



## ORIGINAL

# Filogeografía de *glmM* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con patologías gástricas al sur de México

## *Phylogeography of glmM in Helicobacter pylori strains isolated from patients with gastric pathologies in southern Mexico*

Alan Michelle Ferman-Orduña<sup>1</sup>, Rogelio Gabriel Torres-Ramos<sup>1</sup>, Adolfo Román-Román<sup>1</sup>, Angela Victoria Forero-Forero<sup>2</sup>, Jesús Carlos Ruvalcaba Ledezma<sup>3</sup>, Jeiry Toribio-Jiménez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero. México.

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina y Coordinación de la Maestría en Salud Pública en [ICSa-UAEH] Instituto de Ciencias de la Salud-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca hidalgo, México.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jeiryjimenez2014@gmail.com](mailto:jeiryjimenez2014@gmail.com) (Jeiry Toribio Jiménez).

Recibido el 17 de mayo de 2020; aceptado el 28 de agosto de 2020.

### Cómo citar este artículo:

Ferman-Orduña AM, Torres-Ramos RG, Román-Román A, Forero-Forero AV, Ruvalcaba Ledezma JC, Toribio-Jiménez J. Filogeografía de *glmM* en cepas de *Helicobacter pylori* aisladas de pacientes con patologías gástricas al sur de México. JONNPR. 2020;5(11):1367-77. DOI: 10.19230/jonnpr.3769

### How to cite this paper:

Ferman-Orduña AM, Torres-Ramos RG, Román-Román A, Forero-Forero AV, Ruvalcaba Ledezma JC, Toribio-Jiménez J. Phylogeography of *glmM* in *Helicobacter pylori* strains isolated from patients with gastric pathologies in southern Mexico. JONNPR. 2020;5(11):1367-77. DOI: 10.19230/jonnpr.nnnn



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License

La revista no cobra tasas por el envío de trabajos, ni tampoco cuotas por la publicación de sus artículos.

## Resumen

**Introducción.** *Helicobacter pylori* posee un genoma de aproximadamente 1600 genes, el gen *glmM* está altamente conservado y se ha utilizado para identificar *H. pylori* por su sensibilidad y especificidad en biopsias gástricas. La diversidad genética de *H. pylori* es alta entre cepas del mismo origen geográfico y



es aún más a escala global. En México, son pocos los estudios que destacan la importancia de la variabilidad genética de esta bacteria, la cual es estudiada mediante técnicas moleculares.

**Objetivo.** Analizar la variabilidad genética del gen *glmM* en cepas de *H. pylori* de pacientes con patologías gástricas.

**Metodología.** Se analizaron solo 90 secuencias del gen *glmM* (10 de grupo de estudio y 80 depositadas en el GenBank), posteriormente realizamos redes de haplotipos, donde se puede observar las diferencias en pasos mutacionales de las secuencias a nivel estatal y con otros grupos geográficos con el fin de hacer una reconstrucción de filogenia basada en las relaciones ancestro-descendiente.

**Resultados.** Las cepas analizadas provenían el 30% hombres y 70% mujeres, con una edad promedio de 42 años, con diagnóstico de gastritis, las secuencias de *glmM* mostraron variabilidad genética. De las secuencias analizadas, se propone confirmar la presencia de ocho haplotipos que se agrupan separados.

**Conclusiones:** Se sugiere hacer estudios detallados a nivel molecular de los haplotipos del gen *glmM* en cepas de *H. pylori* para conocer su distribución geográfica con la finalidad de conocer las cepas circulantes a nivel mundial y con esto evitar los resultados negativos.

#### Palabras clave

*Helicobacter pylori*; variabilidad genética; gen *glmM*; filogeografía

#### Abstract

**Introduction:** *Helicobacter pylori* has a genome of approximately 1600 genes, the *glmM* gene is highly conserved and has been identified to identify *H. pylori* due to its sensitivity and specificity in gastric biopsies. The genetic diversity of *H. pylori* is high among strains of the same geographical origin and is even more of a global scale. In Mexico, studies that study the importance of the genetic variability of this bacterium, which is studied by molecular techniques.

**Aim.** To analyze the genetic variability of the *glmM* genus in *H. pylori* strains of patients with gastric pathologies.

**Methodology.** Only 90 sequences of the *glmM* genus were analyzed (10 of study group and 80 deposit in GenBank), to carry out haplotype networks, where the differences in the steps of the relationships at the state level and with other geographical groups can be observed in order to do a reconstruction of phylogeny based on ancestor-descendant relationships.

**Results.** The strains analyzed showed 30% of men and 70% of women, with an average age of 42 years, diagnosed with gastritis, the *glmM* sequences. From the sequences analyzed, it is proposed to confirm the presence of eight haplotypes that are grouped separately.

**Conclusions.** We suggest university studies at the molecular level of the *glmM* haplotypes in strains of *H. pylori* to know their geographical distribution in order to know the circulating strains worldwide and with this avoid negative results.



## Keywords

*Helicobacter pylori*; genetic variability; *glmM* gene; phylogeography

## Introducción

*Helicobacter pylori* se encuentra en la mitad de la población mundial. Su prevalencia muestra una alta variabilidad según la región geográfica, etnia, raza, edad y factores socioeconómicos, y es alta en países en desarrollo<sup>(1)</sup>. La diversidad de los genotipos de *H. pylori* parece reflejar la historia de sus hospederos, y se correlaciona con la historia de la migración humana<sup>(2)</sup>. Las cepas de *H. pylori* de diferentes áreas geográficas muestran características filogeográficas muy específicas, estas pueden ser empleadas para el desarrollo de estudios más complejos<sup>(3)</sup>.

El gen *glmM* antes conocido como *ureC*, codifica para una fosfoglucoamina mutasa; y está considerado como “house keeping” y participa directamente en la biosíntesis de la pared celular<sup>(4)</sup>, se ha utilizado para identificar a *H. pylori* en biopsias gástricas<sup>(5)</sup>. *H. pylori* exhibe una notable diversidad alélica y variabilidad genética, ya que se recombinan libremente como poblaciones panmícticas, la cual típicamente involucra modificaciones intra-genómica (mutaciones puntuales, recombinaciones, deleciones y disparamiento de bases), así como la recombinación inter-genómica, lo que resulta en que los pacientes desarrollen clonas distintas, sin embargo, las diferencias entre estas clonas son mínimas<sup>(6)</sup>. La diversidad de los genotipos de *H. pylori* parece reflejar la historia de sus hospederos, y se correlaciona con la historia de la migración humana<sup>(2)</sup>.

Las cepas de *H. pylori* de diferentes áreas geográficas muestran características filogeográficas muy específicas. En los últimos años se han desarrollado nuevos métodos y programas que mediante técnicas moleculares como PCR y análisis genético como DnaSP y PopArt, entre otras, tiene por finalidad conocer la estructura genética de las cepas, estas, han sido un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas, utilizados para la identificación de agentes patógenos, análisis filogenéticos y genealógicos, para conocer la variabilidad genética aplicados en enfermedades y patologías en diferentes partes del mundo. Además, el análisis genealógico ofrece una visión jerárquica de la evolución de especies, para conocer la relación de parentesco que existe entre los seres vivos. El presente estudio se hizo para conocer la filogeografía con respecto a la variabilidad genética del gen *glmM* de *H. pylori* de pacientes con patología gástrica al sur de México.



## Material y métodos

Se hicieron crecer 15 cepas de *H. pylori* en agar Columbia del biobanco del Laboratorio de Investigación Clínica de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, UAGro., todas provenían de pacientes con diagnóstico de enfermedad gástrica (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Datos de las cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con patología gástrica incluidos en este estudio

Cepa	Patología	Genero /edad (años)
4191	Gastritis crónica	Masculino/57
4192	Gastritis crónica moderada	Masculino/ 57
4193	Gastritis folicular aguda	Femenino/27
4194	Gastritis aguda erosiva	Femenino/44
4195	Gastritis antral folicular	Masculino/25
4196	Gastritis folicular crónica moderada	Masculino/38
4197	Gastritis crónica	Femenino/39
4198	Gastritis difusa	Femenino/35
4199	Gastritis erosiva	Femenino/42
4200	Gastritis erosiva	Femenino/42

### Extracción de DNA cromosomal:

Se obtuvo el DNA de las cepas de *H. pylori* mediante el método de fenol-cloroformo alcohol isoamílico y se almacenaron a -20°C.

### Amplificación por PCR y secuenciación del gene *glmM* de cepas de *H. pylori*:

Se utilizó la técnica de PCR para la amplificación del gen *glmM* empleando los oligonucleótidos: *glmMF* (5'-CGCGAGCCACAACCCTTTTGAAG-3'), y *glmMR* (5'-GCTTATCCCCATGCACGATATTC-3'), con un volumen final de 50µl de la mezcla de reacción (1X buffer PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 1.5% [v/v] Triton X-100), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de concentración de cada dNTPs, 50 pmol de primer (*glmMF* and *glmMR*), and 1 U de *Taq* DNA polimerasa)<sup>(7)</sup>. Se utilizó un termociclador MJ Research (Watertown, MA, USA), con el siguiente patrón de amplificación: Una temperatura de inicio a 94°C por 5 minutos, por 30 ciclos 94°C por 1 minuto, 54°C por 1:30 minutos, 72°C por 1:30 minutos y extensión final de 10



minutos a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, que fueron teñidos con bromuro de etidio y se visualizaron con luz (UV) observándose un producto de aproximadamente 796 pb. Los productos de PCR se purificaron directamente de los geles de agarosa usando el kit de extracción QIAEXII DNA (QIAGEN, Hilden, Germany) y fueron enviados al servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se uso como control positivo DNA genómico de *H. pylori* ATCC 700392, y control negativo agua.

## Determinación de la variabilidad genética y filogeografía:

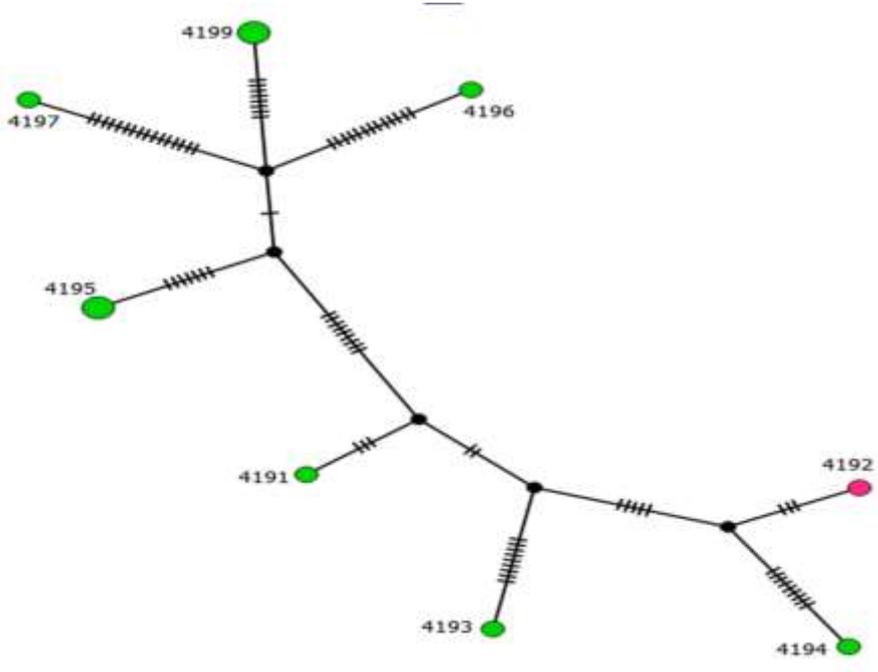
Se analizaron las secuencias de los productos de PCR de *glmM* con el programa Chromas y Bioedit para la puntualización y edición de las secuencias, posteriormente se realizó un BLAST en el GenBank para la obtención de 80 secuencias depositadas de *glmM*, con la finalidad de realizar un multialineamiento con el programa ClustalW2, con la base de datos obtenida de nuestras secuencias y la del GenBank se procesaron en el programa PopArt para la realización de la red de haplotipos, finalmente con el programa DNAsp, se hizo un análisis para determinar la cantidad polimorfismos presentes en el gen *glmM*<sup>(8,9)</sup>.

## Resultados

### Caracterización de la población de estudio.

Se analizaron 10 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes originarios del estado de Guerrero con patologías gástricas, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Investigación en Bacteriología. Los pacientes procedieron de 2 municipios del estado de Guerrero (Chilpancingo de los Bravo, Jaleaca de Catalan), participaron hombres en un 30% y mujeres en 70% con una edad promedio de 42 años.

**Análisis filogeográfico:** Se analizaron 90 secuencias del gen *glmM* (10 aislados de pacientes al sur de México y 80 depositadas en el GenBank, con porcentajes de similitud de 96 y 99%). En primera instancia se construyó una red de haplotipos (Figura 1).



**Figura 1.** Red de Haplotipos del gen *glmM* de las 10 secuencias de *H. pylori* obtenidas de patologías gástricas., en verde se muestran las cepas aisladas de Chilpancingo y en rosa la cepa de Jaleaca, todas del estado de Guerrero, México.

Con el programa PopArt con base a las 10 secuencias obtenidas en el trabajo, en la cual se observan los diferentes haplotipos y la cantidad de pasos mutacionales entre ellos. Posteriormente se realizó otra red de haplotipos comparando las secuencias de Guerrero con las del GenBank (Figura 2).





a los parámetros para analizar la diversidad genética se calculó el valor de  $\pi$  (pi) y  $\Theta$  (theta) los resultados se indican en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Comparación de los datos polimórficos, valores de Pi y de theta entre las secuencias de México, con las del mundo.

	México	Mundial
Número de secuencias	10	80
Número de sitios	628	628
Número de polimorfismos	60	143
Número de mutaciones	61	150
Número de haplotipos	9	65
Diversidad nucleotídica (Pi)	0.03416	0.03767
Theta (por sitio) de Theta	0.03316	0.04822

## Discusión

*H. pylori* representa hoy en día uno de los patógenos más exitosos por el diverso número de estrategias que este microorganismo posee para colonizar el estómago humano, modular la expresión de factores de patogenicidad que orquestan los procesos de daño tisular, sin embargo una de las características más importantes de este microorganismo es una región específica de su genoma, la zona de plasticidad, la cual es una región hipervariable donde constantemente ocurren mutaciones en los genes codificados en esa región confiriendo un pool de genes que puede variar según las condiciones del hospedero, estos genes auxiliares codifican para diversas propiedades biológicas, la constante variabilidad de estos genes se denomina plasticidad genómica. La plasticidad genómica de *H. pylori* ha sido estudiada previamente por diversos autores a nivel mundial<sup>(6,3)</sup>, sin embargo, en México y particularmente en Guerrero los estudios realizados son mínimos.

Si bien el estudio de los genes auxiliares es muy importante para tratar de analizar cuáles son posibilidades de desarrollar un cuadro clínico u otro, el estudio de los genes estructurales representa un tipo de estudio arriesgado ya que algunos investigadores consideran que estos genes no sufren grandes cambios al encontrarse en regiones altamente conservadas del genoma por lo cual todos los hallazgos de este tipo de investigaciones son relevantes.



En el presente estudio analizo el gen *glmM* a través de la amplificación de este por PCR, con las secuencias obtenidas de la amplificación del gen de las cepas de *H. pylori* del estado de Guerrero, fue posible realizar un multialineamiento con una base de datos de 90 secuencias de *glmM* de *H. pylori* de diversas parte del mundo, con la finalidad de realizar una red de haplotipos, la cual esquematiza las diferencias entre haplotipos de una especie y las distancias entre estos con pasos mutacionales. Con los datos obtenidos se demuestra que en Guerrero existe una gran diversidad de haplotipos en la especie de *H. pylori*, encontrando de 10 muestras, 8 haplotipos posiblemente nuevos, estos presentan una gran cantidad de pasos mutacionales entre cada haplotipo, también se observa un determinado grado de homología entre haplotipos de Chilpancingo de los Bravo. Esto puede deberse a que la diversidad genética entre cepas de *H. pylori* puede originarse por transferencia horizontal<sup>(10,11)</sup>, sin embargo, se puede pensar que los cambios constantes en su genoma pueden ser derivado por una alta recombinación del gen *glmM*.

Existen diversas condiciones en el microambiente estomacal que pueden afectar el contenido genómico de *H. pylori* como el pH del ácido gástrico, cantidad de moco gástrico, entre otros<sup>(12)</sup>. Por tanto, los mecanismos que utiliza *H. pylori* para adquirir o perder genes durante la colonización para adaptarse al ambiente gástrico son diversos<sup>(11,13)</sup>. De este modo podemos decir que la alta variabilidad genética entre cepas de *H. pylori* se puede deber a la microdiversidad a nivel gen, así como a la macrodiversidad a nivel genoma y claro a la migración poblacional que ha tenido esta bacteria, esto debido a que se observó que los 8 haplotipos encontrados, en una red de haplotipos hecha junto con las 80 secuencias pertenecientes a varios países del mundo, tienen corta distancia relativa en pasos mutacionales, además de formar loops con estos otros haplotipos, permitiendo observar con mayor precisión la distancia que hay entre los haplotipos de Guerrero, lo que nos hace pensar que los haplotipos de México en específico del estado de Guerrero son haplotipos nuevos, que tienen un ancestro con haplotipos de otros continentes y que particularmente estos ocho tienen una mayor plasticidad genómica en comparación con el resto del mundo presentando 60 mutaciones de 148 que tuvieron las 80 secuencias de la base de datos del BLAST.



## Conclusión

Se sugiere hacer estudios detallados a nivel molecular de los haplotipos del gen *glmM* en cepas de *H. pylori* para conocer su distribución geográfica con la finalidad de conocer las cepas circulantes a nivel mundial y con esto evitar los resultados negativos.

## Financiación

Esta investigación se realizó con el financiamiento del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT, con el proyecto número: SALUD-2012-01-182778

## Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## Referencias

1. Hunt, R.H., Xiao, S.D., Megraud, F., Leon-Barua, R., Bazzoli, F., van der Merwe., *et al.* *Helicobacter pylori* en los países en desarrollo. Guías prácticas de la Organización Mundial de Gastroenterología. 2010. 1: 3-10.  
<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/helicobacter-pylori-spanish-2010.pdf>
2. Mobley, H., Mendz, G., Hazell, S. Heterogeneity and Subtyping. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. 2001. 3:15-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2436/>
3. Suzuki, R., Shiota, S., Yamaoka, Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2002. 12:203-13. doi: 10.1016/j.meegid.2011.12.002.
4. Espinoza, M. G., Vazquez, R. G., Mendez, I. M., Vargas, C. R., & Cerezo, S. G. Detection of the *glmM* gene in *Helicobacter pylori* isolates with a novel primer by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011. 49(4), 1650–2. doi:10.1128/JCM.00461-10
5. Tamer, E., Wail, H., Israr, S., Walid, S., Mohammad, F. Determination of *Helicobacter pylori* Virulence Genes in Gastric Biopsies by PCR. *ISRN Gastroenterology*. 2003. 13:4. doi: [10.1155/2013/606258](https://doi.org/10.1155/2013/606258)



6. Dorer, M. S., Fero, J., Salama, N. R., (2010) DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathogens*. 6: 1–10. doi: [10.1371/journal.ppat.1001026](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001026)
7. Goosen C, Theron J, Ntsala M, Maree FF, Olckers A, Botha SJ, Lastovica AJ, van der Merwe SW. Evaluation of a novel heminested PCR assay based on the phosphoglucosamine mutase gene for detection of *Helicobacter pylori* in saliva and dental plaque. *J Clin Microbiol*. 2002 Jan;40(1):205-9. doi: 10.1128/jcm.40.1.205-209.2002. PubMed PMID: 11773117; PubMed Central PMCID: PMC120087.
8. Florez Rueda Ana Marcela. Estructura poblacional y filogeografía de *Curcubita moschata*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. 2009. <http://bdigital.unal.edu.co/1873/>
9. Avise, J.C. Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge, Massachusetts Harvard University, Massachusetts, 1999. 417 pp. DOI: 10.1093/icb/41.1.134
10. Gressmann, H., Linz, B., Ghai, R., Pleissner, K.P., Schlapbach, R., Yamaoka, Y., Kraft, C., et al. Gain and Loss of Multiple Genes During the Evolution of *Helicobacter pylori*. *PLoS Genet*. 2005. 1: 424-6. DOI:[10.1371/journal.pgen.0010043](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010043)
11. Janssen, P.J., Audit, B., Ouzounis, C.A. Strain-specific genes of *Helicobacter pylori*: distribution, function and dynamics. *Nucleic Acids Res*. 2001. 1: 4395–404. DOI: [10.1093/nar/29.21.4395](https://doi.org/10.1093/nar/29.21.4395)
12. Dong, Q.J., Wang, Q., Xin, Y.N., Li, N., Xuan, S.Y. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol*. 2009. 15: 3984-91. doi: [10.3748/wjg.15.3984](https://doi.org/10.3748/wjg.15.3984)
13. Odenbreit, S., Swoboda, K., Barwig, I., Ruhl, S., Borén, T., Koletzko, S. Outer Membrane Protein Expression Profile in *Helicobacter pylori* Clinical Isolates. *Infect Immun*. 2009. 77: 3782–90. doi: 10.1128/IAI.00364-09.