

Marcadores moleculares de tipo inserción en bacterias de las familias *Moraxellaceae* y *Helicobacteraceae* (phylum *Proteobacteria*)

Molecular markers of insertion type in bacterias of the *Moraxellaceae* and *Helicobacteraceae* (phylum *Proteobacteria*) families

Lic. Ania Margarita Cutiño Jiménez,^I Lic. Lianne Barrera Roca,^I Lic. Vivian de la Puente López^{II} y Dra. Heidy Annia Peña Cutiño^{III}

^I Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

^{II} Centro Nacional de Electromagnetismo Aplicado, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba.

^{III} Clínica Estomatológica "Fé Dora", Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

Se efectuó un estudio con el empleo de la metodología de Gupta, en el Departamento de Biología y Geografía de la Universidad de Oriente en Santiago de Cuba, para determinar marcadores moleculares de tipo inserción en secuencias de las proteínas ADN polimerasa I y ADN polimerasa III (subunidad alfa), obtenidas de bases de datos internacionales y posteriormente alineadas con el programa ClustalX2. Las familias *Moraxellaceae* y *Helicobacteraceae* han sido ampliamente estudiadas, porque comprenden agentes patógenos causantes de numerosas enfermedades en humanos, pero pocas investigaciones han estado dirigidas a la identificación de las características moleculares que puedan distinguir a sus miembros de otros grupos de bacterias; de manera que los presentes resultados constituyen un aporte al conocimiento de la genética y la bioquímica de estas familias y proveen herramientas moleculares para la clasificación taxonómica y el diagnóstico de especies patógenas.

Palabras clave: marcadores moleculares, *Moraxellaceae*, *Helicobacteraceae*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Helicobacter*, ADN polimerasa I, ADN polimerasa III.

ABSTRACT

A study with the use of Gupta methodology was carried out in the Biology and Geography Department of Oriente University in Santiago de Cuba, to determine molecular markers of insertion type in sequences of the DNA polimerase I proteins and DNA polimerase III (alpha subunity), obtained from international databases and later on aligned with the ClustalX2 program. The *Moraxellaceae* and *Helicobacteraceae* families have been broadly studied, because they comprise pathogen agents that cause numerous diseases in humans, but few investigations have been directed to the identification of the molecular characteristics that can distinguish their members from other groups of bacterias; so these results constitute a contribution to the knowledge of genetics and biochemistry of these families and provide molecular tools for the taxonomic classification and the diagnosis of pathogen species.

Key words: molecular markers, *Moraxellaceae*, *Helicobacteraceae*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter*, *Helicobacter*, DNA polimerase I, DNA polimerase III.

INTRODUCCIÓN

La familia *Moraxellaceae*, incluida en la clase *Gammaproteobacteria*, comprende a los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter*. Algunas especies de *Moraxella* son importantes en el contexto de la medicina, por ser parásitas de las membranas mucosas del hombre y de otros mamíferos. Asimismo la especie *Psychrobacter immobilis* y varias cepas de *Acinetobacter* han sido registradas como agentes patógenos oportunistas, causantes de numerosas infecciones intrahospitalarias.¹⁻⁴

En la clase *Epsilonproteobacteria* se encuentra la familia *Helicobacteraceae*, que incluye el género *Helicobacter*.⁵ La bacteria *Helicobacter pylori* es el agente causal reconocido de varias enfermedades gastrointestinales en el hombre, como la gastritis crónica, las úlceras pépticas, el adenocarcinoma de estómago y el linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica.⁶

A pesar de que las familias *Moraxellaceae* y *Helicobacteraceae* han sido ampliamente estudiadas, pocas investigaciones han estado dirigidas a la determinación de marcadores moleculares para el diagnóstico de las especies patógenas que estas contienen.

La disponibilidad de genomas y proteomas completamente secuenciados para un gran número de bacterias, constituye una oportunidad para la taxonomía y el diagnóstico molecular. De acuerdo con la metodología propuesta por Gupta, la comparación de secuencias de proteínas de diferentes especies mediante el alineamiento múltiple, permite hallar marcadores moleculares que pueden ser empleados en la identificación de bacterias.⁷

Teniendo en cuenta que ambas familias comprenden especies de importancia en el ámbito médico, el presente estudio se basó en la mencionada metodología para la determinación de inserciones en proteínas relacionadas con el metabolismo del ácido desoxirribonucleico (ADN), que constituyan marcadores moleculares en la taxonomía y diagnóstico de especies patógenas.

MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Departamento de Biología y Geografía de la Universidad de Oriente en Santiago de Cuba y para ello fueron escogidas secuencias de las proteínas ADN polimerasa III (subunidad alfa) y ADN polimerasa I pertenecientes a especies del *phylum Proteobacteria*, obtenidas de bases de datos internacionales a partir del servidor *National Center of Biotechnology Information*. Posteriormente fueron comparadas mediante el programa ClustalX2,⁸ considerando los parámetros sugeridos por Hall: alineamiento par a par (apertura de gap 35 y extensión de gap 0,75) y alineamiento múltiple (apertura de gap 15 y extensión de gap 0,30).⁹

Los alineamientos obtenidos fueron analizados mediante una inspección visual para identificar las inserciones, de las cuales se consideraron relevantes aquellas que estuvieran flanqueadas por regiones conservadas, como fue propuesto por Gupta.⁷

La lista de las especies incluidas con su nomenclatura correspondiente es mostrada en el anexo. En cada figura la nomenclatura es seguida por el número de acceso de la secuencia en la base de datos. Los puntos muestran identidad con el aminoácido de la

primera secuencia en el alineamiento y los guiones (-) representan brechas que indican ausencia de la inserción, que está señalada por un cuadro.

RESULTADOS

La figura 1 muestra una inserción de 11 aminoácidos en la proteína ADN polimerasa I, característica de los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella*, pero ausente en el género *Acinetobacter* de la familia *Moraxellaceae*.

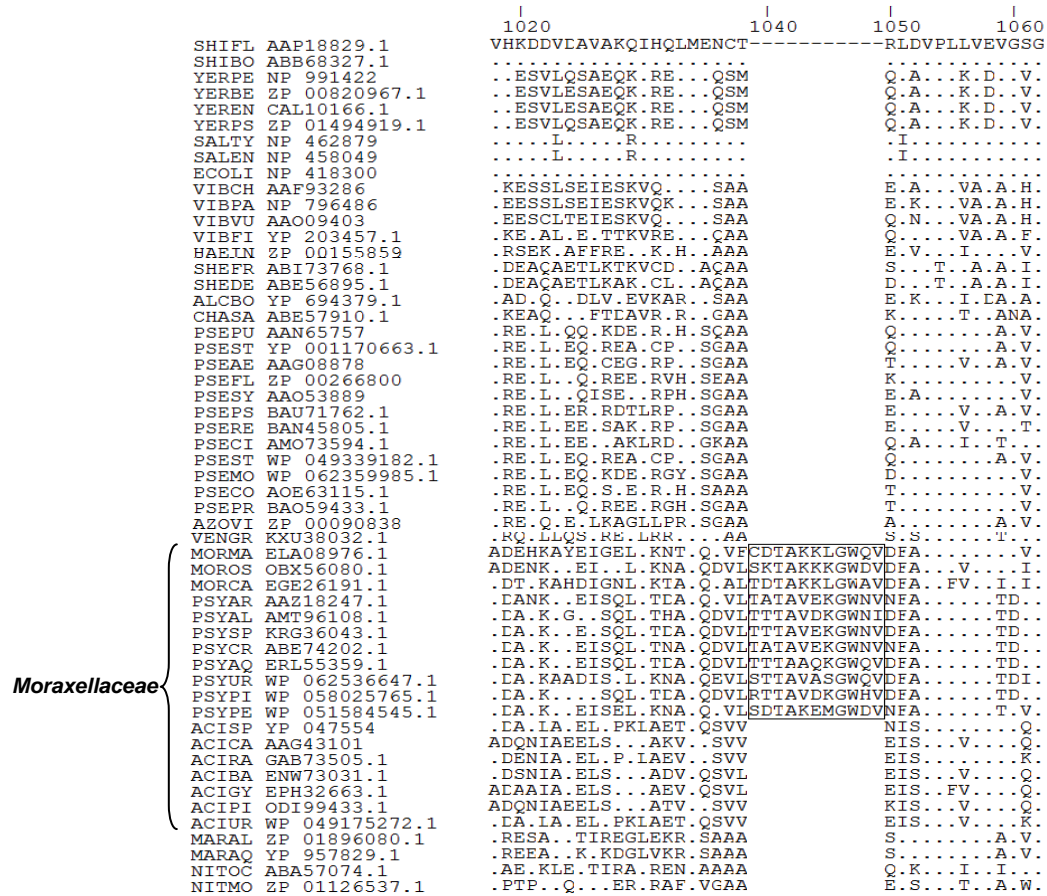


Fig. 1. Alineamiento de la proteína ADN polimerasa I

El alineamiento de la proteína ADN polimerasa III (subunidad alfa) evidenció una inserción de un aminoácido exclusivo del género *Acinetobacter* (figura 2), además de otra inserción de 4 a 17, característica de algunas especies de *Helicobacter* (figura 3).

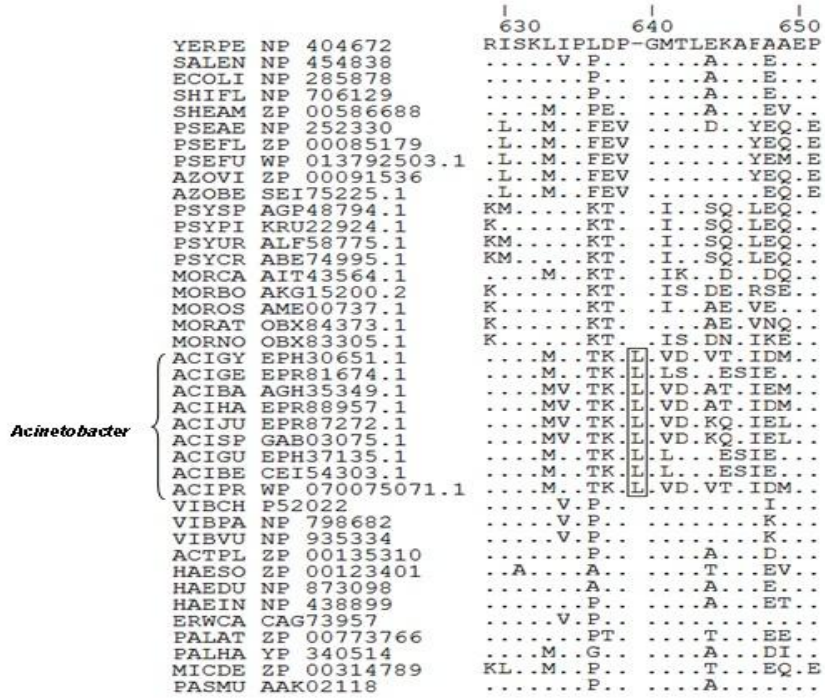


Fig. 2. Alineamiento de la subunidad alfa de la enzima ADN polimerasa III

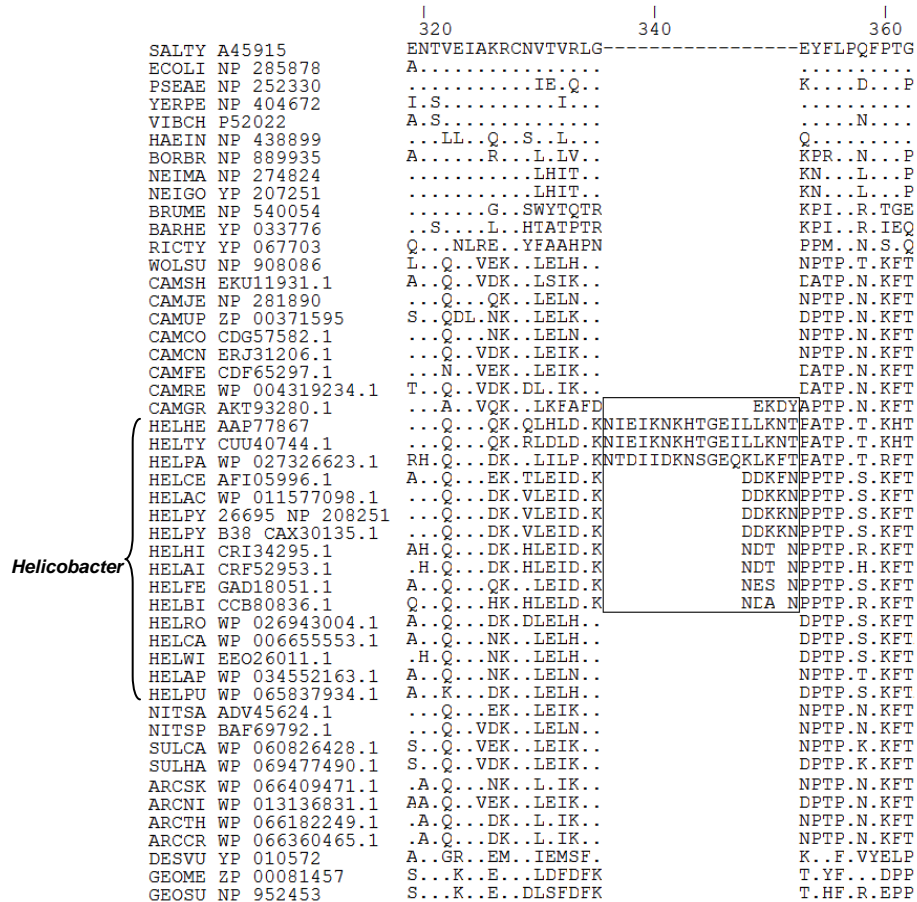


Fig. 3. Alineamiento de la subunidad alfa de la enzima ADN polimerasa III

DISCUSIÓN

La inserción compartida por los géneros *Psychrobacter* y *Moraxella* está bien conservada en las secuencias de las especies de *Psychrobacter*, lo que permite diferenciarlas de las especies de *Moraxella*. Las especies patógenas *M. catarrhalis* y *M. nonliquefaciens* han sido aisladas en humanos a partir de la cavidad nasal y de muestras del tracto respiratorio de pacientes con bronquitis crónica y otras infecciones de las vías respiratorias;¹⁰ un número significativo de sus cepas producen beta-lactamasa, lo que ha condicionado su resurgimiento como agentes patógenos en este tipo de infecciones.²

Igualmente la inserción exclusiva de un aminoácido en *Acinetobacter* en la proteína ADN polimerasa III (subunidad alfa) resulta de gran valor para la taxonomía e identificación a nivel de género. Entre las especies que la presentan está el *A. baumannii*, que ha emergido como uno de los microorganismos hospitalarios de mayor relevancia a escala mundial.⁴ Existe una clara asociación entre la infección por estas bacterias y el uso de instrumentales hospitalarios, y las infecciones resultan en septicemias, meningitis, endocarditis, neumonías e infecciones del tracto urinario. Algunas cepas aisladas en Cuba han mostrado resistencia a múltiples antibióticos, como la ampicilina, gentamicina, amikacina y ciprofloxacina.¹¹

Muchas especies de *Helicobacter* son patógenas del hombre y están asociadas a tres enfermedades, generalmente relacionadas con su nicho ecológico natural.¹² Entre las especies que comparten la inserción de 5 aminoácidos en la proteína ADN polimerasa III (subunidad alfa) está el *H. pylori*, reconocida como la principal bacteria causante de úlceras pépticas, gastritis atrófica y cáncer gástrico.^{5,13} Es importante señalar que la inserción permite una distinción de esta especie debido a que la secuencia de aminoácidos difiere en la cuarta posición respecto a la *H. cetorum*, que también la presenta.

La inserción es de 17 aminoácidos en 3 de las especies de *Helicobacter*: *H. pametensis*, *H. typhlonius* y *H. hepaticus*; las dos últimas comparten las mismas secuencias de aminoácidos, lo que resulta de gran valor desde el punto de vista médico, puesto que el *H. heilmannii* ha sido aislado de las muestras tomadas de pacientes con gastroenteritis.¹⁴

Hay que señalar que las especies entéricas de *Helicobacter* no son frecuentemente notificadas como agentes causales de enfermedades en humanos, pero su incidencia pudiera estar significativamente subestimada, debido a los inadecuados procedimientos de aislamiento e identificación.¹³ Considerando las dificultades en la identificación de especies comprendidas en este género y dada la importancia clínica de algunas de ellas, la determinación de marcadores moleculares específicos de este importante grupo resultaría de gran relevancia para la medicina.

La metodología desarrollada por Gupta ha sido utilizada por otros autores en el análisis de diferentes grupos de bacterias.^{15,16} Las inserciones halladas en este estudio constituyen una herramienta molecular útil para el diseño de protocolos de diagnóstico que permitirán establecer futuras estrategias respecto a la epidemiología y el tratamiento en enfermedades ocasionadas por dichos agentes patógenos. No existen informes previos de marcadores distintivos para las bacterias antes mencionadas, por lo que estos resultados no solo aportan el conocimiento de su biología y bioquímica, sino que pudieran considerarse útiles para la taxonomía, el diagnóstico y la descripción de nuevas especies.

Para concluir, el análisis de las proteínas mediante el alineamiento de secuencias de proteobacterias, permitió la identificación de inserciones útiles en la clasificación taxonómica, que constituyen marcadores moleculares para el diagnóstico de especies de las familias *Moraxellaceae* y *Helicobacteraceae*; tema de gran importancia para la protección de la salud humana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Teixeira LM, Merquior VLC. The Family *Moraxellaceae*. En: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The Prokaryotes. Berlin: Springer Heidelberg; 2014. p. 443-76.
2. Perez AC, Pang B, King LB, Tan L, Murrah KA, Reimche JL, *et al.* Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence *in vivo*. *Pathogens and Disease*. 2014; 70(3): 280-8.
3. Deschaght P, Janssens M, Vanechoutte M, Wauters G. *Psychrobacter* isolates of human origin, other than *Psychrobacter phenylpyruvicus*, are predominantly *Psychrobacter faecalis* and *Psychrobacter pulmonis*, with emended description of *P. faecalis*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012; 62(Pt 3): 671-4.
4. Prado A, Arias NL, Chávez M, Cabrera CE, Gómez RF. Caracterización fenotípica de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* en una institución de salud de alta complejidad de Cali. *Biomédica*. 2014; 34: 101-7.
5. Mitchell HM, Rocha GA, Kaakoush NO, O'Rourke JL, Queiroz DM. The family *Helicobacteraceae*. En: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. The Prokaryotes. Berlin: Springer Heidelberg; 2014. p. 337-92.
6. Ledesma Z, Gutiérrez B, Cirión G, Lemus MV, Sanabría J, Romero T, *et al.* Diagnóstico histológico de la infección por *Helicobacter pylori* en Pinar del Río, Cuba. *Vaccinomotot*. 2010 [citado 25 May 2017]; 19(2):4.
7. Gupta RS. Identification of Conserved Indels that are Useful for Classification and Evolutionary Studies. En: Michael Goodfellow IS, Jongsik C. *Methods in Microbiology*. Vol. 41. New York: Academic Press; 2014. p. 153-82.
8. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007; 23(21): 2947-8.
9. Hall B. Comparison of the accuracies of several phylogenetic methods using protein and DNA sequences. *Mol Biol Evol*. 2005; 22(3): 792-802.
10. Yi H, Yong D, Lee K, Cho Y-J, Chun J. Profiling bacterial community in upper respiratory tracts. *BMC Infectious Diseases*. 2014; 14(1): 583.
11. Medell M, Hart M, Duquesne A, Espinosa F, Valdés R. Nosocomial ventilator-associated pneumonia in Cuban intensive care units: bacterial species and antibiotic resistance. *MEDICC Rev*. 2013; 15(2): 26-9.

12. Méndez Leyva, Begué Dalmau N, Tamayo Heal S, Alonso Vázquez A, Fías Chan NV. Infección por *Helicobacter pylori* en el municipio de Palma Soriano durante el período 2008-2014. MEDISAN. 2016 [citado 25 May 2017]; 20(11): 2339-44.
13. Salama NR, Hartung ML, Müller A. Life in the human stomach: persistence strategies of the bacterial pathogen *Helicobacter pylori*. Nature reviews Microbiology. 2013; 11(6): 385.
14. Bento-Miranda M, Figueiredo C. *Helicobacter heilmannii* sensu lato: An overview of the infection in humans. World J Gastroenterol. 2014; 20(47):17779-87.
15. Gupta RS, Sethi M. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Fusobacteria and its distinct subclades. Anaerobe. 2014; 28: 182-98.
16. Ho J, Adeolu M, Khadka B, Gupta RS. Identification of distinctive molecular traits that are characteristic of the phylum "Deinococcus-Thermus" and distinguish its main constituent groups. Systematic and Applied Microbiology. 2016; 39(7):453-63.

Recibido: 1 de marzo de 2017.

Aprobado: 29 de noviembre de 2017.

Ania Margarita Cutiño Jiménez. Universidad de Oriente, Patricio Lumumba s/n esq. Avenida Las Américas, Santiago de Cuba, Cuba. Correo electrónico: aniacutino@uo.edu.cu

Anexo. Lista de las especies incluidas en el estudio con su nomenclatura

Nomenc.	Especie	Nomenc.	Especie
ACIBA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	MARAL	<i>Marinobacter algicola</i>
ACIBE	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	MARAQ	<i>Marinobacter aquaeolei</i>
ACICA	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	MICDE	<i>Microbulbifer degradans</i>
ACIGE	<i>Acinetobacter gernerii</i>	MORCA	<i>Moraxella catarrhalis</i>
ACIGU	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	MORMA	<i>Moraxella macacae</i>
ACIGY	<i>Acinetobacter gyllenbergii</i>	MOROS	<i>Moraxella osloensis</i>
ACIHA	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	MORBO	<i>Moraxella bovoculi</i>
ACIJU	<i>Acinetobacter junii</i>	MORAT	<i>Moraxella atlantae</i>
ACIPI	<i>Acinetobacter pittii</i>	MORNO	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
ACIPR	<i>Acinetobacter proteolyticus</i>	NEIGO	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
ACIRA	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	NEIMA	<i>Neisseria meningitidis</i>
ACISP	<i>Acinetobacter sp.</i>	NITSA	<i>Nitratifactor salsuginis</i>
ACIUR	<i>Acinetobacter ursingii</i>	NITSP	<i>Nitratiruptor sp.</i>
ACTPL	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	NITMO	<i>Nitrococcus mobilis</i>
ALCBO	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	NITOC	<i>Nitrosococcus oceani</i>
ARCSK	<i>Arcobacter skirrowii</i>	PALAT	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>
ARCNI	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	PALHA	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>
ARCTH	<i>Arcobacter thereius</i>	PASMU	<i>Pasteurella multocida</i>
ARCCR	<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	PSEAE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AZOBE	<i>Azotobacter beijerinckii</i>	PSECI	<i>Pseudomonas citronellolis</i>

AZOVI	<i>Azotobacter vinelandii</i>	PSEFU	<i>Pseudomonas fulva</i>
BARHE	<i>Bartonella henselae</i>	PSEFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BORBR	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	PSEMO	<i>Pseudomonas mosselii</i>
BRUME	<i>Brucella melitensis</i>	PSEPU	<i>Pseudomonas putida</i>
CAMSH	<i>Campylobacter showae</i>	PSEPR	<i>Pseudomonas protegens</i>
CAMJE	<i>Campylobacter jejuni</i>	PSEPS	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
CAMUP	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	PSERE	<i>Pseudomonas resinovorans</i>
CAMCO	<i>Campylobacter coli</i>	PSEST	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
CAMCN	<i>Campylobacter concisus</i>	PSESY	<i>Pseudomonas syringae</i>
CAMFE	<i>Campylobacter fetus</i>	PSYAR	<i>Psychrobacter arcticus</i>
CAMRE	<i>Campylobacter rectus</i>	PSYAL	<i>Psychrobacter alimentarius</i>
CAMGR	<i>Campylobacter gracilis</i>	PSYAQ	<i>Psychrobacter aquaticus</i>
DESVU	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	PSYCR	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>
ECOLI	<i>Escherichia coli</i> K12	PSYPE	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>
ERWCA	<i>Erwinia carotovora</i>	PSYPI	<i>Psychrobacter piscatorii</i>
GEOSP	<i>Geobacter sp</i>	PSYSP	<i>Psychrobacter sp.</i>
GEOSU	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	PSYUR	<i>Psychrobacter urativorans</i>
HAEDU	<i>Haemophilus ducreyi</i>	RICTY	<i>Rickettsia thyphi</i>
HAEIN	<i>Haemophilus influenzae</i>	SALEN	<i>Salmonella enterica</i>
HAESO	<i>Haemophilus somnus</i>	SALTY	<i>Salmonella typhimurium</i>
HELHE	<i>Helicobacter hepaticus</i>	SHEAM	<i>Shewanella amazonensis</i>
HELTY	<i>Helicobacter typhlonius</i>	SHEDE	<i>Shewanella denitrificans</i>
HELPA	<i>Helicobacter pametensis</i>	SHEFR	<i>Shewanella frigidimarina</i>
HELCE	<i>Helicobacter cetorum</i>	SHIBO	<i>Shigella boydii</i>
HELAC	<i>Helicobacter acinonychis</i>	SHIFL	<i>Shigella flexneri</i>
HELPI	<i>Helicobacter pylori</i>	SULCA	<i>Sulfurospirillum cavolei</i>
HELHI	<i>Helicobacter heilmannii</i>	SULHA	<i>Sulfurospirillum halorespirans</i>
HELAI	<i>Helicobacter ailurogastricus</i>	VENGR	<i>Ventosimonas gracilis</i>
HELFE	<i>Helicobacter fennelliae</i>	VIBCH	<i>Vibrio cholerae</i>
HELBI	<i>Helicobacter bizzozeronii</i>	VIBFI	<i>Vibrio fischeri</i>
HELRO	<i>Helicobacter rodentium</i>	VIBPA	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
HELCA	<i>Helicobacter canadensis</i>	VIBVU	<i>Vibrio vulnificus</i>
HELWI	<i>Helicobacter winghamensisnt</i>	WOLSU	<i>Wolinella succinogenes</i> DS
HELAP	<i>Helicobacter apodemus</i>	YERBE	<i>Yersinia bercovieri</i>
HELPU	<i>Helicobacter pullorum</i>	YEREN	<i>Yersinia enterocolitica</i>
		YERPE	<i>Yersinia pestis</i>
