outer Membrane	0.517
NP_207581.1	Outer Membrane	0.578
NP_207600.1	Outer Membrane	0.662
NP_207670.1	Outer Membrane	0.555
NP_207689.1	Outer Membrane	0.662
NP_207704.1	Outer Membrane	0.669
NP_207705.1	Outer Membrane	0.684
NP_207706.1	Outer Membrane	0.629
NP_207714.1	Outer Membrane	0.737
NP_208191.1	Outer Membrane	0.687
NP_208244.1	Outer Membrane	0.636
NP_208303.1	Outer Membrane	0.628

Las proteínas de membrana externa que presentaron una mayor probabilidad adhesina (0.737) fueron NP_207714.1, proteína con funciones de fusión, y NP_207405.1, proteína tipo toxina.

Predicción de epítopos MHC de clase I y II

Se usa Vaxitop (45) para predecir epítopos de unión a MHC de clase I y II. Asimismo, se usaron diferentes programas para identificar epítopos, los cuales se encuentra listados en la tabla suplementaria 1.

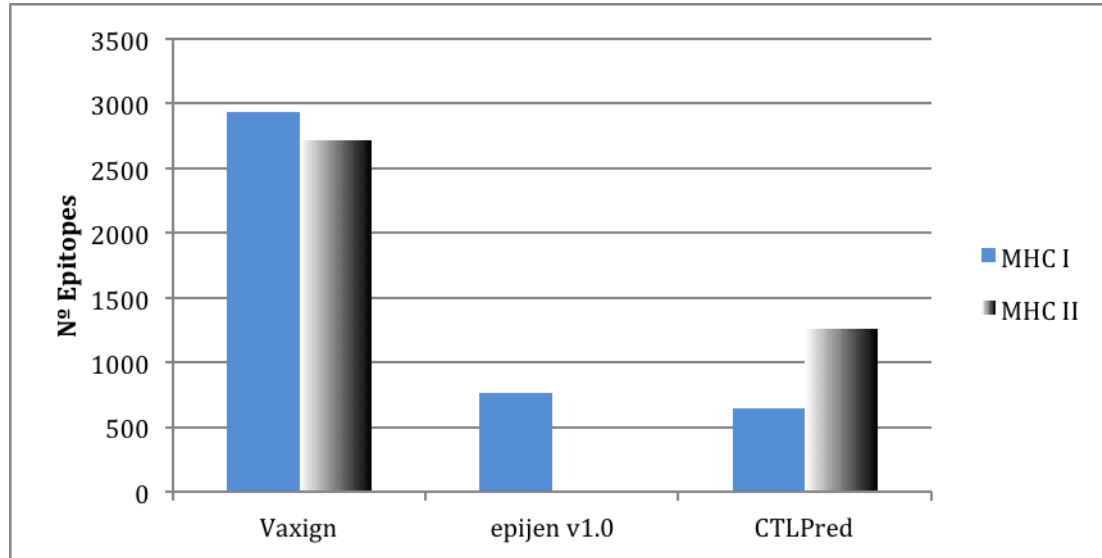


Figura 1. Número total de epitopes MHC I y MHC II predichos con diferentes software

Tabla 3. Epitopes predichos para MHC I en proteínas de *Helicobacter pylori*

Nº de acceso proteína	Epítopes	alelo MHC	aminoácido Inicial	aminoácido final	P-valor
WP_000726314.1	TTLNEACPWL	HLA-A*01:01	264	273	0.0159
	GTSWLNSQYV	HLA-A*02:01	619	628	0.0244
WP_000713712.1	LYSVYLNLYVF	HLA-A*24:02	700	709	6.50E-05
	LYSVYLNLYVF	HLA-A*24:02	734	743	6.50E-05
	SWLNSEYVNL	HLA-A*24:02	655	664	0.00732
WP_001115603	DTLVNFKSRY	HLA-A*01:01	479	488	0.00163
	QYRGFSWKIL	HLA-A*24:02	384	393	0.00022
	KALMVADLKY	HLA-A*01:01	233	242	0.0173
WP_000709741.1	ITYDTNPNFN	HLA-A*01:01	267	276	0.0777
	RVKGLSIFYK	HLA-A*03:01	168	177	0.00044
	DYKRVSIVYL	HLA-A*24:02	286	295	0.0095
WP_000822057.1	LPYGFNTDLL	HLA-B*07:02	142	151	0.00792
	FIFDMMYTYK	HLA-A*03:01	645	654	0.00013
	PGLRYTFLNY	HLA-A*01:01	465	474	0.0247
WP_001228436.1	NVFGGVINVI	HLA-A*02:01	155	164	0.0184
	GQQNYFNDFI	HLA-A*24:02	508	517	0.0009
	QLTIENFLPY	HLA-A*01:01	95	104	0.0392
	FGDNLKTINL	HLA-A*01:01	333	342	0.0134

Continúa...

ANÁLISIS Y PREDICIÓN DE EPÍTOPES T Y B EN PROTEÍNAS DE *HELICOBACTER PYLORI*: UNA APROXIMACIÓN INICIAL AL DISEÑO RACIONAL DE ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS ALTERNATIVAS SIN USO DE ANTIBIÓTICOS

Nº de acceso proteína	Epítopes	alelo MHC	aminoácido Inicial	aminoácido final	P-valor
WP_001092132.1	KSDKAALGLY	HLA-A*01:01	79	88	0.00083
	YATGRFGNFY	HLA-A*01:01	332	341	0.018
	ATYRSNVANL	HLA-B*07:02	172	181	0.00582
WP_010875534.1	LYSVYLNQVF	HLA-A*24:02	597	606	6.50E-05
	RLYSVYLNQV	HLA-A*02:01	596	605	0.0002
	ITSTGPVTDY	HLA-A*01:01	203	212	0.00057
WP_000911476.1	FYSYGDKFHL	HLA-A*24:02	150	159	0.00018
	YVLYNSYLFY	HLA-A*01:01	142	151	0.00031
	VYRGFLWGIL	HLA-A*24:02	372	381	0.00063
WP_001108275.1	YMMDANAFTV	HLA-A*02:01	401	410	2.67E-05
	AYMQVDFTL	HLA-A*24:02	67	76	0.00022
	FSADIKFEY	HLA-A*01:01	452	461	0.00023
WP_010875548.1	FYFNYQRSYI	HLA-A*24:02	540	549	0.0002
	NFTKAYQYY	HLA-A*01:01	275	284	0.00035
	QYNSYHPGTL	HLA-A*24:02	285	294	0.0016
WP_000479960.1	GLDYCGFDIY	HLA-A*01:01	677	686	0.00028
	DSLFEYGFNY	HLA-A*01:01	404	413	0.00613
	RPLRSNAIGL	HLA-B*07:02	257	266	0.0016
WP_000753173.1	FFDYNHAFIK	HLA-A*03:01	557	566	0.0174
	KQASIIITL	HLA-A*02:01	260	269	0.0244
	QELGRNPFRK	HLA-A*03:01	509	518	0.0715
WP_000592437.1	FYTKIGYKQF	HLA-A*24:02	350	359	0.00069
	LSTIGSQTNY	HLA-A*03:01	149	158	0.0477
	QTYSTQAIQY	HLA-A*03:01	206	215	0.0536
WP_000812546.1	VYLYMNSFL	HLA-A*24:02	197	206	0.00038
	NQLGNLIDLY	HLA-A*01:01	105	114	0.0159
	TYGVGTDVLY	HLA-A*01:01	410	419	0.0203
WP_001248496.1	MPRGNNTSYI	HLA-B*07:02	364	373	0.00061
	VTLAQVKVNL	HLA-A*01:01	62	71	0.0516
	MIMTTFFLYY	HLA-A*03:01	292	301	0.00064
WP_000874574.1	ALMSVSGQFV	HLA-A*02:01	1170	1179	0.00112
	GISGANGYEK	HLA-A*03:01	1214	1223	0.0193
	TTINLDDSVL	HLA-B*07:02	1097	1106	0.0241
WP_000902542.1	RYTYKDKFSF	HLA-A*24:02	605	614	0.00031
	AWCMTQHEGL	HLA-A*24:02	768	777	0.00732
	DHNVLTYFNY	HLA-A*01:01	564	573	0.00841

Continúa...

Nº de acceso proteína	Epítopes	alelo MHC	aminoácido Inicial	aminoácido final	P-valor
WP_000915379.1	YTNLSSQTNY	HLA-A*01:01	532	541	8.79E-05
	LPYNLNNIEL	HLA-B*07:02	135	144	0.00483
	LPASLFNDPQ	HLA-B*07:02	170	179	0.0212
WP_000945747.1	YYNHQNIIFY	HLA-A*24:02	191	200	0.00057
	LSRFVTNMY	HLA-A*01:01	773	782	0.00221
	TTKGERTFEY	HLA-A*01:01	32	41	0.00358

El “software” con el que se obtuvo mayor número de epítopes fue Vaxign (PSSM), con 2881 epítopes clase I y 2634 epítopes clase II (figura 1) La proteína VacA (WP_000874574.1), toxina

proteica de membrana externa, presentó mayor número de epítopes (514). Se obtuvieron 60 epítopes para MHC clase I (tabla 3) y 40 epítopes para MHC clase II (tabla 4).

Tabla 4. Epítopes para MHC clase II predichos por Vaxign para *Helicobacter pylori*

Nº de acceso	Epítopes	alelo MHC	aminoácido inicial	aminoácido final	Percentil (IEDB consensus)
WP_000726314.1	IQDNYIDSNIHSQV	HLA-DRB1*04:01	496	510	0.01
	QDNYIDSNIHSQVQ	HLA-DRB1*04:01	497	511	0.01
WP_000713712.1	ENIADTLVNFKSRYS	HLA-DRB1*13:01	475	489	0.02
	NIADTLVNFKSRYS	HLA-DRB1*13:01	476	490	0.02
WP_001115603	YAIFQRMYPAGINIT	HLA-DRB1*11:01	254	268	0.13
	FSNKYNIRMDLKLEY	HLA-DRB1*03:01	414	428	0.01
WP_000709741.1	LTPFNQVKSRTIFQL	HLA-DRB1*07:01	220	234	0.01
	NLTPFNQVKSRTIFQ	HLA-DRB1*07:01	219	233	0.01
WP_000822057.1	SFNTNYFVIFAKRY	HLA-DRB1*13:01	556	570	0.01
	FNTNYFVIFAKRYA	HLA-DRB1*13:01	557	571	0.01
WP_001228436.1	LINQNALPINYANLS	HLA-DRB1*13:01	437	451	1.52
	VATGLNYRYKHSKYS	HLA-DRB1*08:01	602	616	0.08
WP_001092132.1	QYQYEFNNLARMIA	HLA-DRB1*11:01	194	208	0.06
	QYQYEFNNLARMIAL	HLA-DRB1*11:01	195	209	0.06
WP_010875534.1	QLQYRRLYSVYLNIV	HLA-DRB1*01:01	591	605	0.09
	TQLQYRRLYSVYLNIV	HLA-DRB1*01:01	590	604	0.13
WP_000911476.1	GIKIHIDSNPKFRGL	HLA-DRB1*03:01	255	269	0.11
	EAPGIKIHIDSNPKF	HLA-DRB1*03:01	252	266	0.12
WP_001108275.1	VGYWGGLVGQKPWAS	HLA-DRB1*13:01	124	138	0.11
	WGGLVGQKPWASGCL	HLA-DRB1*13:01	127	141	0.11

Continúa...

Nº de acceso	Epítopes	alelo MHC	aminoácido inicial	aminoácido final	Percentil (IEDB consensus)
WP_010875548.1	SVNASLQINNIFNMK	HLA-DRB1*13:01	749	763	0.07
	TSTDYFQIFNVMEGG	HLA-DRB1*13:01	562	576	0.45
WP_000479960.1	VFIKLDYTIPKTGI	HLA-DRB1*03:01	652	666	0.11
	IIKLDYTIPKTGINL	HLA-DRB1*03:01	654	668	0.28
WP_000753173.1	ANFQFLFNMGVRMNL	HLA-DRB1*11:01	641	655	0.61
	NFQFLFNMGVRMNL LA	HLA-DRB1*15:01	642	656	0.88
WP_000592437.1	SQYLYSLLGAYPTKL	HLA-DRB1*01:01	82	96	0.05
	PTIYNTYYKSAGTTV	HLA-DRB1*07:01	485	499	0.2
WP_000812546.1	SQKVRFLAPLSLALS	HLA-DRB1*11:01	19	33	0.15
	QSQKVRFLAPLSLAL	HLA-DRB1*11:01	18	32	0.19
WP_001248496.1	EKYFLTSSLILLSFL	HLA-DRB1*07:01	4	18	0.01
	FIDIVTLAQVKVNLL	HLA-DRB1*11:01	58	72	0.34
WP_000874574.1	LLNFNGDRTLQNNAN	HLA-DRB1*03:01	999	1013	3.93
	QINTYTQQMSRLAKL	HLA-DRB1*01:01	2200	2214	4.16
WP_000902542.1	HRVTGSLQINNIFNM	HLA-DRB1*13:01	798	812	0.07
	TGDPSFIKSLGNLL	HLA-DRB1*07:01	217	231	0.27
WP_000915379.1	NLTNMLNMMMAVFDS	HLA-DRB1*13:01	259	273	0.01
	VIYSYRVTNLNLYVNL	HLA-DRB1*07:01	342	356	0.24
WP_000945747.1	FEYNNKMYIDRKELQ	HLA-DRB1*03:01	39	53	0.1
	MYIDRKELQQRQSNQ	HLA-DRB1*03:01	45	59	0.24

CONCLUSIONES

En este estudio se hicieron análisis en el genoma completo de *Helicobacter pylori* Cepa 26695 número de acceso NC_000915, identificamos 22 proteínas de membrana externa utilizando la herramienta web Vaxign. En dichas proteínas se predijeron un total de 60 epítopes clase I y 40 epítopes clase II. Estos epítopes podrían ser usados en el mejoramiento de las vacunas activas; para lo cual consideramos importante combinar diversos antígenos del *H. pylori*, guiando así al sistema inmune para defender al huésped contra esta bacteria. En consecuencia, este estudio fue desarrollado para prever

determinantes antigénicos / epítopes de diversas proteínas de membrana externa de *H. pylori*, en él proponemos probables epítopes de células B y células T que pueden desencadenar una respuesta inmune deseada a estas proteínas. Adicionalmente podrían ser usadas en el diseño de estrategias terapéuticas sin uso de antibióticos como la inmunización pasiva, en la que anticuerpos son administrados a los pacientes para ayudar a controlar la infección por este microorganismo; lo cual proponemos como primera línea de acción, antes del uso de antibióticos, debido a que están apareciendo en las bacterias nuevos mecanismos de resistencia, que se propagan rápidamente y

que ponen en peligro la capacidad para tratar agentes infecciosos como el *H. pylori*.

Conflicto de interés: ninguno

Financiación: recursos propios.

REFERENCIAS

1. Naz A, Awan FM, Obaid A, Muhammad SA, Paracha RZ, Ahmad J et al. Identification of putative vaccine candidates against *Helicobacter pylori* exploiting exoproteome and secretome: a reverse vaccinology based approach. *Infect Genet Evol.* Jun 2015;32:280–91. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134815001124>
2. Robin Warren J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet.* Jun 1983;321(8336):1273–5. Available: <http://www.thelancet.com/article/S0140673683927198/fulltext>
3. Tomb J-F, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Aug 1997;388(6642):539-47.*
4. Spohn G, Scarlato V, Motility, Chemotaxis, and Flagella. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics.* ASM Press; 2001. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290725>
5. Lambert JR, Lin SK, Aranda-Michel J. *Helicobacter pylori.* *Scand J Gastroenterol Suppl.* Jan 1995;208:33-46. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7777803>
6. Bauerfeind P, Garner R, Dunn BE, Mobley HL. Synthesis and activity of *Helicobacter pylori* urease and catalase at low pH. *Gut.* Jan 1997;40(1):25–30. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9155571>
7. Ha N-C, Oh S-T, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh B-H. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat Struct Biol.* Jun 2001; 8(6):505–9. Available: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/88563>
8. Torres J, Pérez-Pérez G, Goodman KJ, Atherton JC, Gold BD, Harris PR et al. A comprehensive review of the natural history of *Helicobacter pylori* infection in children. *Arch Med Res.* 2000;31(5):431–69. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11179581>
9. Frenck RW, Clemens J. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes Infect* [Internet]. Jul 2003;5(8):705–13. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12814771>
10. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori.* *Clin Microbiol Rev.* Oct 1997 9;10(4):720–41. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Mégraud F. The challenge of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: the comeback of bismuth-based quadruple therapy. *Therap Adv Gastroenterol.* Mar 2012;5(2):103–9. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22423259>
12. Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH et al. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology.* Jul 2016;151(1):51-69.e14. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27102658>
13. Ayraud S, Janvier B, Fauchère J-L. Experimental colonization of mice by fresh clinical isolates of *Helicobacter pylori* is not influenced by the *cagA* status and the *vacA* genotype. *FEMS Immunol Med Microbiol.* Nov 2002;34(3):169-72. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12423767>
14. Censini S, Lange C, Xiang Z, Crabtree JE, Ghiara P, Borodovsky M et al. *cagA*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 1996;93(25):14648–53. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=26189&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
15. Crabtree JE, Taylor JD, Heatley RV, Shallcross TM, Rathbone BJ, Wyatt JI et al. Mucosal IgA recognition of *Helicobacter pylori* 120 kDa protein, peptic ulceration, and gastric pathology. *Lancet.* Aug 1991;338(8763):332–5. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1711111>

- lable: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527400001193>
16. Peek RM, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC et al. Heightened inflammatory response and cytokine expression in vivo to cagA+ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest*. Dec 1995;73(6):760–70. Available: <http://europepmc.org/abstract/med/8558837>
 17. Atherton JC, Tham KT, Peek RM, Cover TL, Blaser MJ. Density of *Helicobacter pylori* Infection In Vivo as Assessed by Quantitative Culture and Histology. *J Infect Dis*. Sep 1996;174(3):552–6. Available: <http://jid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/174/3/55>Mohammadi M, Nedrud J, Redline R, Lycke N, Czinn SJ. Murine CD4 T-cell response to *Helicobacter* infection: TH1 cells enhance gastritis and TH2 cells reduce bacterial load. *Gastroenterology*. Dec 1997;113(6):1848–57. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394724>
 18. Fox JG, Beck P, Dangler CA, Whary MT, Wang TC, Shi HN et al. Concurrent enteric helminth infection modulates inflammation and gastric immune responses and reduces *helicobacter*-induced gastric atrophy. *Nat Med*. May 2000;6(5):536–42. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802709>
 19. Moss SF, Moise L, Lee DS, Kim W, Zhang S, Lee J et al. HelicoVax: epitope-based therapeutic *Helicobacter pylori* vaccination in a mouse model. *Vaccine*. Mar 2011;29(11):2085–91. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3046230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 20. Rappuoli R. Reverse vaccinology. *Curr Opin Microbiol*. Oct 2000;3(5):445–50. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527400001193>
 21. Pizza M. Identification of Vaccine Candidates Against Serogroup B Meningococcus by Whole-Genome Sequencing. *Science* (80-). March 2000;287(5459):1816–20. Available: <http://www.sciencemag.org/content/287/5459/1816.abstract>
 22. Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Brunak S, Lund O et al. An integrative approach to CTL epitope prediction: a combined algorithm integrating MHC class I binding, TAP transport efficiency, and proteasomal cleavage predictions. *Eur J Immunol*. 2005;35(8):2295–303. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15997466>
 23. Ovsyannikova IG, Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. Human leukocyte antigen polymorphisms: variable humoral immune responses to viral vaccines. *Expert Rev Vaccines*. Feb 2006;5(1):33–43. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16451106>
 24. Brusic V, Rudy G, Honeyman G, Hammer J, Harrison L. Prediction of MHC class II-binding peptides using an evolutionary algorithm and artificial neural network. *Bioinformatics*. Jan 1998;14(2):121–30. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545443>
 25. Buus S, Lauemøller SL, Worning P, Kesmir C, Frimurer T, Corbet S et al. Sensitive quantitative predictions of peptide-MHC binding by a “Query by Committee” artificial neural network approach. *Tissue Antigens*. 2003;62(5):378–84.
 26. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Lauemøller SL, Lamberth K, Buus S et al. Reliable prediction of T-cell epitopes using neural networks with novel sequence representations. *Protein Sci*. May 2003;12(5):1007–17. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2323871&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 27. Nielsen M, Lundegaard C, Worning P, Sylvester Hvid C, Lamberth K, Buus S et al. Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach. *Bioinformatics*. 2004;20(9):1388–97.
 28. Shah NA, Barua P, Khan K. Immunoinformatics Aided Prediction of Cytotoxic T Cell Epitope of Respiratory Syncytial Virus. 2015;1(2):99–104.
 29. He Y, Xiang Z, Mobley HLT. Vaxign: The first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vac-

- cine development. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010: 297505. doi: 10.1155 / 2010/297505
30. Xiang Z, He Y. Vaxign: a web-based vaccine target design program for reverse vaccinology. *Procedia Vaccinol* [Internet]. 2009;1(1):23–9. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877282X09000368>
 31. Figueiredo C, Machado JC, Pharoah P, Seruca R, Sousa S, Carvalho R et al. Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* Nov 2002;94(22):1680–7. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441323>
 32. Blaser MJ. The biology of cag in the Helicobacter pylori-human interaction. *Gastroenterology.* May 2005;128(5):1512–5. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15887132>
 33. van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, Plaisier A, Schneeberger P, de Boer W et al. Clinical relevance of the cagA, vacA, and iceA status of Helicobacter pylori. *Gastroenterology.* Jul 1998;115(1):58–66. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649459>
 34. Nilsson C, Sillén A, Eriksson L, Strand M-L, Enroth H, Normark S et al. Correlation between cag pathogenicity island composition and Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease. *Infect Immun.* Nov 2003;71(11):6573–81. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=219608&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 35. Moise L, McMurry JA, Pappo J, Lee D-S, Moss SF, Martin WD et al. Identification of genome-derived vaccine candidates conserved between human and mouse-adapted strains of *H. pylori*. *Hum Vaccin.* 2008;4(3):219–23. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18376134>
 36. Ardito M, Fueyo J, Tassone R, Terry F, Da-Silva K, Zhang S et al. An Integrated Genomic and Immunoinformatic Approach to *H. pylori* Vaccine Design. *Immunome Res.* Jan 2011;7(2):1. Available: http://www.researchgate.net/publication/51842751_An_Integrated_Genomic_and_Immunoinformatic_Approach_to_H._pylori_Vaccine_Design
 37. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* Jan 2005;33(Database issue):D501–4. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=539979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 38. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank. *Nucleic Acids Res.* Jan 2006;34(Database issue):D16–20. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1347519&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 39. Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R et al. PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics.* Jul 2010;26(13):1608–15. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2887053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 40. McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D et al. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol.* Jul 1988;69 (Pt 7):1531–74. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2839594>
 41. Matthews BW. Comparison of the predicted and observed secondary structure of T4 phage lysozyme. *Biochim Biophys Acta.* Oct 1975;405(2):442–51. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1180967>
 42. Chen F, Mackey AJ, Stoekert CJ, Roos DS. OrthoMCL-DB: querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups. *Nucleic Acids Res.* Jan 2006;34(Database issue):D363–8. Available: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1347485&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Tabla s1. Comparación de cuatro software para predicción de epítomos clases MHC I y MHC II de *Helicobacter pylori*

Accession #	software	prediccion petidos		metodo de prediccion
		MHC I	MHC II	
WP_000726314.1	Vaxign	90	86	PSSM
	epijen v1.0	40		AGMP
	CTLPred	28		ANNs y SVMs
	imtech		3	MCTT y ANNs
WP_000713712.1	Vaxign	92	131	PSSM
	epijen v1.0	42		AGMP
	CTLPred	29		ANNs y SVMs
	imtech		3	MCTT y ANNs
WP_001115603	Vaxign	94	112	PSSM
	epijen v1.0	28		AGMP
	CTLPred	29		ANNs y SVMs
	imtech		51	MCTT y ANNs
WP_000709741.1	Vaxign	66	48	PSSM
	epijen v1.0	18		AGMP
	CTLPred	17		ANNs y SVMs
	imtech		34	MCTT y ANNs
WP_000822057.1	Vaxign	186	154	PSSM
	epijen v1.0	51		AGMP
	CTLPred	36		ANNs y SVMs
	imtech		4	MCTT y ANNs
WP_001228436.1	Vaxign	151	134	PSSM
	epijen v1.0	28		AGMP
	CTLPred	32		ANNs y SVMs
	imtech		68	MCTT y ANNs
WP_001092132	Vaxign	114	99	PSSM
	epijen v1.0	28		AGMP
	CTLPred	23		ANNs y SVMs
	imtech		51	MCTT y ANNs
WP_010875534.1	Vaxign	122	109	PSSM
	epijen v1.0	27		AGMP
	CTLPred	32		ANNs y SVMs
	imtech		61	MCTT y ANNs

<u>WP_000911476.1</u>	Vaxign	112	110	PSSM
	epijen v1.0	26		AGMP
	CTLPred	26		ANNs y SVMs
	imtech		48	MCTT y ANNs
<u>WP_001108275.1</u>	Vaxign	118	96	PSSM
	epijen v1.0	27		AGMP
	CTLPred	21		ANNs y SVMs
	imtech		52	MCTT y ANNs
<u>WP_010875548.1</u>	Vaxign	174	155	PSSM
	epijen v1.0	27		AGMP
	CTLPred	36		ANNs y SVMs
	imtech		81	MCTT y ANNs
<u>WP_000479960.1</u>	Vaxign	184	132	PSSM
	epijen v1.0	27		AGMP
	CTLPred	30		ANNs y SVMs
	imtech		82	MCTT y ANNs
<u>WP_000753173.1</u>	Vaxign	142	126	PSSM
	epijen v1.0	27		AGMP
	CTLPred	16		ANNs y SVMs
	imtech		73	MCTT y ANNs
<u>WP_000592437.1</u>	Vaxign	102	88	PSSM
	epijen v1.0	27		AGMP
	CTLPred	27		ANNs y SVMs
	imtech	55		MCTT y ANNs
<u>WP_000812546.1</u>	Vaxign	112	113	PSSM
	epijen v1.0	27		AGMP
	CTLPred	26		ANNs y SVMs
	imtech		57	MCTT y ANNs
<u>WP_001248496.1</u>	Vaxign	127	110	PSSM
	epijen v1.0	29		AGMP
	CTLPred	24		ANNs y SVMs
	imtech		55	MCTT y ANNs
<u>WP_000874574.1</u>	Vaxign	514	506	PSSM
	epijen v1.0	130		AGMP
	CTLPred	96		ANNs y SVMs
	imtech		249	MCTT y ANNs
<u>WP_000902542.1</u>	Vaxign	189	143	PSSM
	epijen v1.0	46		AGMP
	CTLPred	36		ANNs y SVMs
	imtech		89	MCTT y ANNs

ANÁLISIS Y PREDICIÓN DE EPITOPES T Y B EN PROTEÍNAS DE *HELICOBACTER PYLORI*: UNA APROXIMACIÓN INICIAL AL DISEÑO RACIONAL DE ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS ALTERNATIVAS SIN USO DE ANTIBIÓTICOS

<u>WP_000915379.1</u>	Vaxign	167	122	PSSM
	epijen v1.0	59		AGMP
	CTLPred	46		ANNs y SVMs
	imtech		112	MCTT y ANNs
<u>WP_000945747.1</u>	Vaxign	193	148	PSSM
	epijen v1.0	47		AGMP
	CTLPred	36		ANNs y SVMs
	imtech		89	MCTT y ANNs