

Estado del arte sobre proteómica de la infección por *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas

María Elvira Díaz Macías

**Trabajo de grado
Presentado como requisito parcial para optar al título de
BACTERIÓLOGO**

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias
Carrera de Bacteriología
Bogotá D.C.
2009**

Estado del arte sobre proteómica de la infección por *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas

María Elvira Díaz Macías

Directora: ALBA ALICIA TRESPALACIOS RANGEL, MSc.

Pontificia Universidad Javeriana

Facultad de Ciencias

Carrera de Bacteriología

Bogotá D.C.

2009

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Estado del arte sobre proteómica de la infección por *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas

María Elvira Díaz Macías

APROBADO

Ingrid Schuler Ph.D
Decana Académica
Facultad de ciencias

Dra. Luz Amparo Maldonado
Directora carrera de Bacteriología

TABLA DE CONTENIDO

		pág.
Tabla de contenido		
Lista de figuras		
Lista de tablas		
1.	INTRODUCCIÓN	
2.	ANTECEDENTES Y MARCO TEORICO	13
2.1	Historia	14
2.2	Implicación clínica de la infección por <i>Helicobacter pylori</i>	16
2.2.1	Asociación de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y Gastritis crónica	17
2.2.2	Asociación de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y Úlcera péptica	18
2.2.3	Asociación de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y Cáncer gástrico	18
2.2.4	Asociación de la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y Linfoma gástrico tipo MALT	21
2.3	Proteómica	23
2.3.1	Proteoma	24
2.3.2	Orígenes de la proteómica	25
2.3.3	Técnicas proteómicas	25
2.3.3.1	Electroforesis bidimensional 2-DE	26
2.3.3.2	Espectrometría de masas MS	28

2.3.3.3	Técnica LC-MS/MS	29
2.3.3.4	Microarrays de proteínas	29
2.3.4	Protocolo	30
2.3.5	Bases de datos	32
2.3.6	Aplicaciones de la proteómica	33
2.4	Secuenciación genómica de <i>Helicobacter pylori</i>	33
2.4.1	Genoma de <i>Helicobacter pylori</i> cepa 26695	34
2.4.2	Genoma de <i>Helicobacter pylori</i> cepa J99	34
2.4.3	Genoma de <i>Helicobacter pylori</i> cepa HPAG1	34
2.4.4	Genoma de <i>Helicobacter pylori</i> cepa G27	35
2.5	Identificación proteómica de <i>Helicobacter pylori</i>	35
2.5.1	Análisis proteómico cepa 26695 de <i>Helicobacter pylori</i>	35
2.5.2	Análisis proteómico de la cepa de referencia NCTC 11637 de <i>Helicobacter pylori</i>	37
2.5.3	Identificación de proteínas extracelulares de Cepas de <i>Helicobacter pylori</i> mediante técnicas Proteómicas	38
2.5.4	Estudios proteómicos para evaluar proteínas Expresadas bajo estrés oxidativo	39
2.6	Identificación proteómica de enfermedades Asociadas a <i>Helicobacter pylori</i>	41
2.6.1	Asociación proteómica de la infección por <i>Helicobacter Pylori</i> y cáncer gástrico.	41
3.	JUSTIFICACIÓN	46
4.	OBJETIVOS	47
4.1	Objetivo general	47
4.2	Objetivos específicos	47
5.	METODOLOGÍA PARA LA INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE ARTÍCULOS	48
5.1	Criterios de inclusión	48

5.1.1	Año de publicación	49
5.1.2	Idioma	49
5.1.3	Bases de datos	49
5.1.4	Palabras claves	49
5.2	Criterios de exclusión	49
5.3	Estrategia de búsqueda de artículos	50
5.4	Encabezados temáticos en inglés	51
5.5	Encabezados temáticos en español	51
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
6.1	Técnicas proteómicas	53
6.2	Avances en la caracterización de <i>Helicobacter pylori</i> En la actualidad	55
6.3	Correlación proteómica entre la infección de <i>Helicobacter pylori</i> y enfermedades asociadas	70
7.	CONCLUSIONES	77
8.	RECOMENDACIONES	79
9.	BIBLIOGRAFÍA	80

TABLA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Secuencia de cambios biológicos que anteceden la aparición de cáncer gástrico	20
Figura 2.	Esquema general de la separación de proteínas Mediante técnica de 2- DE	27
Figura 3.	Esquema general para análisis proteómico	31
Figura 4.	Comportamiento de la enzima ureasa en un intervalo De 0-36 horas bajo tensión oxidativa	40
Figura 5.	Diagrama de Venn que muestra antígenos Diferenciados según distintas patologías gástricas	44
Figura 6.	Técnicas utilizadas en los estudios sobre proteómica De <i>Helicobacter pylori</i> y enfermedades asociadas	54
Figura 7.	Intensidad de expresión en proteínas de <i>Helicobacter pylori</i> 26695 con variaciones de pH entre 5-8	58
Figura 8.	Precipitación de proteínas con sulfato de amonio en un extracto celular de la cepa 26695	66
Figura 9.	Proteínas identificadas en un extracto celular con diferente saturación de sulfato de amonio	67
Figura 10.	Comportamiento de la enzima ureasa bajo tensión oxidativa de 20% O ₂	69

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Progresión de lesiones en la mucosa gástrica Normal hasta linfoma MALT	22
Tabla 2. Características de estudios realizados para Analizar el proteoma de <i>Helicobacter pylori</i> hasta La fecha	55
Tabla 3. Spots con mayor intensidad en proteínas de <i>Helicobacter Pylori</i> 26695	57
Tabla 4. Proteínas de <i>Helicobacter pylori</i> identificadas Mediante MALDI –TOF-MS	59
Tabla 5. Proteínas expresadas por las cepas 26695 y 43504 de <i>Helicobacter pylori</i> en una fracción extracelular Enriquecida	63
Tabla 6. Proteínas identificadas mediante precipitación con sulfato de amonio en <i>Helicobacter pylori</i> 26695	68
Tabla 7. Características de los estudios proteómicos Realizados para analizar la infección por <i>Helicobacter pylori</i> y Enfermedades asociadas	70

Tabla 8.	Antígenos de <i>Helicobacter pylori</i> 26695 asociados a cáncer gástrico y úlceras	71
Tabla 9.	Características de antígenos asociados a cáncer gástrico identificados mediante técnica MALDI-MS	73
Tabla 10.	Proteínas de <i>Helicobacter pylori</i> 26695 reconocidas Por sueros de pacientes con cáncer gástrico con Frecuencias Mayores a 10	74
Tabla 11.	Características de sueros de los pacientes utilizados En comparación proteómica entre cáncer gástrico y Úlcera Duodenal	75
Tabla 12.	Lista de proteínas identificadas de los 14 spots Con Mayor significancia en un estudio Inmunoproteómico	76

DEDICATORIA

A Leonardo y Valeria, mi esposo e hija, por su gran paciencia, confianza y amor conmigo; los pilares más importantes en mi vida y en quienes me apoyo para la realización de mis sueños.

MARIA ELVIRA DIAZ MACIAS

1. INTRODUCCIÓN

Helicobacter pylori, muestra un patrón único y complejo de componentes moleculares que se unen al complejo de carbohidratos presentes en la mucosa y otros tejidos del huésped. Estas moléculas de adhesión son conocidas como adhesinas. Estas adhesinas y otras proteínas asociadas a membranas son importantes objetivos en el desarrollo de vacunas. La identificación y caracterización de proteínas expresadas por la superficie celular de esta bacteria, es un pre-requisito para el desarrollo de vacunas diseñadas para interferir en la colonización bacteriana de tejidos del huésped.

La proteómica constituye una etapa en la investigación biológica, que emana naturalmente de la genómica, y que incluye la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma en un estadio fisiológico determinado y el establecimiento de sus propiedades funcionales y estructurales. Los genomas definen el contenido informacional de los organismos y por lo tanto definen la tipología del organismo. La secuencia del genoma no aporta información de la manera como funciona un organismo, para tener respuestas a la pregunta de ¿cómo funciona el organismo?, es necesario estudiar las proteínas, es decir, es necesario acercarnos a la proteómica (Anderson et al 1998)

Para muchos microorganismos, los proyectos de investigación se encuentran en una era post-genómica, como es el caso de *Helicobacter pylori*. La comparación de la secuencia genética de cepas virulentas con las de "baja virulencia," ha proporcionado la identificación de las bases genéticas de la patogenicidad bacteriana de este microorganismo. (Veicuiescu et al 1997)

Las técnicas de proteoma (electroforesis de alta resolución en dos dimensiones y la Caracterización de proteínas, entre otras) son usadas en gran escala en la investigación microbiana para analizar la síntesis global de proteínas como un indicador de la expresión genética de la bacteria. (Latterich M et al 2008)

Aproximadamente la mitad de la población mundial está infectada por *Helicobacter pylori*, bacteria que presenta un modelo peculiar de infección de "bajo ruido" y prolongado, que suele extenderse durante toda la vida. Su presencia ocasiona la mayor parte de los casos de gastritis crónica en el ser humano, desempeña un papel causal importante en la úlcera gástrica y gastroduodenal, incrementa el riesgo de padecer cáncer gástrico y linfoma del Tejido Linfoide Asociado a las Mucosas tipo MALT. (Yan J et al 2005)

La habilidad de los microorganismos patógenos para causar enfermedades en hospederos susceptibles es determinada por múltiples factores que actúan individualmente o en grupo durante diferentes grados de la infección. Por ejemplo, los dos más importantes factores de virulencia, en *Helicobacter pylori* *VacA* y *CagA*, han sido identificados y se sabe que se encuentran involucrados en distintos aspectos de la patogénesis de esta bacteria. El *CagA* es actualmente un marcador de una isla de patogenicidad que contiene 29 genes. El proteoma tiene el potencial de proporcionar una importante información acerca del control de la expresión de esos genes en aislados de *H.pylori CagA+*. (Tomb j et al 1997).

La proteomica permite analizar la síntesis de proteínas y por extensión la expresión genética, lo que convierte a esta técnica en una poderosa herramienta de estudio para comparar proteínas sintetizadas por cepas bacterianas virulentas y no virulentas; y la implicación de las mismas en el desarrollo o la evolución hacia desordenes gastrointestinales.

2. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Helicobacter pylori es un bacilo en forma de espiral, que presenta unas dimensiones de 0,5 a 1,0 μm de ancho y de 3 μm de largo, Gram negativo, que posee múltiples flagelos bipolares e incluso laterales que están recubiertos por una vaina de estructura lipídica, igual que la membrana externa, que tiene la misión de proteger a los flagelos de su degradación por el medio ácido del estomago. El aislamiento de *H. pylori* puede obtenerse después de 5 a 7 días de incubación a 37°C, en atmósfera microaerofílica a partir del aislamiento primario, o de 48 h en sub-cultivo. Las colonias tienen una morfología característica: brillantes, grisáceas, pequeñas, de aproximadamente 1 mm de diámetro. Las pruebas bioquímicas de catalasa, oxidasa y ureasa positivas identifican el aislamiento como *H. pylori*. (Kusters et al., 2006).

Otras pruebas bioquímicas que se pueden realizar son la hidrólisis del hipurato y la reducción de los nitratos (que son negativas). Produce gamma-glutamil transpeptidasa, fosfatasa alcalina y fosfatasa ácida (Goodwin 1990). No fermenta glucosa ni otros carbohidratos (Megraud 1985).

En el cultivo en medio sólido puede ser deficiente en flagelos (Goodwin 1990) y las formas espirales pueden ser escasas o estar ausentes y generalmente no se observan tan curvados (Armstrong 1987, Megraud 1988).

Pueden aparecer formas cocoides, después de múltiples pases en el laboratorio, posiblemente como respuesta a condiciones nutricionales desfavorables; estas formas también se han observado en heces. (Mai 1989).

Desde su descubrimiento y caracterización ha sido implicada en la fisiopatología de enfermedades gastroduodenales, que incluyen gastritis, úlcera péptica, carcinoma gástrico, y linfoma MALT, dando origen a numerosas hipótesis que tratan de explicar los diferentes eventos que ocurren en el proceso inflamatorio del estómago a su llegada, caracterizado por una marcada infiltración de células inflamatorias (neutrófilo, monocitos, linfocitos y otras), que al ser activadas liberan localmente varios mediadores químicos, responsables del daño tisular; se destacan las citocinas como mediadores importantes de tal proceso. (Ellmark et al 2006).

2.1. HISTORIA

En 1893, Bizzozero observó por primera vez microorganismos curvados y espirales en la mucosa de estómago de perros (Jungblut et al., 2000).

Trabajos posteriores corroboraban la existencia de microorganismos espirales o “espiroquetas” en la capa de mucina de estómago de hombres y animales (Salomón 1896) y en pacientes con carcinoma gástrico (Kreintz 1906).

En 1939, Doenges describió organismos con 2 ó 3 espirales en el 43% de 242 estómagos estudiados, pero no lo pudo relacionar con patología gástrica (Doenges 1939). En 1940, Freedberg y Barron demostraron microscópicamente la presencia de este tipo de bacterias en muestras de estómago de diferentes pacientes, relacionándolo con úlcera gástrica (Freedberg 1940).

En 1950, Fitzgerald y Murphy estudiaron la ureasa gástrica en estómagos de personas con enfermedad ulcerosa péptica, sugiriendo que protegía la mucosa gástrica del ácido mediante la formación de amonio (Fitzgerald 1950).

En 1975. Steer y col. estudiaron muestras de pacientes con úlcera gástrica, utilizando microscopio electrónico, y observaron la presencia de microorganismos con forma espiral, bajo la capa de moco y en la mucosa, asociados a una respuesta inflamatoria (Steer 1975).

El verdadero descubrimiento de estas bacterias se realizó en 1983. Cuando Warren y Marshall publicaron los resultados de los trabajos que estaban realizando desde el principio de esa década. Observaron bacterias curvadas en la superficie de la mucosa antral humana, en un grupo de pacientes con gastritis crónica activa tipo B (Warren 1983, Marshall 1984). Marshall inoculó muestras de mucosa gástrica en los medios de cultivo habituales, incubó las placas durante 5 días (con motivo de unas vacaciones) y obtuvo por primera vez el cultivo de *Helicobacter pylori*.

Entre los hallazgos científicos más importantes y de mayor trascendencia alrededor del microorganismo *Helicobacter pylori* se pueden encontrar:

1. Detección de numerosos factores de virulencia, que permiten un mejor conocimiento de la patogénesis y desarrollo de la enfermedad. (Lee 1993).
2. Amplios conocimientos en la genética del microorganismo y en la secuenciación de la mayor parte de su genoma. (Taylor 1992).
3. Detección del microorganismo en muestras de agua y reservorios animales, que mejora el conocimiento de la epidemiología y de la Forma de transmisión de esta bacteria. (Fox 1995, Hultén 1995, Schauer 1995).
4. Desarrollo de diferentes métodos de diagnóstico no invasivo que, aunque con limitaciones, permiten tener más datos de la

epidemiología de la infección por este microorganismo y en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes después del tratamiento. (Thomas 1994, Sanz 1994).

5. Relación de este microorganismo como factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer gástrico. (Eurogast Study Group 1993).
6. Asociación con linfomas tipo MALT (Wotherspoon 1991) y curación de estos cuando se encuentran en bajo grado, mediante la erradicación del microorganismo con tratamiento antibiótico. (Hussell 1993, Stolte 1993).

2.2 IMPLICACIÓN CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori*

La infección por *H. pylori* es responsable de prácticamente todos los casos de gastritis crónica activa y duodenitis (Axon 1989); el microorganismo se encuentra en el 90% de las úlceras duodenales y aproximadamente en el 70-80% de las úlceras gástricas (Marshall 1994, Boixeda 1994); es un factor de riesgo importante en el desarrollo del cáncer gástrico (Parsonnet 1993). Y un 90% de los linfomas tipo MALT están asociados con *H. pylori* (Isaacson 1992, Wotherspoon 1993) (linfoma tipo MALT = Mucosa-Associated Lymphoid Tissue). En contraste con estos datos, menos del 10% de adultos y niños con mucosa gástrica normal están colonizados con *Helicobacter pylori*. (Morgan 1989).

2.2.1 Asociación de la infección por *Helicobacter pylori* y Gastritis crónica:

La gastritis crónica se considera un proceso inflamatorio, no específico, de causa multifactorial. Existe una clasificación patogenética que divide a la

gastritis crónica en dos variedades: tipo A y tipo B. El tipo A afecta principalmente al cuerpo del estómago, con destrucción de las células parietales. La gastritis crónica tipo B afecta principalmente al antro, aunque puede extenderse también al cuerpo del estómago, con destrucción de las células secretoras de moco.

En esta clasificación la gastritis conocida previamente como tipo B se denomina “gastritis crónica asociada a *Helicobacter pylori* que puede presentar actividad o no.

La gastritis atrófica y la metaplasia intestinal son precursores histológicos conocidos del adenocarcinoma gástrico distal tipo intestinal. La gastritis del cuerpo gástrico se asocia con el mayor riesgo de CG (riesgo relativo [RR] = 34,5).

Helicobacter pylori coloniza el epitelio gástrico e induce una reacción inflamatoria crónica que puede persistir durante toda la vida del paciente. La extensión y la gravedad de la inflamación de la mucosa gástrica, así como la evolución clínica de la infección, dependen de numerosos factores, como la virulencia de *Helicobacter pylori*, la predisposición genética del huésped, la respuesta inmunitaria, la edad en que se adquirió la infección y los factores alimentarios. (Guo 2004).

En la gastritis crónica atrófica, por la hipoclorhidria se favorece la aparición de sobrepoblación bacteriana gástrica y altas concentraciones de nitritos en el lumen gástrico. Los nitritos en combinación con aminas y amidas originan N-nitroso compuesto, sustancias con gran potencialidad mutagénica y carcinogénica. Compuestos N-nitroso también pueden ser generados durante el proceso inflamatorio de la mucosa gástrica. (León 2000).

2.2.2 Asociación de la infección por *Helicobacter pylori* y úlcera péptica:

La asociación entre *Helicobacter pylori* y úlcera péptica fue descrita en uno de los primeros trabajos de Marshall y Warren (1.984). Estos investigadores encuentran a este microorganismo en el 100% de los pacientes con úlcera duodenal y el 77% de los pacientes con úlcera gástrica.

Determinadas cepas de *Helicobacter pylori*, la cual posee en su genoma bacteriano un gen que expresa una sustancia tóxica para las células que forman el epitelio de la mucosa gástrica y que es conocida como VacA (siglas por "Citotoxina Vacuolizante A"), son capaces de inducir, además de la habitual gastritis crónica, una úlcera de estómago, gracias a una mayor virulencia en la expresión de VacA. Para ejercer su acción tóxica celular, tanto en uno como en otro caso, la toxina VacA ha de acoplarse con un receptor situado en la superficie de estas células, conocido con las siglas Ptpz. (Fujikawa et al 2003)

2.2.3 Asociación de la infección por *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico:

El adenocarcinoma gástrico (ADCA) es una de las pocas neoplasias malignas para la cual se ha establecido que agentes infecciosos tienen un reconocido e importante rol etiológico. (Corea P. 2008).

El cáncer gástrico es la cuarta neoplasia maligna más común en el mundo y la segunda causa de muerte por cáncer anualmente, totalizando más de un millón de defunciones por año, siendo el adenocarcinoma del estómago el tumor más frecuente (95%).(Taley 2008).

Su frecuencia de presentación varía entre diferentes zonas geográficas siendo Colombia uno de los países con mayor incidencia en el mundo y donde encontrándose regiones, como Nariño y Boyacá, con incidencia de

160 por cada 100.000 habitantes que es dos a tres veces mayor que en el resto del país sin que se tenga una explicación clara para esta variación. Con un riesgo relativo que oscila entre 2.6 y 6. (Rodriguez y colaboradores., 2000).

La asociación entre *H. pylori* y CG se demostró en numerosos estudios de casos y controles y esta asociación fue considerada suficiente por el Grupo de Trabajo del Organismo Internacional de Investigación sobre Cáncer de la OMS (*Working Group of the International Agency for Research on Cancer/World Health Organization*) para reconocer a *H. pylori* como un carcinógeno grupo I para los seres humanos en 1994. (Guo 2004).

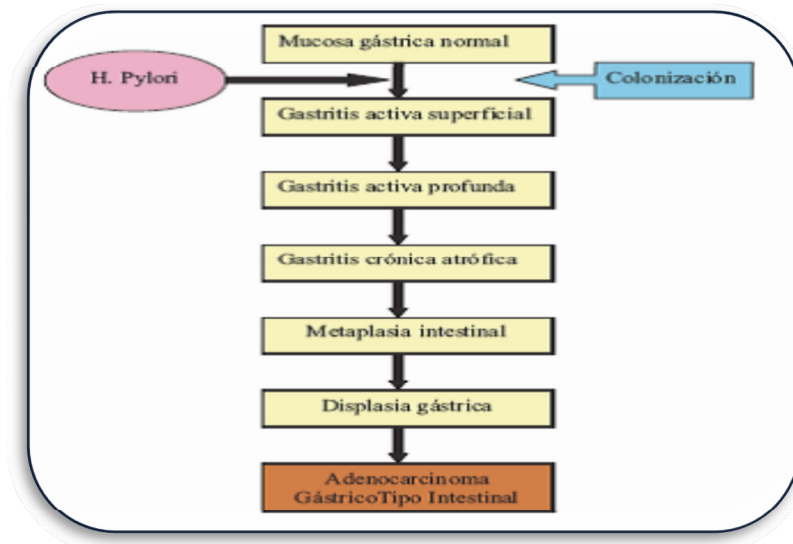
El CG se puede dividir en dos tipos histológicos principales: el tipo intestinal (bien diferenciado) y el tipo difuso. El CG de tipo intestinal es más común, tiende a aparecer en pacientes de más edad y se relaciona más estrechamente con factores ambientales y alimenticios. El CG de tipo difuso puede tener antecedentes genéticos más sólidos, es menos diferenciado y tiende a ser más agresivo. Estudios recientes indican que ambos tipos se vinculan muy estrechamente con la infección por *H. pylori* (Guo 2004).

Una observación importante es que el cáncer no se desarrollaría en las células epiteliales gástricas per se, sino en células derivadas de la médula ósea que se diferencian en células gástricas en presencia de *Helicobacter pylori*, hipótesis planteada con el nombre de “migración de células de la médula ósea”. (Corea P. 2008).

Ciertos polimorfismos en la interleuquina 1 beta y otras citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF - A) incrementan el riesgo de desarrollar adenocarcinoma gástrico, al inducir una respuesta de tipo atrófica e hipoclorhidria en la mucosa gástrica en respuesta a la infección por *Helicobacter pylori*.

Se considera que la presencia de esta bacteria es un factor necesario en la cadena de la carcinogénesis en la mayoría de pacientes que desarrollan ADCA gástrico intestinal o diferenciado. El doctor Pelayo Correa, basado en sus estudios llevados a cabo en las áreas endémicas de cáncer gástrico tanto en Colombia (departamento de Nariño y altiplano Cundiboyacense) como en otros países donde la prevalencia e incidencia de esta neoplasia es notablemente alta (Chile y Japón), ha formulado una secuencia o continuo biológico según el cual en las áreas de riesgo hay diversos factores (genéticos, del medio ambiente, dietéticos, etc.) que favorecen que los pacientes evolucionen de una gastritis crónica superficial a una difusa, luego presenten gastritis crónica atrófica multifocal con cambios de metaplasia intestinal, inicialmente de tipo completo o intestino delgado y, posteriormente, de tipo incompleto o intestino grueso, las cuales pueden presentar cambios displásicos de severidad creciente y, finalmente, se desarrolle un carcinoma gástrico de variante intestinal. **Figura número 1**

Figura número 1. Secuencias de cambios biológicos que anteceden la aparición de cáncer gástrico. (Pelayo et al., 1988).



2.2.4 Asociación de la infección por *Helicobacter pylori* y linfoma gástrico tipo MALT

El linfoma MALT es un Linfoma no Hodgkin de células B, extranodal, que predomina en la edad adulta, más frecuente en mujeres y que constituye el 5-10 % de las neoplasias gástricas. Suele existir antecedente de enfermedad autoinmune o inflamatoria. (Isaacson et al 1983).

En concreto el linfoma MALT se asocia con el Síndrome de Sjögren, tiroiditis de Hashimoto y gastritis asociada a *Helicobacter pylori*. El tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma tipo MALT = Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) puede experimentar un cambio malignizante. Un 90% de estos linfomas están asociados con *H. pylori*. (Isaacson 1992).

Existe una estrecha relación entre la infección por el *Helicobacter Pylori* (Hp) y el desarrollo de linfoma MALT gástrico, demostrado por diferentes estudios. Fue en 1988 cuando Wyatt y Rathbone describieron por primera vez la asociación entre la colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* y la identificación de folículos linfoides en dicha localización. Un año después, Stolte y Eidt confirmaron estos hallazgos al estudiar más de 2.000 biopsias con gastritis asociada a la infección. Con posterioridad, se ha descrito la presencia de folículos linfoides en la mucosa gástrica en el 27-100% de los pacientes infectados por *H. pylori*. (Gisbert et al., 1998).

Las primeras relaciones de tipo epidemiológico que se establecieron entre *H pylori* y linfoma MALT corresponden al año 1991 con los trabajos de Parsonnet, que describe un 90,9% de prevalencia de *H pylori* en 11 casos de linfoma gástrico tipo MALT. Ese mismo año Wotherspoon presenta una serie mucho más amplia con 110 linfomas gástricos MALT, entre los que registra un 92% de prevalencia de *Helicobacter pylori* (+). (Borda et al., 1998).

El proceso comienza con una colonización e inflamación aguda de la mucosa gástrica por el Hp con destrucción de faveolas gástricas. *Helicobacter pylori* se aloja en ellas creando una nube de amonio gracias a que posee una enzima, la ureasa, para defenderse del medio ácido. Allí actúa extracelularmente sobre las vacuolas de mucina, provocando en muchos casos una erosión de la mucosa. (Wotherspoon et al., 1993).

La inflamación aguda evoluciona a una inflamación crónica, con aumento de linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. Inicialmente puede existir una gastritis antral difusa y los linfocitos emigran al territorio gástrico, hasta los capilares de la lámina propia. En el curso de la gastritis crónica pueden aparecer folículos linfoides y agregados linfáticos en la base de la mucosa gástrica, lo que constituye el llamado tejido MALT. Este es el substrato anatómico necesario para que se desarrolle un linfoma MALT. Wotherspoon estableció una graduación anatómica, en la que se esquematiza la progresión de las lesiones desde una mucosa normal hasta el linfoma MALT de bajo grado. **Tabla número 1.**

Tabla número 1. Progresión de lesiones en la mucosa gástrica normal hasta linfoma MALT. (Wotherspoon 1998).

GRADUACIÓN	DESCRIPCIÓN
1	Normal
2	Gastritis crónica activa
3	Gastritis crónica activa con formación de folículos linfoides
4	Infiltrado linfoide en lámina propia
5	Infiltrado linfoide en lámina propia, probablemente linfoma
6	Linfoma MALT de bajo grado

2.3 PROTEÓMICA

La Proteómica es una disciplina comparativa que identifica y caracteriza aquellas proteínas que diferencian, a nivel de expresión o de modificación química o estructural, la célula o el tejido enfermo del sano. Esas proteínas diferenciales serán los marcadores con los que se pueda llegar a desarrollar métodos de predicción, diagnóstico, pronóstico o respuesta a fármacos de la enfermedad en estudio; esas proteínas diferenciales también podrán ser candidatas a dianas terapéuticas.

La proteómica es la nueva etapa en la investigación biológica que emana naturalmente de la genómica y que incluye la caracterización de la expresión de las proteínas codificadas por un genoma y el establecimiento de sus propiedades funcionales y estructurales. (Anderson 1998).

Ni la estructura primaria del gen ni la del RNAm ni de la proteína misma dan indicaciones claras de la naturaleza del producto proteico ni de su función; por lo tanto, la primera tarea de la proteómica consiste en identificar las proteínas producidas por un genoma. Es decir, principalmente problemas tecnológicos frente a cómo se pueden separar y visualizar las proteínas en un proteoma, cómo se puede utilizar esta información para estudiar complejos proteicos y caminos metabólicos, cómo se pueden identificar proteínas separadas y cómo se pueden caracterizar en detalle tales proteínas.

De este modo, se pueden caracterizar las redes funcionales que establecen las proteínas y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos. Las proteínas presentan alrededor de 300 diferentes tipos de modificaciones postraduccionales, incluyendo fosforilación, glicosilación, acetilación, y deaminación, entre otras. Estas modificaciones pueden afectar la estructura, localización, función y recambio, e implican funciones reguladas por factores internos y externos a las células, desencadenando procesos de expresión

genética diferencial. Como resultado de estas variaciones se produce la diferenciación celular y pueden originarse determinadas patologías. (Pando 2007).

2.3.1 Proteoma

El proteoma de un organismo representa el total de proteínas expresadas por un genoma. (Thompson et al., 2002). Los proteomas son dinámicos y cambian con el tiempo, con el estadio del desarrollo y con las condiciones intra y extracelulares. El proteoma de una célula varía según el estado en el que se encuentre la célula, si se encuentra en una situación de estrés, bajo el efecto de fármacos o de una hormona. Así, en cada momento y en cada tipo celular el perfil de proteínas expresadas será diferente.

La proteómica es el estudio de los proteomas; separa, identifica y caracteriza proteínas a gran escala, define niveles de proteínas celularmente, investiga complejos de proteínas, elucida funciones, caminos metabólicos e interrelaciones, también se encarga de la caracterización funcional de tales proteínas y de sus relaciones estructurales. (Kenyon 2002).

Existen tres ramas en la proteómica que tratan de caracterizar el proteoma estudiando distintos aspectos del mismo:

1. La proteómica de expresión: se encarga del estudio de la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones postranscripcionales
2. La proteómica estructural: se encarga de la caracterización de la estructura tridimensional de las proteínas
3. La proteómica funcional: se encarga de la localización y distribución sub-celular de proteínas y de las interacciones que se producen entre las proteínas y otras moléculas con el fin de determinar su función

2.3.2. Orígenes de la proteómica

La técnica electroforética es relativamente antigua, fue inventada por Tiselius hace más de 50 años y, en 1956, Smithies y Poulick describieron el primer gel en dos dimensiones, mientras que en 1975, Patrick O'Farell optimizó el proceso de separación en 2D, técnica que se utiliza hoy en día.

En 1950, el investigador sueco E. Edman desarrolló un método que permite saber el orden de los aminoácidos en una proteína, a la que se conoce como *degradación de Edman*. Durante muchos años esta técnica fue de vital importancia en la investigación bioquímica. La secuenciación parcial de fragmentos proteínicos y el ensamblaje de esta secuencia permitió conocer en forma completa la secuencia de aminoácidos de algunas proteínas.

La posibilidad de identificar proteínas en forma global surge gracias a la modernización de la espectrometría de masas (EM). En 1985, J. Fenn y K. Tanaka desarrollaron los sistemas de ionización de macromoléculas ESI y MALDI respectivamente, por lo que se les galardonó con el Premio Nóbel de Química 2002.

2.3.3 Técnicas proteómicas

Para analizar los proteomas de células o tejidos se han desarrollado un conjunto de nuevas técnicas que se engloban en el término *Proteómica*. La Proteómica facilita el análisis cualitativo y cuantitativo de la expresión de las proteínas que existen dentro de una célula. La Genómica analiza el potencial de expresión génica y proteica de un organismo, determinado por su Genoma, pero es la Proteómica la que especifica qué proteínas se expresan en los distintos tipos de células de ese organismo, y en las distintas

situaciones fisiológicas en las que se encuentran esas células, cual es el nivel de expresión de esas proteínas y qué modificaciones post-traduccionales afectan a su estructura y función. (Patterson et al., 2003).

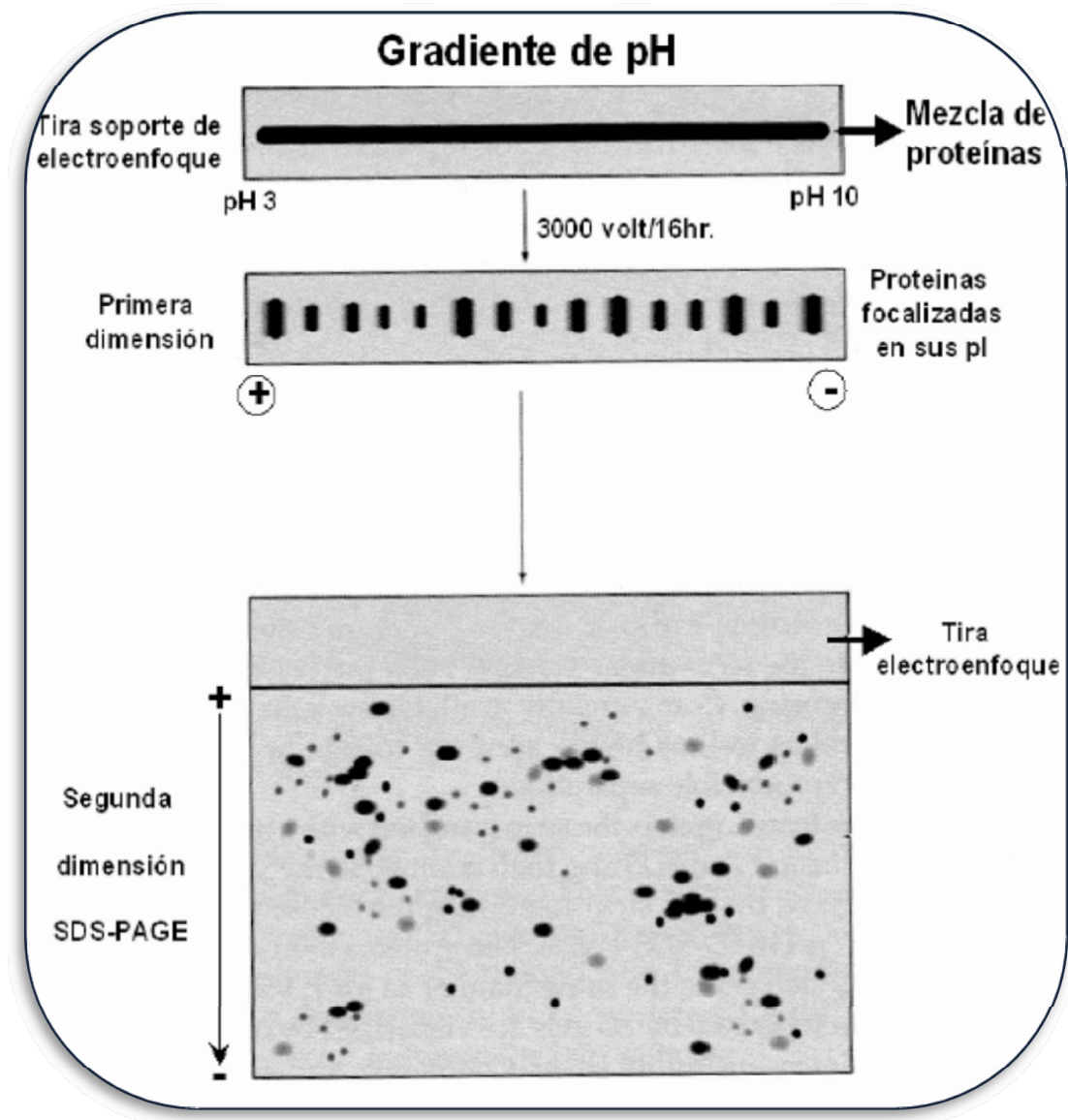
2.3.3.1 Electroforesis bidimensional 2-DE

Dentro de las aproximaciones proteómicas podemos distinguir principalmente dos bloques de técnicas de análisis de proteínas. En el primero se incluyen técnicas en las que las proteínas a estudiar no se separan, por ejemplo, las matrices de anticuerpos y de otras moléculas como alérgenos, glúcidos, otras proteínas, etc. En el segundo bloque se incluyen técnicas que implican una separación de las proteínas, como es el caso de la electroforesis bidimensional (electroforesis-2D) y la cromatografía líquida (LC).

Entre las técnicas que separan las proteínas, la LC está cobrando cada vez más importancia por su utilidad cuando se quieren separar proteínas pequeñas. En esta técnica, las proteínas de la muestra interactúan con una fase estacionaria de un modo característico, lo que se aprovecha para su separación.

Por otra parte, la técnica de separación de proteínas por excelencia es la electroforesis-2D. En este caso, las proteínas se separan en una primera dimensión en función de su punto isoeléctrico para, posteriormente, separarse ortogonalmente en una segunda dimensión en función de su masa. Esto da lugar a una serie de puntos, cada uno de los cuales corresponde a una proteína. Con esta técnica se pueden separar varios miles de proteínas en un solo gel. **Figura número 2.**

Figura número 2. Esquema general de la separación de proteínas mediante técnica de 2-DE.



Tanto la LC como la electroforesis-2D requieren otras técnicas para identificar las proteínas separadas, siendo de especial importancia para ello el desarrollo de la MS.

2.3.3.2 Espectrometría de Masas MS

Con esta técnica se puede calcular de forma muy precisa y exacta la masa de las moléculas. La obtención de información de las proteínas mediante MS se puede dividir en 3 etapas:

1. Preparación de la muestra.
2. Ionización de la muestra.
3. Análisis de masas de la muestra.

Inicialmente, las moléculas se volatilizan en forma de iones. A continuación, dichos iones pasan a un sistema analizador de masas en vacío, que usa campos eléctricos (sistemas cuadrúpolos y trampas iónicas) o no (sistemas de tiempo de vuelo), capaz de separar los iones en virtud de su relación masa/carga (m/z). Finalmente, los iones llegan a un detector y se determina su masa gracias a la separación efectuada en el paso anterior.

Existen distintas variantes para la volatilización/ionización de las moléculas, entre las que destacan, por su aplicabilidad a los péptidos y las proteínas, la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización mediante láser asistida por una matriz (MALDI).

El método de ionización por electropulverización, ESI (*electrospray ionization*), permite la ionización de moléculas a partir de flujos líquidos bajo aplicación de alto voltaje, mientras que la ionización por el método MALDI, produce iones por bombardeo con rayos láser de muestras en estado sólido auxiliado por matrices cristalizables.

En el primer caso (ESI), las moléculas en disolución se hacen pasar por un fino capilar sometido a un intenso campo eléctrico. Así, se obtiene una dispersión de la solución en microgotas en las que el solvente se evapora y las moléculas pasan a la fase gaseosa y adquieren carga.

En el segundo caso (MALDI), las moléculas se mezclan con una matriz sólida absorbente de luz. Sobre esta matriz se hace incidir un láser que provoca la ionización y desorción de las moléculas, que quedan en fase gaseosa. Tras la ionización de las moléculas por un método u otro, éstas se someten a la MS.

Otra técnica utilizada habitualmente en las aproximaciones proteómicas es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Este método consiste en someter una mezcla de péptidos a una primera MS donde se separan en función de su relación m/z . Con este procedimiento se obtiene una mezcla de «péptidos hijos» que se someten a una segunda MS, lo que da lugar a una "escalera" de tamaños en la que la diferencia entre cada "peldaño" corresponde a un solo aminoácido, lo que permite deducir la secuencia peptídica. Obtenida esta secuencia "real" de la proteína, se puede buscar en las bases de datos a qué proteína "teórica" corresponde.

2.3.3.3 Técnica LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry).

Cromatografía líquida bidimensional que utiliza una columna de intercambio iónico (separación por carga) o una columna de fase reversa (separación por hidrofobicidad). Seguida de análisis de los péptidos mediante MS. Requiere la digestión previa de las proteínas con una proteasa. Este método permite la separación de cientos de proteínas en un solo experimento.

2.3.3.4 Microarrays de proteínas

Las proteínas sufren toda una serie de modificaciones post-traduccionales a lo largo de su proceso de síntesis como: procesamientos proteolíticos,

glicosilaciones y formación de complejos proteicos. Por otra parte, las proteínas han de plegarse correctamente para ser totalmente funcionales. Las proteínas de interés en un proteoma pueden ser expresadas masivamente, purificadas, depositadas e inmovilizadas de manera individual, ordenada e independiente sobre un soporte sólido. Una mezcla compleja (lisado celular o suero) se pasa sobre el microarray para permitir la unión a su correspondiente proteína diana.

2.3.4 Protocolo

Actualmente no existe un diagrama de flujo único para el análisis proteómico de una muestra, ya que las variables como complejidad, método de separación, concentración y estabilidad de las proteínas, además de la plataforma tecnológica disponible para su análisis, y muy especialmente el tipo de pregunta biológica que se pretende abordar, son los parámetros básicos que determinan la elección de una estrategia de estudio.

Sin embargo la metodología general para el análisis proteómico de una muestra se resume en: (Corrales et al., 2006). **Figura número 3**

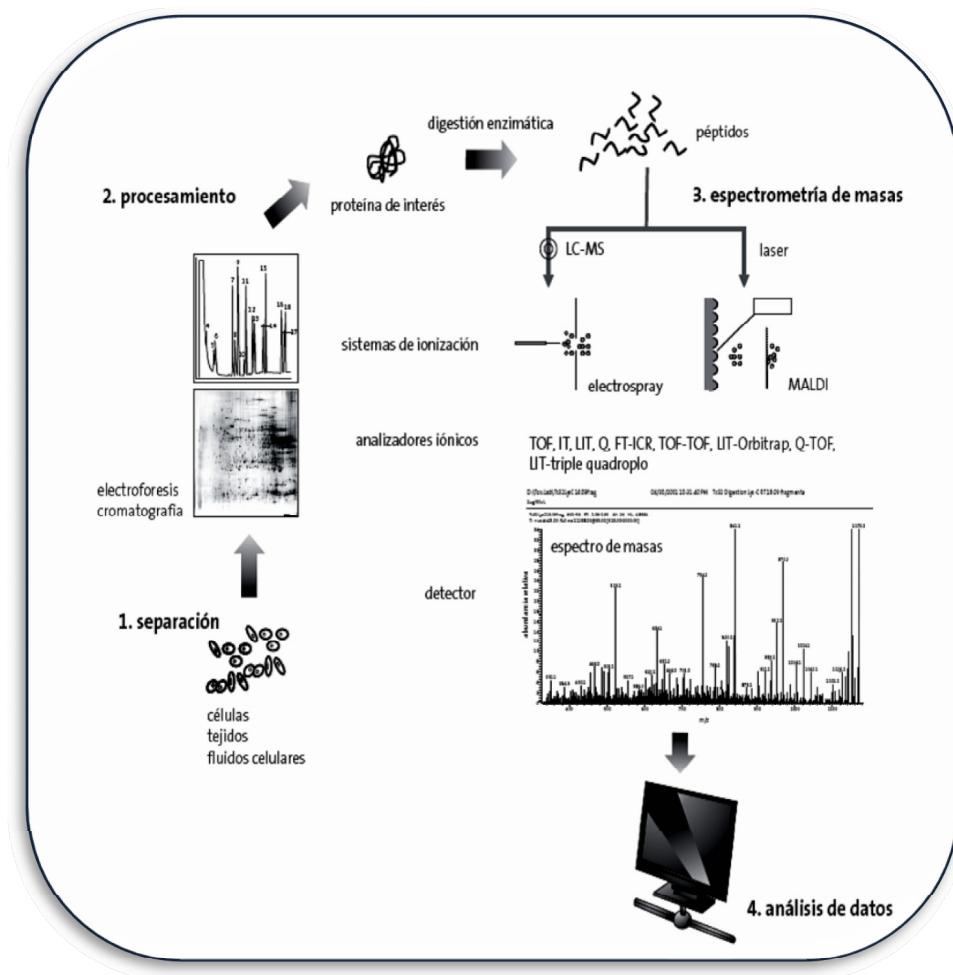
1. *Recogida y almacenamiento de muestras.* Uno de los factores clave en un experimento de proteómica
2. *Extracción y solubilización de las proteínas.* Es necesario extraer y solubilizar las proteínas con la menor contaminación posible de otros biomateriales (lípidos, ácidos nucleicos, etc.).
3. *Separación y detección de las proteínas diferenciales.* El objetivo es resolver las complejas mezclas de proteínas de las muestras biológicas combinando diversos procedimientos cromatográficos y electroforéticos. El método de referencia es la electroforesis bidimensional que permite la

4. Separación de las especies peptídicas de acuerdo a su punto isoeléctrico y a su peso molecular.

5. *Identificación de las proteínas de interés.* La identificación de las proteínas requiere su digestión con proteasas específicas (la tripsina es la enzima de referencia) y el análisis de los péptidos generados mediante diferentes tipos de espectrómetros de masas.

3. *Análisis de resultados mediante programas bioinformáticos.*

Figura número 3. Esquema general para análisis proteómico



2.3.5. Bases de datos

La huella peptídica es el conjunto de fragmentos peptídicos que se obtienen tras tratar una proteína concreta con una proteasa determinada. La huella peptídica es característica de cada proteína y depende de la enzima con la que se fragmente. Actualmente hay numerosas bases de datos que recogen las huellas peptídicas de multitud de proteínas conocidas. Estas bases de datos se pueden rastrear usando programas bioinformáticos para buscar la huella peptídica que corresponda con la huella peptídica de la proteína que se esté estudiando y por tanto poder identificarla.

PIM, <http://www.hybrigenics.fr> Contiene los resultados del análisis por doble-híbrido del genoma de *Helicobacter pylori*. En el estudio se describieron 1,465 interacciones proteicas anotadas en la base de datos. (Rain et al 2001).

BRITE (Biomolecular Relations in Information Transmisión and Expression), <http://www.genome.ad.jp/brite/> Es una base de datos de relaciones binarias y comparación de grafos que involucran genes y proteínas. Contiene interacciones proteína-proteína obtenidas por doble-híbrido en *S. cerevisiae* y *H. pylori*, y por otras extraídas de la literatura científica; interacciones en vías metabólicas; información sobre similitud de secuencia; y relaciones obtenidas a través de micro-arreglo de ADN.

<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/> es una base de datos que contiene los resultados obtenidos del estudio inmunoproteómico de la cepa 26695 de *Helicobacter pylori* donde se puede acceder con el nombre o por el numero de spot de la correspondiente proteína. (Haas et al., 2002)

2.3.6. Aplicaciones de la proteómica

1. Las aplicaciones de la proteómica son múltiples, pero actualmente se destacan las siguientes:
2. Identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades
3. Identificación de nuevos fármacos
4. Determinación de mecanismos moleculares involucrados en la patogenia de enfermedades
5. Análisis de rutas de transducción de señales

2.4. SECUENCIACIÓN GENÓMICA DE *Helicobacter pylori*

En agosto de 1997 se publicó la secuencia completa del genoma de *Helicobacter pylori* cepa 26695, sólo 15 años después de que se cultivara por primera vez. Era el sexto genoma de procariontes secuenciado. Posteriormente en Enero de 1999, se ha secuenciado el genoma completo de J99, otra cepa de *H. pylori*, permitiendo la comparación de los genomas. (Won J et al 2005).

Posteriormente se ha logrado secuenciar el genoma completo de las cepas HPAG1 y la cepa G27 de *H. pylori*, que se ha usado ampliamente en investigación. *Helicobacter pylori* ha sido el primer organismo para el que se han secuenciado múltiples aislamientos revelando una gran variedad genética a nivel de secuencias y de contenido en genes. (Baltrus et al 2008).

La gran disponibilidad de secuencias de genomas han permitido rápidos progresos en la identificación del proteoma y sub-proteomas de *Helicobacter pylori* en la investigación microbiana. Para analizar la síntesis global de proteínas como un indicador de la expresión genética de la bacteria, el

proteoma provee nueva información que complementa las investigaciones basadas en los genomas bacterianos.

2.4.1 Genoma de *Helicobacter pylori* cepa 26695

La cepa de *Helicobacter pylori* 26695, posee un genoma circular de 1.667.867 pares de bases. El contenido genético de *Helicobacter pylori* sugiere que los mecanismos básicos de replicación y división celular son similares a los de *E. coli* y *H. influenzae* sin embargo se han notado importantes diferencias como por ejemplo las proteínas DnaB y DnaC que forman un complejo B-C que promueve el desarrollo de la DnaB helicasa. (Tomb J-F et al., 1997).

2.4.2 Genoma de *Helicobacter pylori* cepa J99

La cepa de *Helicobacter pylori* J99, fue aislada en Estados Unidos en el año de 1994 de un paciente con ulcera duodenal, su genoma circular posee 1.643.381 pares de bases y posee alrededor de 1535 genes, además de ser *cagA+* y *vacA+*. (Alm. et al., 1999).

2.4.3 Genoma de *Helicobacter pylori* cepa HPAG1

Esta cepa fue aislada de una mujer de 80 años que hacía parte de un estudio de casos y controles de adenocarcinoma gástrico. HPAG1 posee un genoma circular con 1.596.366 pares de bases y aproximadamente 1586 genes. La secuenciación se llevo a cabo en junio del 2006 por la universidad de Washington (WashU). (Jung et al., 2006).

2.4.4 Genoma de *Helicobacter pylori* cepa G27

La cepa G27 fue recuperada de una endoscopia tomada en el hospital Grosseto en Tuscany Italia, y la secuenciación del genoma la realizó el centro de secuenciación genómica de la escuela de medicina de la universidad de Washington en Octubre de 2008. Este genoma circular sencillo consta de 1.652.983 pares de bases y contiene aproximadamente 1581 genes. (Baltrus et al., 2009)

2.5 IDENTIFICACIÓN PROTEÓMICA DE *Helicobacter pylori*.

2.5.1 Análisis proteómico cepa 26695 de *Helicobacter pylori*

Jungblut y colaboradores. Utilizaron las cepas de *Helicobacter pylori* 26695, J99 y la cepa SS1 (utilizada primordialmente en modelos animales); las cuales fueron cultivadas por 5 días en placas de agar, con el fin de hacer una comparación de proteomas entre las tres cepas. De las tres cepas investigadas se encontraron muy pocos spots de proteínas comunes, aunque se lograron separar 1800 especies proteínicas mediante la técnica de electroforesis bidimensional 2-DE y se identificaron 152 proteínas mediante MALDI-MS, incluyendo 9 factores de virulencia como UreB, Cag26, VacA, CagB, Catalasa, SodB, HpaA, UreA y GroES comunes en las dos cepas y 28 antígenos conocidos. Los spots analizados fueron 1863 para *Helicobacter pylori* 26695, 1448 para *Helicobacter pylori* SS1 y 1622 para *Helicobacter pylori* J99 además de la comparación entre estos 3 proteomas; mediante suero de tres pacientes con patologías gástricas distintas y diferentes estados de infección por *Helicobacter pylori*, se pudieron detectar antígenos reconocidos por la cepa 26695 de *Helicobacter pylori*. (Jungblut et al., 2000).

Rain y colaboradores. Este grupo de trabajo dio un importante paso en el entendimiento de las funciones de diferentes proteínas de *Helicobacter*

pylori, realizando el primer mapa a gran escala de interacciones proteína-proteína en un organismo procariota. Tomando como base la secuenciación genómica de la cepa 26695 se encontraron alrededor de 1200 interacciones entre proteínas de este microorganismo, asociando el 46.6% de su proteoma. Entre los complejos analizados estuvo la actividad de la ureasa la cual es esencial en la patogenicidad de *Helicobacter pylori*, cuya síntesis requiere 2 subunidades estructurales UreA y UreB y el producto de 4 genes accesorios: *ureE*, *ureF*, *ureG* y *ureH*. (Rain et al., 2001).

Je Cho y colaboradores. Incubaron la cepa 26695 en placas de agar brucella con 10% de suero bovino y vancomicina (6.9 μ M) a una temperatura de 37°C con 10% de CO² y en una atmosfera húmeda al 100%. Se realizó la precipitación proteínica con sulfato de amonio en rangos de 0 ~ 20%, 21 ~ 40%, 41 ~ 60% y 61 ~ 80% a un PH de 5.0—8.0. La separación de proteínas fue con electroforesis bidimensional 2-DE y la identificación de dichas proteínas se llevó a cabo con MALDI-TOF-MS; procesando 345 spots e identificando 175 proteínas de las cuales 115 fueron reportadas por primera vez en este trabajo como la proteína R enzima de restricción tipo I, proteína R y M enzima tipo IIS y la DNA polimerasa III sub-unidad β . 60 proteínas ya habían sido reconocidas por investigaciones proteómicas de la cepa 26695 anteriormente; como: UreB, FrdA, FusA, DnaK, YihK, HyuA. (Je Cho et al., 2002).

Se realizó un estudio de los componentes celulares de la cepa 26695 con el fin de identificar las proteínas solubles en un extracto celular completo y en otro extracto celular el cual fue fraccionado por precipitación con sulfato de amonio a diferentes concentraciones de saturación. La separación de dichas proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional y la identificación por MALDI-TOF-MS. La cepa 26695 fue cultivada en placas de agar brucella suplementado con suero bovino al 10%, vancomicina (10 μ g/mL), ácido nalidixico (25 μ g/mL) y anfotericina B (1 μ g/mL) a 37°C con

10% de CO₂ y 100% de humedad. Se lograron identificar 98 proteínas de las cuales 61 fueron recuperadas del extracto sometido a precipitación fraccionada con sulfato de amonio. 37 proteínas incluyendo KdsA fueron identificadas exclusivamente en 1 sola fracción de precipitación. En contraste GroEL, UreA, UreB, TrxA, NapA y FldA fueron recuperadas de varias fracciones de precipitación. Las proteínas captadoras de hierro como NapA, SodB, CeuE y Pfr fueron encontradas exclusivamente en la fracción que contenía una saturación al 100%. (Won et al., 2008).

2.5.2 Análisis proteómico de la cepa de referencia NCTC 11637 de *Helicobacter pylori*.

Lock y colaboradores. Realizaron el análisis proteómico de un vial liofilizado de la cepa de referencia NCTC 11637 el cual fue suspendido en caldo nutritivo y luego se realizó el cultivo de colonias aisladas en agar gonococcus (Oxoid, Basingstoke, UK) suplementado con Iso Vitalex (BBL., MD, USA) a una temperatura de 35°C por 5 días en autoclave vertical tipo CFJ (BBL) para recuperar nuevas colonias aisladas y nuevamente sembrarlas en agar gonococcus por tres días más.

Se identificaron 93 proteínas utilizando geles de poliacrilamida de 2-DE para separación y MS por MALDI-TOF, como productos de 35 genes, lo cual sugiere la existencia de proteínas con múltiples isoformas como resultado de modificaciones post-traduccionales de los genes correspondientes. Se encontró que los genes que presentan más modificaciones son: *tsaA* (12 spots de proteínas), *ureA* (11 spots), *ureB* (5 spots), *pfr* (8 spots), y *hspB* (6 spots). (Lock et al., 2001).

NCTC 11637 expresa las enzimas Isocitrato deshidrogenasa y Citrato sintetasa, presentes en el ciclo ácido tricarbónico. Se han observado niveles altos

de UreA y UreB con múltiples isoformas: UreA (11 spots) y UreB (5 spots), isocitrato deshidrogenasa (Icd) y citrato sintetasa (GltA) confirmando que *Helicobacter pylori* utiliza la vía metabólica del ciclo del ácido cítrico. Tanto Icd como GltA poseen isoformas con roles de palmitoilación y también isoformas que no cumplen con esa función, las isoformas no palmitoilizadas representan formas citoplasmáticas de estas enzimas. (Lock et al., 2001).

La cepa NCTC 11637 es *cagA* y *vacA* positivo. 16 spots fueron identificados como posibles productos de *vacA*. La proteína chaperonina GroEL producto del gen *hspB* expresó 4 isoformas diferentes como posibles modificaciones post-traduccionales relacionadas con fosforilación, encontrándose 3 posibles sitios de fosforilación: treonina 211 y 222, y el punto tirosina 218. (Lock et al., 2001).

2.5.3 Identificación de proteínas extracelulares de diferentes cepas de *Helicobacter pylori* mediante técnicas proteómicas

Optimizando las condiciones de cultivo gracias a un método de precipitación para minimizar la autólisis y de esta manera recuperar varias de las proteínas secretadas por *Helicobacter Pylori* se separaron mediante electroforesis 2-DE, 33 proteínas en total de las cuales fueron identificadas 26 proteínas con funciones como: enzimas de oxidación-reducción, varios componentes del aparato flagelar, tres isoformas de la citotoxina vacuolizante VacA, la serina proteasa y chaperona HtrA y 8 proteínas de función desconocida. Las cepas 26695 y J99 fueron sembradas en placas de agar con suero, vancomicina, nistatina y trimetropin a 37°C con 5% de O₂, 10% de CO₂ y 85% de N₂ durante 3 días para posteriormente volver a suspender y purificar en caldo infusión cerebro corazón suplementado con β-ciclodextrina al 1%, vancomicina, nistatina y trimetropin. La recuperación de las bacterias se hizo

mediante centrifugación. De esta manera se logro realizar el primer análisis del secretoma de *Helicobacter pylori*. (Bumann et al., 2002).

Smith y colaboradores. La propuesta de este estudio fue la identificación extracelular de proteínas como la citotoxina vacuolizante VacA, directamente desde dos cepas diferentes de *Helicobacter pylori* 26695 y ATCC 43504 para reconocer los roles de estas proteínas en la patogénesis del microorganismo.

Las cepas 26695 y ATCC 43504 se cultivaron en agares suplementados con suero de caballo al 5% en un ambiente con poca aerobiosis por 36 a 48 horas y resuspendidas en soluciones salinas Hank's. Se utilizo la metodología de cromatografía liquida LC-MS/MS. Se lograron identificar 125 proteínas extracelulares entre las dos cepas. La proteína de la isla de patogenicidad Cag24 (CagD); proteasas como HP0657 y HP1012; un polisacárido deacetilasa, HP0310, posiblemente envuelto en la hidrólisis de grupos acetilo de residuos N-acetilglucosamina del hospedero o de residuos de la superficie celular. (Smith et al., 2007).

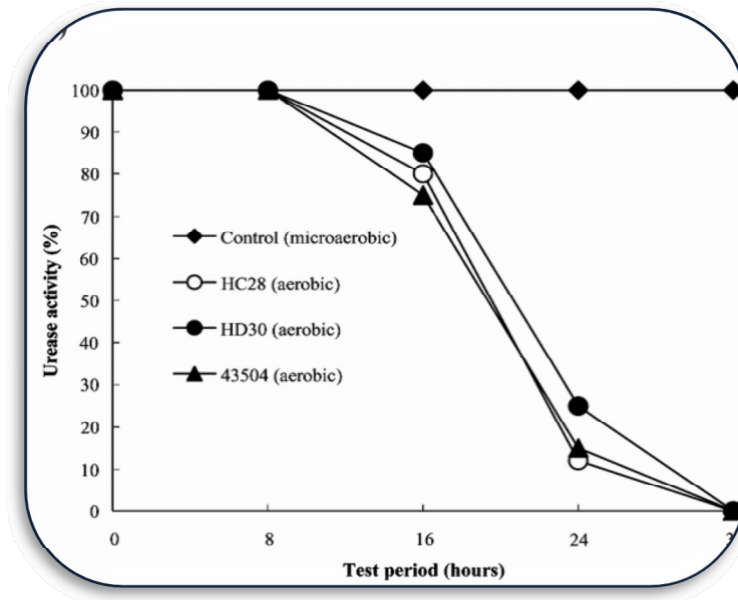
2.5.4 Estudios proteómicos para evaluar proteínas expresadas por diferentes cepas de *Helicobacter pylori* bajo estrés oxidativo

La manipulación de tres cepas de *Helicobacter pylori*, ATCC 43504, y dos cepas obtenidas de pacientes con ulcera duodenal (HD30) y cáncer gástrico (HC28) mediante biopsias, fueron sembradas en placas de agar sangre para organismos anaerobios (BD) a 37°C en un sistema atmosférico modulado por 5% de O₂, 10% CO₂ y 85% N₂(DU Scientific), por 48 horas para luego ser incubadas en una atmosfera con concentración de oxígeno al 20% en un lapso de tiempo de 8—36 horas, con el fin de evaluar el comportamiento y expresión de proteínas, proliferación y actividad de ureasa de *Helicobacter*

pylori en condiciones normales de microaerofilia (5% O₂) y tensión oxidativa (20% O₂).

La reducción en la expresión de las proteínas AhpC y UreE gracias a la manipulación de los niveles de transcripción de los dos genes correspondientes, después de 8 horas y finalmente inhibidos a las 24 horas logro confirmar la relación de dichas proteínas en la actividad de la enzima Ureasa de *Helicobacter pylori*. **Figura número 4**

Figura número 4. Comportamiento de la enzima ureasa en un intervalo de 0-36 horas bajo tensión oxidativa al 20% de O₂ en tres cepas diferentes de *Helicobacter pylori*. (Chuang 2005).



Las proteínas que se expresan en condiciones de tensión oxidativa son: UreE, Ahpc, Alquil-Hidroperoxido reductasa, HP0660, Orotidina-fosfato decarboxilasa, Riboflavina sintetasa dominio beta, Adenilato kinasa, Che Y, NapA, GroEL y UreB. ((Chuang et al., 2005).

2.6 IDENTIFICACIÓN PROTEÓMICA DE ENFERMEDADES ASOCIADAS A *Helicobacter pylori*.

El cáncer gástrico (CG) constituye en la actualidad la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. La infección por *Helicobacter pylori* es la principal causa de gastritis crónica y úlcera péptica, y uno de los factores más importantes implicados en la carcinogénesis gástrica. En 1994 la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer declaró a *Helicobacter pylori* como carcinógeno humano de tipo I. (Sierra et al., 2008).

La proteína CagA se encuentra prácticamente en todos los pacientes con enfermedad ulcerosa y en menor grado en los pacientes con gastritis crónica. La expresión de esta proteína se asocia con niveles elevados de interleucina-8 (IL-8), citocina fundamental en la respuesta inflamatoria y en la carcinogénesis gástrica. La proteína cagA forma parte del llamado islote de patogenicidad y se correlaciona de forma positiva con la proliferación celular, mientras las cepas cagA- se relacionan con la apoptosis. (Sierra et al., 2008).

La proteína VacA induce apoptosis en líneas celulares a través de sus efectos sobre la mitocondria, la liberación del citocromo C y de citocinas proinflamatorias mastocitarias. Aumenta la permeabilidad de las células del huésped a la urea y favorece la capacidad de colonización e infección del microorganismo. *Helicobacter pylori* desencadena en las células epiteliales del huésped una serie de señales celulares y procesos hiper proliferativos que determinan mayor riesgo de transformación maligna. (Fox et al., 2007).

2.6.1 Asociación proteómica de la infección por *Helicobacter pylori* y cáncer gástrico

Haas y colaboradores. Mediante el análisis de sueros de pacientes con infección por *Helicobacter pylori* activa (n=24), un grupo control con

desordenes gástricos relacionados (n=12) y pacientes con cáncer gástrico (n=6) de los cuales uno estaba diagnosticado con linfoma gástrico de bajo grado asociado a tejido linfoide de mucosas MALT; investigaron la reactividad de las proteínas de la cepa *Helicobacter Pylori* 26695, la cual fue cultivada en agar suplementado con suero a 37°C en una atmósfera microaerofílica (5% de O², 85% N₂ y 10% de CO₂) durante 2 días. Las proteínas fueron separadas mediante electroforesis bidimensional 2-DE, la identificación se llevo a cabo mediante MALDI-MS. Las proteínas identificadas fueron incluidas en la base de datos de TIGR, las cuales pueden consultarse por nombre o número de spot en www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE.

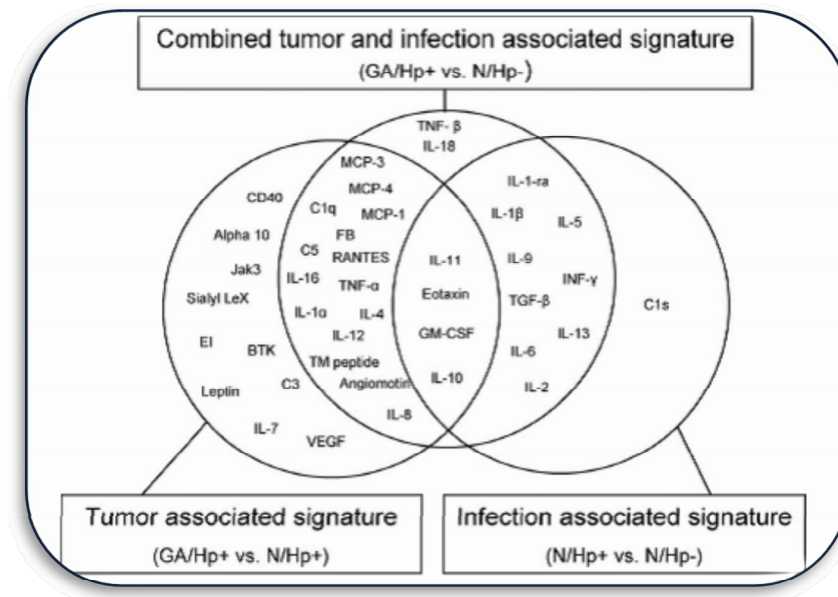
Alrededor de 310 proteínas antigénicas fueron reconocidas por la cepa 26695, 32 antígenos fueron fuertemente reconocidos por *Helicobacter pylori* en los sueros de los pacientes, de los cuales 9 fueron identificados por primera vez en este estudio y 23 que ya habían sido publicados en investigaciones anteriores. Las proteínas GroEL spot 1_390, la proteína ribosomal 50s L7/L12 spot 5_35 y la proteína Catalasa spot 2_439 reaccionaron con los 4 tipos de sueros de todos los pacientes incluyendo el grupo control de pacientes con gastritis no asociada a *H. pylori*. La Ureasa sub-unidad β spot 1_343 reacciono con el grupo control, pacientes con gastritis y pacientes con úlcera. La proteína Isocitrato deshidrogenasa solamente reacciono con sueros de pacientes con gastritis y la proteína HpaA spot 4_132 reacciono con sueros de pacientes con úlcera y cáncer.(Haas et al., 2002).

Ellmark y colaboradores. La tecnología de microarrays de anticuerpos recombinantes es una poderosa herramienta emergente para la identificación de nuevas dianas terapéuticas, biomarcadores de enfermedades y análisis diferenciales entre proteínas. En este estudio se construyo un array usando 127 SinFabs (fragmentos de anticuerpos) de las proteínas mas abundantes

presentes en *Helicobacter pylori* como: citoquinas, quimioquinas y factores complementarios de 60 antígenos diferentes tomados de la colección n-CoDeR. Los extractos proteínicos a analizar fueron tomados de tres tipos de tejidos diferentes de pacientes con adenocarcinoma gástrico y *Helicobacter pylori* positivo, pacientes *Helicobacter pylori* positivo y epitelio gástrico normal y adicionalmente pacientes *Helicobacter pylori* negativo y epitelio gástrico normal. En total se tomaron biopsias a 20 pacientes con una edad promedio de 75 años, con rangos entre 55-87 años, de los cuales 7 fueron mujeres y 13 hombres.

En el análisis de el proceso infeccioso por *Helicobacter pylori* quedo evidenciado el aumento de diferentes proteínas citoquinas TH1 como IL-5, IL-6, y la IL-13 y por otro lado citoquinas TH2 como IFN- γ e IL-2. Adicionalmente la IL-10 y TGF- β que están asociadas con la regulación de células T, aumentaron su expresión; confirmando teorías presentadas en otros estudios donde se planteaba el incremento de células T en procesos infecciosos por *Helicobacter pylori*. En total se identificaron 41 firmas proteínicas de las cuales 29 son específicas en pacientes con carcinoma gástrico y *Helicobacter pylori* positivo. (Ellmark et al., 2006). **figura número 5**

Figura número 5. Diagrama de venn que muestra antígenos diferenciales expresados en GA/HP+ (cáncer gástrico/infección *H. pylori* positiva) y N/HP (tejido gástrico normal/infección *H.pylori* negativa) en el circulo central. N/HP+ y N/HP- en el circulo de la derecha. GA/HP+ y N/HP+ en el circulo de la izquierda. (Ellmark 2006).



El entendimiento de cómo *Helicobacter pylori* interacciona con su hospedero ha demarcado una gran importancia en la caracterización de proteínas, y de diferentes antígenos que las múltiples cepas del microorganismo produce. Mediante un análisis cualitativo comparativo entre cepas de *Helicobacter pylori* positivas, de biopsias tomadas por endoscopia de tejidos y sueros de pacientes con gastritis crónica, úlcera duodenal y carcinoma gástrico difuso, utilizando gel de poliacrilamida bidimensional para separar las proteínas con pH entre 3-10; se realizó la alquilación y digestión con tripsina logrando mediante análisis con MALDI-TOF-MS identificar biomarcadores muy importantes de estas patologías. (Mini et al., 2006).

Helicobacter pylori expresa cinco proteínas biomarcadoras de carcinoma gástrico difuso que son: la proteína hipotética HP0958, el factor de elongación de transcripción GreA, la sub-unidad quinona reactiva Ni/Fe hidrogenasa, la flavina-NADPH oxidorreductasa y la proteína RecA las cuales fueron identificadas mediante técnica MALDI-MS. (Mini et al., 2006).

Los biomarcadores de cáncer gástrico: NapA, proteína ligadora de RNA (HPAG1_0821) y la Histona ligadora de DNA Hu, fueron identificados gracias a un estudio inmunoproteómico con pacientes de origen colombiano de los cuales 41 padecían de cáncer gástrico y 31 de úlcera duodenal para un total de 72 pacientes colombianos; y 57 pacientes del sur de Korea, de los cuales 27 sufrían de cáncer gástrico y 30 de úlcera duodenal. Los 129 pacientes desarrollaron en un comienzo infección por *Helicobacter pylori*. Dichas proteínas fueron separadas por 2-DE y transferidas a los geles preparados con la cepa 26695 para la posterior purificación e identificación mediante la tecnología SELDI-TOF-MS (Khoder et al., 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori es un importante patógeno gástrico del hombre ya que infecta a la mitad de la población mundial, este agente causa desordenes gastrointestinales, como gastritis crónica, úlcera péptica y cáncer gástrico.

Teniendo en cuenta que ya se cuenta con varias secuencias completas del genoma de varias cepas, entre ellas la 26695 y J99, es muy importante realizar una revisión del estado del arte en cuanto al análisis de la parte funcional de la información genética, el proteoma; que han y están realizando diferentes grupos de investigación puesto que uno de los desafíos más importantes para los profesionales de la salud actualmente es el de mantenerse actualizado acerca de la gran cantidad de información que surge a diario en el mundo, gracias a los avances en investigación, además de lograr el conocimiento de como los organismos patógenos interactúan con sus huéspedes para producir los procesos clínicos.

Las proteínas expresadas por las diferentes cepas de *Helicobacter pylori* como 26695, J99, HPAG1, G27 y SS1 han sido identificadas en geles de doble dimensión de alta resolución en los últimos años además de un importante numero de especies proteicas que han sido obtenidas de extractos celulares y mediante MALDI. Información que se encuentra dispersa, lo que se plantea es hacer una revisión con la idea de compilar dicha información de una manera práctica y detallada, como una útil introducción hacia una tecnología de vanguardia como la proteómica involucrando los fundamentos de una de las infecciones bacterianas mas comunes en humanos en Colombia.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Revisar el estado del arte actual sobre biomarcadores proteómicos de *Helicobacter pylori* relacionados con la evolución de esta infección hacia desordenes gastrointestinales.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar las técnicas y estrategias de la proteómica aplicables en el campo de la microbiología clínica.

Estudiar los avances del proteoma de *Helicobacter pylori* a la actualidad.

Correlacionar los proteomas de *Helicobacter pylori* con enfermedades asociadas como úlceras péptica y duodenal; linfoma tipo MALT y cáncer gástrico.

5. METODOLOGÍA PARA INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN DE ARTÍCULOS

5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Serán escogidos con base al objetivo principal que se plantea en el trabajo, y se explicarán a continuación las principales categorías para los criterios de inclusión.

Se incluirán todos los artículos publicados sobre el tema desde 2000 hasta el año 2009.

Se incluirán revisiones que basen sus estudios experimentales en la asociación entre infección por *Helicobacter pylori* con la aparición de gastritis y úlcera péptica, con una alta relevancia en el nexo encontrado entre *Helicobacter pylori* y procesos oncogénicos como el carcinoma gástrico o linfomas MALT.

Revisiones que hablen directamente sobre los hallazgos de proteínas de *Helicobacter pylori* mediante proteómica.

Artículos donde se expliquen los diferentes métodos y condiciones experimentales utilizadas en proteómica

Estudios realizados en donde se hagan comparaciones del proteoma de *Helicobacter pylori* con las proteínas encontradas en diferentes desordenes gastrointestinales.

Estudios que muestren resultados que hayan sido obtenidos solo mediante técnicas proteómicas como MALDI-TOF, ESI, SELDI, MS/MS, ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL 2-DE y relacionadas.

5.1.1 Año de publicación: Se hará una revisión exhaustiva en las bases de datos incluidas en el presente proyecto, de todos los estudios realizados y publicaciones desde el año 2000 hasta el año 2009, sobre proteómica de *Helicobacter pylori* y las enfermedades asociadas con esta infección.

5.1.2 Idioma: Se tendrán en cuenta artículos en inglés y español

5.1.3 Bases de datos: Se consultaran las bases de datos SCIENCE DIRECT, HINARI, PUBMED, SCIELO, MEDICLATINA, ELSEVIER y COCHRANE.

5.1.4 Palabras claves: Se incluirá tanto búsqueda con términos simples como: proteómica, proteoma, proteínas *Helicobacter pylori*, espectrometría de masas, electroforesis en gel, *Helicobacter* y cáncer gástrico, *Helicobacter pylori* y MALT y además se hará la búsqueda de artículos con combinación de términos, que se listaran mas adelante, teniendo en cuenta la búsqueda con palabras tanto en inglés como en español.

5.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Artículos donde se describa la identificación de biomarcadores de *Helicobacter pylori* por técnicas diferentes a la proteómica.
- Artículos donde se describan proteínas implicadas en desordenes gastrointestinales pero sin nexo con la infección por *Helicobacter pylori*.
- Artículos donde se describan técnicas diferentes a las de interés
- Resumen de artículos o comentarios de revistas no reconocidas, en la investigación.

- Artículos de revistas no indexadas o no incluidas en las bases de datos incluidas en la investigación.
- Resúmenes de libros de medicina o gastroenterología.

5.3 ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA DE ARTÍCULOS

Para la búsqueda de artículos se utilizarán bases de datos como, SCIENCE DIRECT, HINARI, PUBMED, EBSCO, SCIELO, MEDICLATINA, ELSEVIER y COCHRANE, desde 2000 hasta el año de 2009. La búsqueda se realizará en idioma inglés y español.

El ingreso a las bases de datos se hará por medio electrónico a los respectivos portales: PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) como colección general.

Colaboración Cochrane (<http://www.cochrane.org>), especializada en revisiones sistemáticas de la literatura.

LILACS (<http://bases.bireme.br>), especializada en Literatura Latinoamericana y del Caribe en Ciencias de la Salud.

Para el acceso a SCIENCE DIRECT, HINARI se utilizara el portal electrónico de la biblioteca general de la Pontificia Universidad Javeriana.

Se utilizará la estrategia de búsqueda mediante la utilización de una combinación de encabezados temáticos y palabras de texto relacionadas con la identificación de biomarcadores de *Helicobacter pylori* mediante la técnica de proteómica, biomarcadores proteómicos de desordenes gastrointestinales asociados a *Helicobacter pylori* y biomarcadores de *Helicobacter pylori* candidatos a antígenos vacúnales, teniendo en cuenta conectores como los más ampliamente utilizados AND, OR y NOT. Los artículos que apliquen a la

revisión se recuperarán de las bases de datos mediante la utilización de los términos de búsqueda amplios que aparecen a continuación.

5.4 ENCABEZADOS TEMÁTICOS EN INGLÉS

- Proteomics pylori
- Proteoma Helicobacter pylori
- Vaccines Helicobacter pylori
- Proteomic diagnostic Helicobacter
- Biomarkers proteomics Helicobacter pylori
- Identification proteomic biomarkers
- Gastroduodenal disease pylori
- Proteins Helicobacter pylori
- Proteomics techniques

5.5 ENCABEZADOS TEMÁTICOS EN ESPAÑOL

- Técnicas proteómicas
- Proteoma *Helicobacter pylori*
- Cáncer gástrico
- Linfoma tipo MALT
- Úlceras
- Biomarcadores *Helicobacter pylori*
- Proteínas *Helicobacter pylori*
- Espectrometría de masas

- Técnicas proteómicas
- Expresión proteómica de *Helicobacter pylori*
- Proteoma *Helicobacter* 26695
- Proteoma *Helicobacter* J99
- Proteoma *Helicobacter* HPAG1
- Proteoma *Helicobacter* G27

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

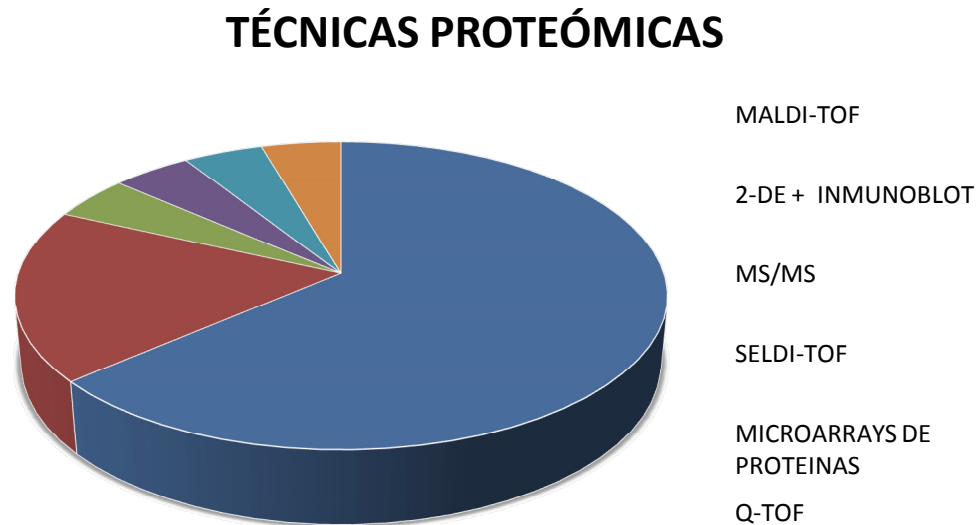
En el presente estudio se realizó una revisión de la literatura sobre la proteómica de *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas, haciendo un énfasis principalmente en cáncer gástrico. Teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión que se plantearon al inicio de este estudio, se realizó un primer acercamiento a la bibliografía. A partir de los artículos hallados en la búsqueda, se excluyeron 40 referencias donde había habido errores en la indización (no hablaban sobre proteómica o no se referían a enfermedades gástricas); además de estudios realizados por técnicas diferentes a las de interés y enfermedades gástricas no asociadas a *Helicobacter pylori*. Se incluyeron 22 publicaciones en total; de las cuales 11 cumplían los criterios para identificar posibles biomarcadores de enfermedad asociados a *Helicobacter pylori*, 10 referencias que cumplían con las condiciones para lograr recopilar el avance en la caracterización proteómica del microorganismo en la actualidad y una referencia que cumplía con los criterios de inclusión para caracterizar el proteoma de la cepa 26695 pero que además también realizó detección de antígenos para cáncer gástrico y úlcera.

6.1 TÉCNICAS PROTEÓMICAS

En los 22 artículos revisados incluidos en el presente estudio se observó que la técnica para la separación de proteínas utilizada fue la electroforesis bidimensional 2-DE en 21 artículos y la cromatografía líquida en el estudio realizado por Smith 2007; para la identificación, la técnica proteómica más utilizada fue MALDI-TOF en 14 artículos; la identificación de antígenos se llevó a cabo mediante electroforesis bidimensional combinada con inmunoblotting en cuatro estudios y las cuatro referencias restantes

utilizaron técnicas diferentes como: MS/MS, SELDI-TOF, Q-TOF y Microarrays de proteínas. **Fig. Número 6.**

Fig. Número 6. Técnicas utilizadas en los estudios sobre proteómica de *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas.



En este estudio se pone de manifiesto, en primer lugar, que actualmente existe una necesidad emergente de la utilización de las técnicas proteómicas en el campo de la microbiología clínica, indicando claramente que la proteómica tiene utilidad actualmente en la investigación y descubrimiento de proteínas de interés clínico.

6.2 AVANCES EN LA CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE *Helicobacter pylori* EN LA ACTUALIDAD.

El análisis proteómico de los diferentes componentes de *Helicobacter pylori* en las publicaciones revisadas fue enfocado hacia la obtención de subproteomas con una característica definida. (**tabla número 2**) como: perfil de proteínas celulares mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio (Won 2002), proteínas extracelulares (Smith 2007), cuantificación de las proteínas más representativas de *Helicobacter pylori* (Won 2006), proteínas expresadas ante tensión oxidativa (Hong 2005), proteínas solubles y de estructura (Backert 2005), proteínas secretoras (Bumman 2002), proteínas inmunoreactivas (Lock 2002), proteínas de superficie (Sabarth 2002), y 2 publicaciones que se centraron específicamente en identificar el mayor porcentaje del proteoma de *Helicobacter pylori*. (Lock 2001 y Jungblut 2000).

Tabla número 2.

Tabla número 2. Características de los estudios realizados para analizar el proteoma de *Helicobacter pylori* hasta la fecha.

AUTOR	AÑO	CEPA	CARACTERÍSTICAS	TECNICA	# SPOTS ANALIZADOS	# PROTEINAS IDENTIFICADAS
Jeong wong	2008	26695	Precipitación fraccionada con sulfato de amonio con diferentes %	MALDI-TOF	1275 EN 7 GELES	98
Todd Smith	2007	26695 43504	Análisis directo de proteínas extracelulares en 2 cepas	LC/MS/MS	ND	125
Jeong Wong	2006	26695	Análisis de proteínas más representativas de <i>Helicobacter pylori</i>	MALDI-TOF	350	16
Ming Hong	2005	43504 HD30 HC28	Proteínas expresadas por <i>Helicobacter pylori</i> en una atmósfera con 20% de O ₂ .	MALDI-TOF	ND	11
Steffen Backert	2005	26695 P12 B128	Identificación de proteínas estructurales y proteínas solubles	MALDI-TOF	1800	50

Dirk Bumann	2002	26695 J99	Análisis de proteínas secretadas por <i>Helicobacter pylori</i>	MALDI-TOF	ND	26
Robert Lock	2002	NCTC 11637	Análisis de proteínas inmunoreactivas.	MALDI-TOF	883	ND
Myung Je	2002	26695	Identificación proteómica de la cepa 26695	MALDI-TOF	345	175
Nicolás Sabarth	2002	26695	Identificación de proteínas de superficie	MALDI-TOF	82	18
Robert Lock	2001	11637	Análisis proteómico de la cepa NCTC 11637	MALDI-TOF	ND	93
Jungblut	2000	26695	Análisis proteómico de la cepa 26695 y detección de antígenos de cáncer gástrico.	MALDI-TOF	1800	152

Los estudios realizados por Jungblut en el 2000 y Myung en el 2002 se enfocaron principalmente en caracterizar el proteoma de la cepa 26695 de *Helicobacter pylori*.

El estudio de Jungblut y colaboradores en el año 2000 realizó una comparación proteómica de diferentes situaciones biológicas en la cepa 26695, J99 y SS1 para evaluar la composición proteínica entre las 3 cepas y la identificación de antígenos. Siendo este el primer análisis sistemático realizado en 1800 proteínas de *Helicobacter pylori* logrando identificar mediante MALDI-TOF 152 proteínas, cuyos datos fueron organizados en una base de datos dinámica que puede ser consultada vía internet (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/>).

En la revelación de los geles de 2-DE de las cepas 26695, J99 y SS1 de *Helicobacter pylori* realizada por Jungblut, se encontró que el rango de expresión de las proteínas se dio entre puntos isoeléctricos de 4-10 y Mr entre 5-150 kDa. En total 1863 1448 y 1622 spots fueron detectados en los modelos 26695, SS1 y J99 respectivamente. La comparación entre las tres cepas reveló una alta variabilidad genética en este microorganismo. En este estudio se tuvo presente la intensidad más que la frecuencia con que se

presentaron los diferentes spots, de esta manera de los 20 spots con mas altas intensidades solamente 2 no fueron identificados debido a que no tomaron la coloración de azul brillante de Comasie. Los 18 spots con mayor intensidad correspondieron a las proteínas: GroEL, UreB, TsaA, Cag 26, UreA, Rps4, Ctc, TagD, NapA, PepA y TufB. (**Tabla número 3**).

Tabla número 3. Spots con mayor intensidad en proteínas de *Helicobacter pylori* 26695 (Jungblut 2000).

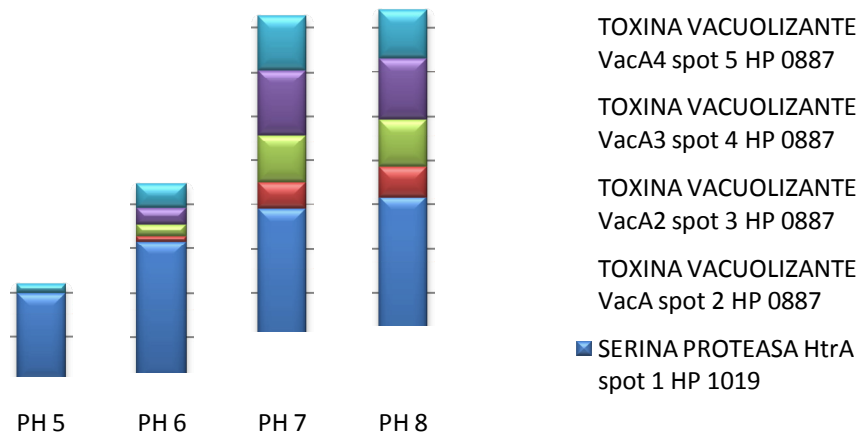
Spot N°	Intensidad	Mr kDa	PI	Proteína identificada	Nombre corto	ORF
A390	1899.53	59.4	5.5	proteína chaperona y de choque térmico	GroEL	HP0010
A343	1432.48	64.7	5.6	Ureasa sub-unidad β	UreB	HP0072
D341	1355.94	23.7	6.0	Alkil-Hidroperoxido reductasa	TsaA	HP1563
A194	1209.85	60.0	5.4	proteína chaperona y de choque térmico	GroEL	HP0010
B126	1193.57	132.4	6.6	Proteína de la isla de patogenicidad Cag	Cag26	HP0547
A192	834.17	60.0	5.4	proteína chaperona y de choque térmico	GroEL	HP0010
D322	791.85	28.9	8.6	Ureasa sub-unidad α	UreA	HP0073
D329	765.38	26.7	9.1	Proteína ribosomal	Rps4	HP1294
E35	735.28	10.0	5.1	Proteína de tensión general S4	Ctc	HP1496
				Proteína ribosomal L7/L12	Rpl7/I12	HP1199
D281	727.92	16.0	6.8	Tiol-adhesina peroxidasa	TagD	HP0390
A388	704.27	59.7	5.6	proteína chaperona y de choque térmico	GroEL	HP0010
F16	691.56	11.5	6.4	Co-chaperona	GroES	HP0011
A323	682.03	64.8	5.7	Ureasa sub-unidad β	UreB	HP0072
E54	673.21	12.3	5.6	Proteína activadora neutrófilos	NapA	HP0243
A325	667.99	65.1	5.6	Ureasa sub-unidad β	UreB	HP0072
F44	667.53	11.4	8.3	ND	ND	ND

F52	640.92	11.8	8.6	ND	ND	ND
D142	635.50	17.5	8.8	Proteína secretora hipotética	ND	HP1286
B537	576.40	52.2	6.7	Amino peptidasa a/i	PepA	HP0570
A477	567.52	46.6	5.2	Factor de elongación de traducción EF-Tu	TufB	HP1205

Una de las condiciones estudiadas por el equipo de trabajo de Jungblut fue el efecto de la variación de pH en la composición proteínica de *Helicobacter pylori* 26695, cultivando la cepa en placas de agar con rangos de pH entre 5-8, grandes diferencias fueron observadas. Tomando los spots que presentaron la misma frecuencia, para analizar como era la intensidad de expresión de cada uno. VacA y varias de sus isoformas presento mayor intensidad de expresión definitivamente a PH alcalino al igual que la Serina proteasa HtrA.

La proteasa serina HtrA (HP1019) disminuyo su intensidad con la disminución de pH 8 a 5. De igual manera la disminución de pH 8 a 5 hizo disminuir el spot numero 5; y los spots 2-3-4 desaparecieron por completo a pH 5, estas proteínas fueron identificadas como diferentes especies proteínicas de la citotoxina vacuolizante (HP0887) **Figura número 7.**

figura número 7. Intensidad de expresion en proteinas de *Helicobacter pylori* 26695 con variaciones de pH entre 5-8



El trabajo realizado por Myung y colaboradores identificó 175 proteínas de 345 spots separados mediante electroforesis bidimensional 2-DE e identificadas mediante la técnica MALDI-TOF MS (**Tabla número 4**), de estas proteínas 60 habían sido identificadas de 152 spots procesados anteriormente por el equipo de trabajo de Jungblut en el año 2000.

Tabla número 4. Proteínas de *Helicobacter pylori* cepa 26695 identificadas mediante MALDI-TOF-MS en condiciones de PH de 5.0-8.0 (Myung 2002)

SPOT No.	OBSERVADO Mr	TEORICO Mr	OBSERVADO pI	TEORICO pI	ANOTACION	NOMBRE LOCUS TIGR
1	18000	138054.6	6.14	6.41	DNA polimerasa III sub-unidad alpha DNAE	HP1460
2	120000	94229.3	5.30	5.12	Ubiquinona NADH oxidorreductasa sub-unidad NQO3	HP 1266
3	113500	99083.3	5.53	5.65	Sub-unidad preproteína translocasa (SecA)	HP 0786
4	87000	99083.3	5.53	5.65	Sub-unidad preproteína translocasa (SecA)	HP 0786
8*	74900	80121.1	6.80	7.32	Subunidad flavoproteína fumarato reductasa (FrdA)	HP0192
10	97000	96683.4	5.90	6.27	Subunidad Proteasa dependiente de ATP (ClpB)	HP0264
11	110000	116149.6	6.52	7.00	Proteína R enzima de restricción Tipo I (HsdR)	HP1402
12	120000	149715.6	6.70	7.50	Proteína R y M enzima de restricción tipo II (Eco571R)	HP1517
16*	85390	77020.9	5.25	5.01	Factor de elongación de traducción EF-G (FusA)	HP1195
17*	68640	67051.9	4.94	4.76	Proteína de choque térmico y chaperona (dnaK)	HP0109
18*	67860	67051.9	4.96	4.76	Proteína de choque térmico y chaperona (dnaK)	HP0109
20*	68000	66676.3	5.26	4.09	Proteína acopladora de GTP, Homologa a FusA (YihK)	HP0480
21*	68000	66676.3	5.28	5.09	Proteína acopladora de GTP, Homologa a FusA (YihK)	HP480
23	64960	71274.0	4.37	5.26	Proteína de choque térmico y chaperona C62.5 (HtpG)	HP0210
27*	65100	61683.5	5.57	5.91	Ureasa Sub-unidad β (Urea Amidohidrolasa)	HP0072
28*	64680	61683.5	5.62	5.91	Ureasa Sub-unidad β (Urea Amidohidrolasa)	HP0072
30	75000	75916.2	6.35	6.90	Excinucleasa ABC Subunidad B (UvrB)	HP1114
32	75000	80121.1	6.55	7.32	Fumarato reductasa, sub-unidad de flavoproteína(frdA)	HP0192
33	75000	80121.1	6.73	7.32	Fumarato reductasa, sub-unidad de flavoproteína(frdA)	HP0192
34	71000	74506.7	6.20	6.46	Metionil-tRNA Sintetasa (metS)	HP0417
35*	71000	78532.8	6.30	6.94	Proteína hydantoina (hyuA)	HP0695

36*	71000	78532.8	6.41	6.94	Proteína hydantoina (hyuA)	HP0695
37	67000	69683.7	6.37	7.13	Proteína inhibidora de la división de glucosa (gldA)	HP0213
39	67000	65601.5	6.65	6.88	Aspartyl-tRNA sintetasa (aspS)	HP0617
43	63800	62826.4	6.19	6.77	Proteína ribosomal S1 (rps 1)	HP0399
44	62400	62826.4	6.29	6.77	Proteína ribosomal S1 (rps 1)	HP0399
49	59000	55143.1	5.23	5.05	ATP sintetasa F1 sub-unidad α (AtpA)	HP1134
50	59000	55143.1	5.26	5.05	ATP sintetasa F1 sub-unidad α (AtpA)	HP1134
51*	59980	58263.9	5.45	5.48	Proteína de choque térmico y chaperona (GroEL)	HP0010
52*	59430	58263.9	5.52	5.48	Proteína de choque térmico y chaperona (GroEL)	HP0010
53*	59400	58263.9	5.54	5.48	Proteína de choque térmico y chaperona (GroEL)	HP0010
54*	59600	58263.6	5.59	5.48	Proteína de choque térmico y chaperona (GroEL)	HP0010
56	58500	54492.6	6.10	6.63	Proteína de división celular (ftsA)	HP0978
58	58500	54492.6	6.10	6.63	Proteína de división celular (ftsA)	HP0978
60	60000	57905.2	6.47	7.18	Fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA)	HP0397
61	60000	57905.2	6.72	7.18	Fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA)	HP0397
62	53000	51478.1	5.13	5.08	ATP sintasa F1 sub-unidad β (AtpD)	HP1132
63	53000	51478.1	5.18	5.08	ATP sintasa F1 sub-unidad β (AtpD)	HP1132
64	53000	51478.1	5.23	5.08	ATP sintasa F1 sub-unidad β (AtpD)	HP1132
66	53000	51988.6	5.27	5.07	Factor detonante (Tig)	HP0795
67	53000	51988.6	5.33	5.07	Factor detonante (Tig)	HP0795
68	51000	51478.1	5.26	5.08	ATP sintasa F1 sub-unidad β (AtpD)	HP1132
72	51000	54513.6	5.64	6.04	Glutamina Sintetasa (GlnA)	HP0512
74	53400	53288.2	5.76	6.01	Amidotransferasa Glu-RNA (Gln), sub-unidad β (GatB)	HP0658
75	51000	50688.7	5.78	6.25	Heptosa-ADP sintetasa (RfaE)	HP0858
76	51300	53288.2	5.93	6.01	Amidotransferasa Glu-RNA (Gln), sub-unidad β (GatB)	HP0658
77	60000	57905.2	6.72	7.18	Fosfoglicerato deshidrogenasa (SerA)	HP0397
84	54200	54433.1	6.68	7.11	Amino peptidasa a/i (PepA)	HP0570
89*	51400	48350.0	7.80	8.02	Citarto sintetasa (GltA)	HP0026
94*	49200	51478.1	5.20	5.08	ATP sintasa F1, sub-unidad β (AtpD)	HP1132
95	46000	43647.7	4.92	4.93	Factor de elongación de traducción EF-Tu(TufB)	HP1205
96	44850	38499.1	4.94	4.69	RNA polimerasa dirigida por DNA, sub-unidad α (RpoA)	HP1293
97	47000	43647.7	4.96	4.93	Factor de elongación de traducción EF-Tu(TufB)	HP1205
98*	46610	43647.7	5.13	4.93	Factor de elongación de traducción EF-Tu(TufB)	HP1205
99*	46610	43647.7	5.20	4.93	Factor de elongación de traducción EF-Tu(TufB)	HP1205
100*	46520	43647.7	5.23	4.93	Factor de elongación de traducción EF-Tu(TufB)	HP1205
101*	46000	46347.7	5.27	4.93	Factor de elongación de traducción EF-Tu(TufB)	HP1205
104	47200	42184.4	5.44	5.50	DNA polimerasa III sub-unidad β (DnaN)	HO0500
105	47200	44743.6	5.49	5.81	Piruvato ferredoxina oxidoreductasa, sub-unidad α	HP1110
107	46600	44649.6	5.57	5.59	Factor de terminación de transcripción NusA (NusA)	HP1514
108	46800	40574.5	5.58	5.53	Proteína ligadora de GTP (Gtp1)	HP0569
109	45400	46533.8	5.40	5.47	Enolasa (Eno)	HO0154
110*	45000	46533.8	5.45	5.47	Enolasa (Eno)	HO0154

114	44500	42403.4	5.66	6.15	Cluster (NifS)de Sintesis (Fe-S)	HP0220
115	51270	48361.1	5.74	6.20	Precursor de proteína de secrecion de Hemolisina (HlyB)	HP0599
116	51000	48361.1	5.81	6.20	Precursor de proteína de secrecion de Hemolisina (HlyB)	HP0599
118	44500	41508.8	5.73	6.36	Ferredoxina oxidorreductasa sub-unidad α	HP0589
119	40600	39694.8	5.80	6.53	Factor de elongación de traduccion EF-Ts (Tsf)	HP1555
121	44500	41508.8	5.78	6.36	Ferredoxina oxidorreductasa sub-unidad α	HP0589
122*	40400	39694.8	5.90	6.53	Factor de elongación de traduccion EF-Ts (Tsf)	HP1555
128	48500	50570.0	6.30	6.71	Subunidad Glicolato oxidasa(GlcD)	HP0509
129	50500	51980.9	6.34	6.83	Aspartato Amonio-liasa (AspA)	HP0649
130	47000	49241.5	6.40	6.82	Deaminasa L-Serina (SdaA)	HP0132
131	52000	49546.5	6.45	6.99	Factro de terminación de transcripción Rho (Rho)	HP0550
132	47400	50974.5	6.50	7.29	Fumarasa (FumC)	HP1325
133	48610	41274.7	6.98	7.65	Peptido Metionina sulfoxido reductasa (MsrA)	HP0224
136	48000	47531.1	7.85	7.95	Isocitrato Deshidrogenasa (Icd)	HP0027
137	46520	47531.1	6.61	7.95	Isocitrato Deshidrogenasa (Icd)	HP0027
138	46410	47531.1	6.89	7.95	Isocitrato Deshidrogenasa (Icd)	HP0027
160	42300	40984.3	6.73	7.30	Fosfoserina Aminotransferasa (SerC)	HP0736
161	44000	41121.3	6.80	7.19	Acetil coenzima A Acetiltransfera (tiolasa),(FadA)	HP0690
170	36500	34881.1	5.28	5.31	Acetil coenzima A Carboxilasa (AccA)	Hp0557
171	38400	33677.4	5.37	5.53	Proteína hipotética conservada	Hp0310
172	36300	34881.1	5.40	5.31	Acetil coenzima A Carboxilasa (AccA)	Hp0557
173	36500	31681.0	5.53	5.78	Proteína hipotética	HP0014
177*	34800	35538.2	5.66	6.25	Tiorredoxina Reductasa (TrxB)	HP0825
179	35000	33772.7	5.73	6.25	Fructosa-Bisfosfato Aldolasa (Tsr)	HP0176
180	35300	33772.7	5.77	6.25	Fructosa-Bisfosfato Aldolasa (Tsr)	HP0176
182*	35100	33772.7	6.00	6.25	Fructosa-Bisfosfato Aldolasa (Tsr)	HP0176
183	35100	33772.7	6.00	6.25	Fructosa-Bisfosfato Aldolasa (Tsr)	HP0176
184	34500	33538.2	5.80	6.25	Tiorredoxina Reductasa (TrxB)	HP0825
186	38000	36483.1	6.07	6.52	Proteína adiposa para síntesis de fosfolipido/acido (PlsX)	HP0201
189	38300	34812.4	6.23	6.77	Proteína de Nodulacion (NolK)	Hp0045
190	39500	36924.5	6.32	6.79	Arginasa (RocF)	HP1399
191	39800	35986.0	6.35	6.87	Tiorredoxina Reductasa (TrxB)	HP1164
192	39000	57905.2	6.43	7.18	Fosfoglicerato Deshidrogenasa (SerA)	HP0397
194	40000	37412.7	7.00	7.36	ADP-L-Glicerol-D-Manoheptosa-6-Epimerasa (RfaD)	HP0859
195	40500	37073.8	7.65	7.65	Aldo-keto Reductasa, adquirida	HP1193
201	35500	34388.7	6.25	6.77	Proteína transportadora Malonil Coenzima A-Acil (FabD)	HP0090
203	33600	29855.4	6.38	7.00	UDP-N-Acetilglucosamina acyltransferasa (LpxA)	HP1375
205	32700	31205.3	6.52	7.17	Pantoato- β -Alanina Ligasa (PanC)	HP0006
206	33200	29294.1	7.00	7.13	Inhibidor de división celular (MinD)	HP0331
210	27510	20787.8	5.04	5.35	Factor de Elongacion de traducción EF-P (Efp)	HP0177
215	32000	27310.3	5.25	5.24	Proteína de formación/ expresión de Hidrogenasa	HP0900

					(HypB)	
218	44530	37712.9	6.13	6.61	Amidasa Alifatica (AimE)	HP0294
220	29300	28417.5	5.53	5.24	Proteína hipotética conservada	HP1588
221	32400	29722.1	5.73	6.16	Proteína accesoria de Ureasa (UreH)	HP0067
222	31200	31475.0	5.73	5.88	Biotina Sintetasa (BioB)	HP1406
223	27500	25362.3	5.70	5.81	3-Oxoadipato coA-Transferasa sub-unidad A (YxjD)	HP0691
227	29000	28618.8	6.56	7.65	Proteína accesoria de Ureasa (UreF)	HP0069
229	29500	30538.5	6.77	7.21	Espermidina sintasa (SpeE)	HP0832
232	29200	25727.5	7.45	7.34	Glucosa-6-fosfato 1-Deshidrogenasa (DevB)	HP1102
235	28000	21955.3	4.93	4.76	Proteína Accesoria de Ureasa (UreG)	HP0068
236*	27000	21955.3	5.00	4.76	Proteína Accesoria de Ureasa (UreG)	HP0068
239	28800	25855.5	5.32	5.08	Regulador de Respuesta (OmpR)	HP0166
240	27600	20787.8	5.40	5.35	Factor de elongación de traducción EF-P (Efp)	HP0177
241*	27000	21243.2	5.25	5.00	Adenilato Kinasa (Adk)	HP0618
244*	26000	22262.9	5.39	5.35	3-Oxoadipato coA-Transferasa sub-unidad β (YxjE)	HP0692
246	25000	22039.9	5.28	5.13	Proteína de choque térmico y Co-chaperona (GrpE)	HP0110
251	24200	20256.5	5.56	5.38	Ferredoxina Oxidorreductasa sub-unidad γ	HP0591
252*	24200	24617.6	5.51	6.17	Superoxido Dismutasa (SodB)	HP0389
253*	23640	22235.6	5.76	6.25	Alquilo Hidroperoxidasa Reductasa (TsaA)	HP1563
258*	24200	22235.6	5.73	6.25	Alquilo Hidroperoxidasa Reductasa (TsaA)	HP1563
259	24200	22235.6	5.78	6.25	Alquilo Hidroperoxidasa Reductasa (TsaA)	HP1563
260	23700	22235.6	5.98	6.25	Alquilo Hidroperoxidasa Reductasa (TsaA)	HP1563
261	22500	22235.6	5.88	6.25	Alquilo Hidroperoxidasa Reductasa (TsaA)	HP1563
268	22000	21604.6	6.8	7.16	Modulador de actividad de fármaco (Mda66)	HP0630
269	19640	20261.2	6.74	7.87	Factor de terminación de traducción NusG(NusG)	HP1203
270	22100	19271.9	5.00	4.80	Pirfosfatasa inorganica (Ppa)	HP0620
271*	24000	21525.6	5.20	5.04	Cip Proteasa de componente proteolítico dependiente de ATP (CipP)	HP0794
288	12000	17042.6	5.20	4.98	Riboflavina sintasa dominio β (RibE)	HP0002
290	11900	16933.3	5.43	5.83	Proteína de Activacion de Neutrofilos (NapA),(bacterioferritina)	HP0243
292	12200	16933.3	5.45	5.83	Proteína de Activacion de Neutrofilos (NapA),(bacterioferritina)	HP0243
293*	12300	16933.3	5.60	5.83	Proteína de Activacion de Neutrofilos (NapA),(bacterioferritina)	HP0243
296	16030	18292.2	6.82	8.18	Tiol-Adhesina Peroxidasa (TagD)	HP0390
301	9970	13313.4	4.91	4.91	Proteína Ribosomal L 7/L 12 (Rpl7/I12)	HP1199
302	10000	13313.4	5.13	4.91	Proteína Ribosomal L 7/L 12 (Rpl7/I12)	HP1199
303*	8480	11854.7	4.94	4.90	Tiorredoxina (TrxA)	HP0824
305*	8390	11854.7	5.18	4.90	Tiorredoxina (TrxA)	HP0824
306*	8000	11854.7	5.20	4.90	Tiorredoxina (TrxA)	HP0824
309*	11510	12990.9	5.99	6.59	Co-Chaperona (GroES)	HP0011
311*	11540	12990.9	6.41	6.59	Co-Chaperona (GroES)	HP0011
313	10200	12983.0	7.87	7.89	Proteína Hipotetica	HP0614

De los 11 estudios tomados en cuenta para referenciar el avance que a la fecha ha tenido la caracterización del proteoma de *Helicobacter pylori*, tres referencias en total cuantificaron proteínas extracelulares. Los estudios realizados por Backert en 2005 y el realizado por Bummann en 2002 utilizaron la técnica de electroforesis bidimensional para separar las proteínas; y en el tercer estudio realizado por Smith y colaboradores en 2007 no se realizó una separación previa de ellas sino se llevo a cabo un análisis directo de las proteínas mediante cromatografía líquida e identificación por Tandem; en 2 cepas: *Helicobacter pylori* 26695 cepa secuenciada en su totalidad desde el año 1997 por Tomb y colaboradores; y la cepa ATCC 43504 la cual no ha sido secuenciada genómicamente.

Smith y colaboradores lograron identificar alrededor de 125 proteínas directamente de la fracción extracelular sin ninguna condición específica y 45 proteínas que fueron tomadas de una fracción extracelular que fue enriquecida especialmente para evitar la interferencia que pueden llegar a tener las proteínas que están presentes extracelularmente debido a la lisis que se esta presentando y no por ser proteínas extracelulares expresadas por *Helicobacter pylori*. **Tabla número 5.**

Tabla número 5. Proteínas expresadas por las cepas 26695 y 43504 de *Helicobacter pylori* en una fracción extracelular enriquecida. (Smith 2007)

LOCUS GEN	DESCRIPCION	NOMBRE DEL GEN	SEÑAL PEPTIDICA	CEPA
HP0127	Proteína de Membrana externa	<i>Omp4, horB</i>	SI	43504
HP0275	Nucleasa ATP dependiente homologa de jhp0260	<i>addB</i>	SI	26695 43504
HP0294	Amidasa alifática	<i>aimE</i>	NO	43504
HP0298	Proteína periplasmica ligadora de dipeptidos	<i>dppA</i>	SI	43504
HP0330	Ketoacido reductoisomerasa	<i>ilvC</i>	NO	43504
HP0472	Proteína de la familia de proteínas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Omp11</i>	SI	26695 43504
HP0657	Proteasa procesadora	<i>ymxG</i>	SI	26695 43504

HP0672	Aminotransferasa de la familia de proteínas dependientes de PLP	<i>aspB</i>	NO	36695 43504
HP0706	Proteína de la familia de proteínas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>hopE</i>	SI	43504
HO0710	Proteína de la familia de proteínas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>		SI	43504
HP0912	Proteína de la familia de proteínas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Omp20</i>	SI	43504
HP1073	Proteína cooperadora de captación de hierro	<i>copP</i>	NO	43504
HP1186	Anhidrasa carbonica	<i>copP</i>	SI	26695 43504
HP1395	Proteína de la familia de proteínas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Omp30</i>	SI	26695
HP1457	Lipoproteína homologa de HPAG1_1458		SI	26695 43504
HP1501	Proteína de la familia de proteínas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Omp32</i>	NO	43504
HP0887	citotoxina vacuolizante	<i>vaca</i>	SI	26695 43504
HP0175	Propil cis-trnas isomerasa	<i>htrA</i>	SI	43504
HP1019	Serina proteasa	<i>htrA</i>	SI	26695 43504
HP1454	Homologa de Jhp1347 y HPAG11461	<i>htrA</i>	SI	26695 43504
NH	Similar (HP0896)	<i>hopZ</i>	SI	43504
HP0154	Enolasa fosfopiruvato hidratasa	<i>Eno</i>	NO	43504
HP0953	Homologa HPAG1_0937		SI	26695
HP1098	Proteína homologa de jhp1024		SI	43504
HP0243	Proteína activadora de neutrofilos	<i>napA</i>	NO	26695
HP1456	Lipoproteína Lpp20 asociada a membrana	<i>lpp20</i>	SI	26695 43504
HP0875	Catalasa	<i>katA</i>	NO	43504
HP1012	Putativa zinc proteasa	<i>pqqE</i>	SI	43504
HP1285	Fosfatasa acida homologa de jhp1205		SI	43504
HP1118	Gamma glutamil transpeptidasa	<i>Ggt</i>	SI	43504
HP0229	Proteína de la familia de proteínas de membrana externa de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Omp6</i>	SI	43504
HP0011	Proteína co-chaperona	<i>groES</i> <i>hspA</i>	NO	26695 43504
HP0310	Polisacárido deacetilasa homologo de jhp0295		NO	43504
HP0380	Glutamato deshidrogenasa	<i>gdhA</i>	NO	43504
HP0570	Amino peptidasa a/i	<i>pepA</i>	NO	43504
HP1458	Tioredoxina	<i>trxC</i>	NO	43504

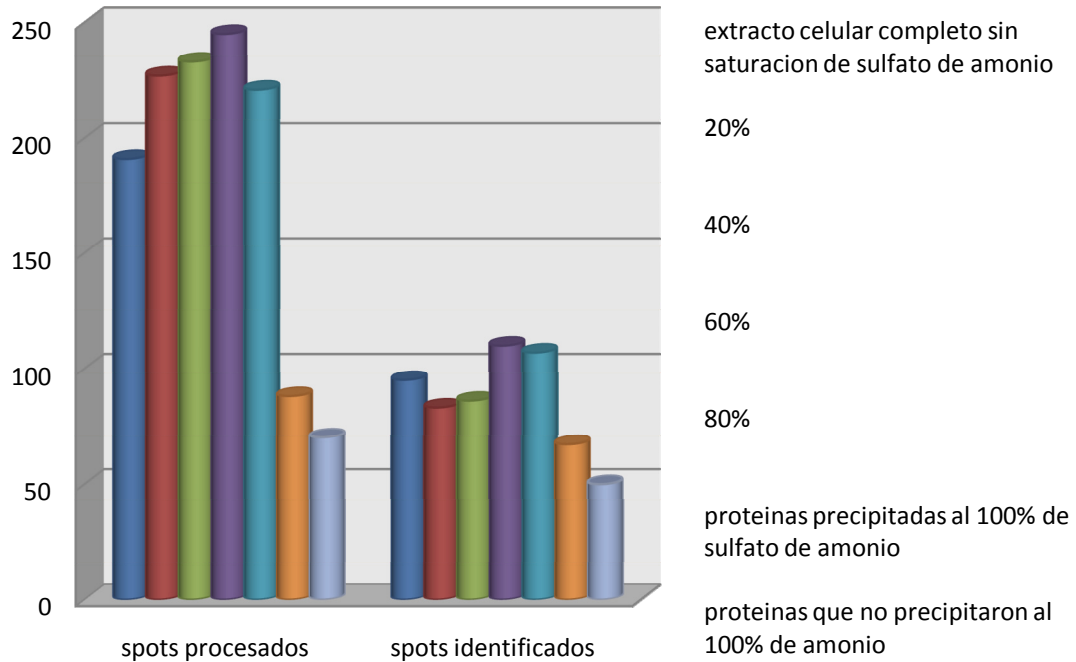
HP0026	Citrato sintasa	<i>gltA</i>	NO	43504
HP1350	Carboxi-terminal proteasa	<i>Pcr</i>	SI	43504
HP0166	Respuesta reguladora	<i>ompR</i>	NO	43504
HP0410	Putativa neuraminil-lactosa ligadora de hemaglutinina	<i>hpaA</i>	SI	43504
HP0545	Proteína de la isla de patogenicidad Cag24	<i>cagD</i>	SI	43504
HP1266	Ubiquinona-NADH oxidoreductasa subunidad NQO3	<i>nuoG</i>	NO	43504
HP1286	Proteína secretora conservada homóloga de jhp1206	<i>Ycel</i>	SI	26695
HP1375	Acetil-glucosamina-UDP-N aciltransferasa	<i>lpxA</i>	NO	43504

Los estudios realizados por Bumann, Backert y Smith identificaron en común: la proteína cooperadora captadora de hierro homóloga de HPAG_1112, anhidrasa carbónica, serina proteasa, proteína homóloga jhp1024 y gama-glutamyl transpeptidasa.

La importancia de estos tres estudios para identificar proteínas extracelulares radica en que estas proteínas tienen un papel clave en los roles de patogénesis, reconocimiento de células del hospedero y desarrollo de vacunas.

En el trabajo realizado por Jeong Won de 2008, se realizó el análisis proteómico de la cepa 26695 haciendo una precipitación fraccionada con sulfato de amonio con el fin de, identificar esas proteínas que en extractos celulares completos se encuentran en pequeñas concentraciones y no se logran separar mediante la técnica de electroforesis bidimensional 2-DE. El extracto celular fue preparado y consecuentemente precipitado a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100% de saturación con sulfato de amonio; se procesaron 191 spots (extracto completo), 227spots (20%), 233 spots (40%), 245 spots (60%), 221spots (80%), 88 spots (100%), y 70 spots (de proteínas que no precipitaron al 100% de sulfato de amonio) lográndose identificar 95, 83, 86, 110, 107, 67 y 50 proteínas respectivamente. **Figura número 8.**

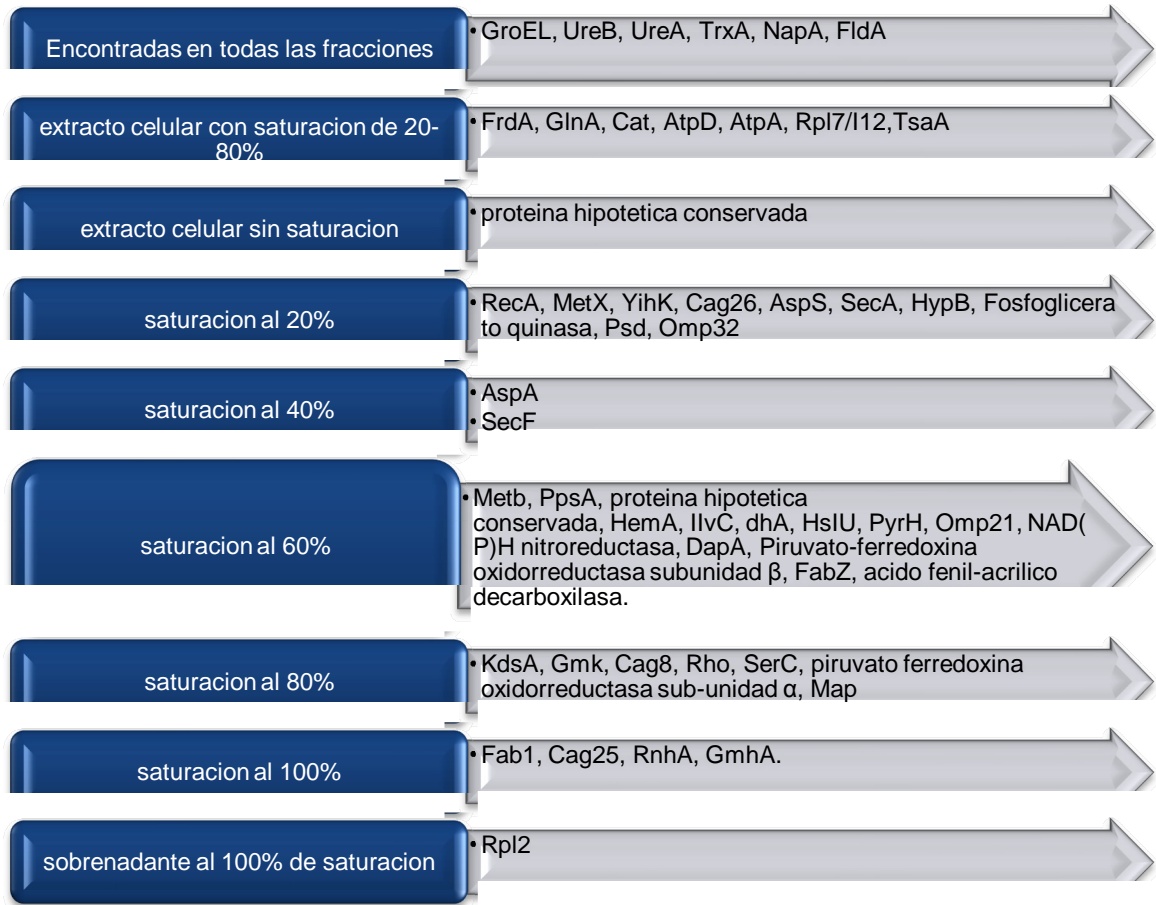
Figura número 8. Precipitación de proteínas con sulfato de amonio en diferentes grados de saturación en un extracto celular de la cepa 26695 de *Helicobacter pylori*. (Won 2008)



En total Won y colaboradores lograron identificar 98 proteínas de siete fracciones de un extracto celular de la cepa 26695 de *Helicobacter pylori* mediante MALDI-TOF- MS.

Algunas proteínas como: GroEL (HpHp0010), UreB (Hp0072), UreA (Hp0073), TrxA (Hp0824), NapA (Hp0243), FldA (Hp1161) se encontraron en todas las fracciones que se analizaron. Rpl2 (HP1316) la proteína menos abundante de las 98 que se identificaron, se encontró únicamente en el sobrenadante de la fracción saturada al 100% con sulfato de amonio. Los resultados demostraron que las proteínas captadoras de hierro como: NapA, SodB, CeuE y Pfr se encontraron en la fracción saturada al 100%. **Figura número 9.**

Figura número 9. Proteínas identificadas en un extracto celular de *Helicobacter pylori* 26695 con diferentes grados de saturación de sulfato de amonio. (Won 2008)



En el estudio presentado por Won se identificaron 29 proteínas que no habían sido identificadas en un estudio anterior realizado por Backert y colaboradores en el 2005. De estas proteínas 5 no tenían una función específica o conocida, 4 estaban involucradas en la síntesis de aminoácidos, 2 en la síntesis de proteínas, 2 en biosíntesis, 4 con metabolismo energético, 3 con procesos celulares, 2 con lipoproteínas, 2 con envoltura celular y una con patogénesis. **Tabla número 6**

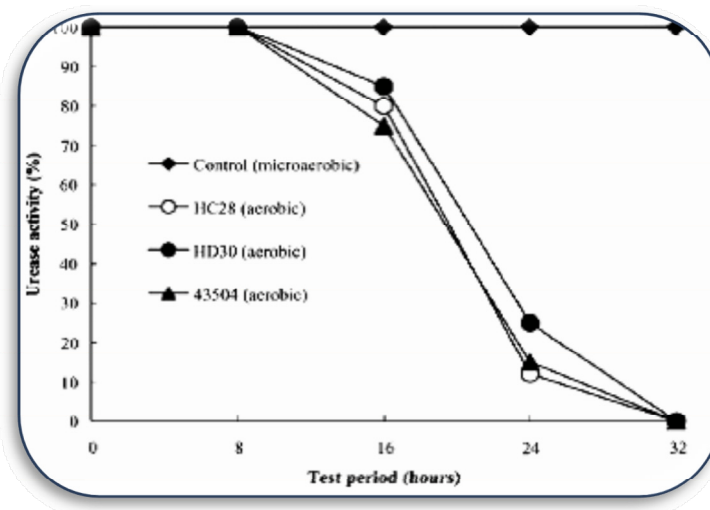
Tabla número 6. Proteínas identificadas mediante precipitación con sulfato de amonio en *Helicobacter pylori* 26695. Sin referencias anteriores. (Won 2005)

Tigr LOCUS	NOMBRE CORTO	ANOTACION	Mw/pi	% SATURACIÓN SULFATO DE AMONIO
HP0003	KdsA	Acido 8 fosfato sintetasa	30.3/8.4	80
HP0089	Pfs	Proteína pfs	25.2/4.7	80
HO0106	MetB	Cistationina γ -sintasa	41.1/6.5	60
HP0121	PpsA	Fosfoenol-piruvato sintasa	91.3/5.7	60
HP0153	RecA	Recombinasa	37.7/5.5	20
HP0183	GlyA	Serina hidroximetil-transferasa	45.7/6.9	40 -60
HP0233	ND	Proteína hipotetica conservada	45.4/4.3	60
HP0239	HemA	Glutamil-tRNA reductasa	51.9/8.3	60
HP0259	XseA	Exonucleasa VII sub-unidad larga	47.2/9.0	40
HP0285	ND	Proteína hipotetica conservada	47.8/9.1	20-40-60
HP0330	IlvC	Ketoacido reducto-isomerasa	36.5/8.93	60
HP0347	ND	Proteína hipotetica conservada	34.3/10.0	60
HP0361	HisT	Seudoridilato sintasa I	27.3/10.2	60-80
HP0364	NrdB	Difosfato ribonucleosido reductasa	39.5/5.1	40
HP0516	HslU	Proteína de choque térmico	50.2/5.2	60
HP0528	Cag8	Proteína isla patogenicidad	60.6/9.9	80
HP0546	Cag25	Proteína isla patogenicidad	12.0/9.5	100
HP0604	HemE	Uroporfirinogeno decarboxilasa	38.8/8.4	60-80
HP0661	RnhA	Ribonucleasa H	16.2/9.2	100
HP0723	AnsB	Asparginasa II	37.7/9.5	60-80
HP0823	ND	Proteína hipotetica conservada	13.2/8.5	60-80
HP0857	GmhA	Fosfoheptosa isomerasa	21.1/6.4	100
HP0930	SurE	Proteína de fase estacionaria	30.0/6.9	60
HP1013	DapA	Dihydrodipicolinato sintetasa	33.2/8.1	60
HP1126	TolB	Proteína de tolerancia colicina	47.8/9.6	60-80

Ming Chuang. El análisis proteómico de la cepa ATCC 43504 con los aislamientos clínicos HD30 (pacientes con ulcera duodenal) y HD28 (pacientes con cáncer gástrico), fueron utilizados por este equipo de investigación para hacer un análisis de proteínas expresadas por *Helicobacter pylori* bajo condiciones de estrés oxidativo. Para ello se llevo a cabo una comparación de los niveles de proliferación, actividad de la ureasa y expresión proteínica de *Helicobacter pylori* en condiciones normales de microaerofilia (5% O₂) y condiciones de estrés oxidativo (20% O₂).

Los resultados revelaron que alrededor de 10 proteínas de *Helicobacter pylori* se expresan bajo condiciones de tensión oxidativa: UreE, AhpC, NapA, GroEL, UreB, CheY. El aporte mas notable de este estudio es la identificación del comportamiento de UreE y AhpC (proteínas accesorias de Ureasa), cuyo potencial antioxidante se ve disminuido ante tensiones de oxigeno al 20%,, inhibiendo de esta manera la actividad de la enzima Ureasa hasta el punto de inhibir por completo su actividad a las 32 horas. **Figura número 10**

Figura número 10. Comportamiento de la enzima ureasa bajo tensión oxidativa de 20% O₂.(Chuang 2005)



6.3 CORRELACIÓN PROTEÓMICA ENTRE LA INFECCIÓN POR *Helicobacter pylori* Y ENFERMEDADES ASOCIADAS.

En el presente estudio se tomaron en cuenta 11 referencias que cumplieron con los criterios de inclusión sobre la asociación entre cáncer gástrico, úlcera péptica y gastritis. **(Tabla número 7)**

Tabla número 7. Características de los estudios proteómicos realizados para analizar la infección por *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas hasta la fecha.

AUTOR	AÑO	CEPA	CARACTERÍSTICAS	TECNICA	# SPOTS ANALIZADO	PROTEINAS IDENTIFICADAS
Ghalia Khoder	2009	aislamientos clínicos	biomarcadores en ulcera duodenal y cáncer gástrico	SELDI-TOF-MS	18	3
Yu Fen Lin	2007	HD12	Detección de antígenos de ulcera duodenal.	Q-TOF-MS	11	3
Diego Pereira	2006	Aislamientos clínicos	Análisis proteómico comparativo entre ulcera duodenal y cáncer gástrico	MALDI-TOF-MS	ND	8
Roberta Mini	2006	HP 328 G39 10K	Detección de antígenos en tres cepas diferentes	MALDI-TOF-MS	ND	30
Peter Ellmark	2006	SinFabs	Identificación de proteínas asociadas a patologías gástricas	Arrays de proteínas	127	41
Yu Fen Lin	2006	HC5	Detección antígenos relacionados con cáncer gástrico Y UD	IMMUNO-BLOTING	60	24
Qin Yu He	2004	Aislamientos clínicos	Detección de proteínas alteradas en cáncer gástrico	IMMUNO-BLOTING	1300	21
Govorun	2003	Aislamientos clínicos	Caracterización proteomica de enfermedades asociadas	MALDI-TOF-MS	500	12
Alexander Krah	2003	26695	Identificación de antígenos relacionados con cáncer gástrico	MALDI TOF	1800	14
Gaby Haas	2002	26695	Reconocimiento de antígenos relacionados con cáncer gástrico		310	32
Jungblut	2000	26695	Análisis proteómico de la cepa 26695 y detección de antígenos de cáncer gástrico.	MALDI-TOF	1800	152

El análisis sobre la asociación entre la infección por *Helicobacter pylori* y linfoma gástrico tipo MALT mediante técnicas proteómicas no se pudo realizar ya que no se encontró literatura al respecto en las bases de datos consultadas.

En el trabajo realizado por Jungblut y colaboradores, se utilizaron los sueros de pacientes con infección por *Helicobacter pylori* (positivo) cáncer gástrico (positivo) identificados como Mpi44 y *Helicobacter pylori* (positivo) úlcera (positivo) identificado como Mpi 54; para hacer la detección de antígenos reconocidos por la cepa 26695. Los antígenos específicos para cáncer gástrico asociado con infección por *Helicobacter pylori* identificados fueron: UreB, Yihk, AcnB, Icd, Ffh, YmxG, GltA, HypB, NAD(P)H, factor 2 plegador de células, LytB, TagD, Piruvato-ferredoxina oxidorreductasa sub-unidad γ , FabG, y CeuE. Los antígenos reconocidos por *Helicobacter pylori* 26695 en pacientes con *ulcus ventriculi* (úlcera) fueron: GlnA, FrdA9, Cag 26 y Flavodoxina. **Tabla número 8.**

El suero del paciente *Helicobacter pylori* negativo reacciono solo con algunas de las proteínas más abundantes en la separación por 2-DE presentes en *helicobacter pylori* como: GroEL, UreA y Catalasa.

Tabla número 8. Antígenos de *Helicobacter pylori* 26695 asociados a cáncer gástrico y úlcera, identificados por 2-DE e inmunoblotting en sueros humanos.(Jungblut 2000)

No. Spot	Proteína Identificada	ORF	Pac. gastritis Crónica Hp -Mpi40	Pac. Cancer gástrico Hp+ Mpi44	Ulcus ventriculi Pac. Hp + Mpi54
A194	Proteína de choque térmico y chaperona (GroEL)	HP0010	X	X	X
A323	Ureasa sub-unidad β (UreB)	HP0072	-	X	-
A325	Ureasa sub-unidad β (UreB)	HP0072	-	X	-

A343	Ureasa sub-unidad β (UreB)	HP0072	-	X	-
A349	Proteína ligadora-GTP homologa de FusA (YihK)	HP0480	-	X	-
A390	Proteína de choque térmico y chaperona GroEL	HP0010	X	X	X
A431	Glutamina sintasa (GlnA)	HP0512	-	-	X
B2	Aconitasa B (AcnB)	HP0779	-	X	-
B17	Flavoproteína sub-unidad Fumarato Reductasa (FrdA)	HP0192	-	-	X
B126	Proteína isla de patogenicidad Cag(Cag26)	HP0547	-	-	X
B210	Isocitrato deshidrogenasa (Icd)	HP0027	-	X	-
B320	Proteína de la señal de reconocimiento de partículas (Ffh)	HP1152	-	X	-
B439	Catalasa	HP0875	X	X	-
B455	Procesamiento de proteasa (YmxG)	HO0657	-	X	-
B483	Citrato sintasa (GltA)	HP0026	-	X	-
C109	Proteína de formación/expresión hidrogenasa (HypB)	HP0900	-	X	X
D230	Nitroreductasa oxígeno insensible NAD(P)H	HP0954	-	X	-
D249	Factor 2 plegador de células	HP0175	-	X	-
D265	Proteína de tolerancia a la penicilina (LytB)	HP0400	-	X	-
D281	Tiol-Adhesina peroxidasa (TagD)	HP0390	-	X	-
D287	Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa sub-unidad γ	HP1108	-	X	-
D295	Proteína 3-ketoacil-acil transportadora reductasa (FabG)	HP0561	-	X	-
D313	Transportador ABC sideroforo (III), proteína ligadora de hierro periplásmico (CeuE)	HP1562	-	X	-
D316	Ureasa sub-unidad α (UreA)	HP0073	X	X	-
D322	Ureasa sub-unidad α (UreA)	HP0073	-	X	-
E27	Proteína ribosomal L7/L12 (Rpl7/l12)	HP1199	-	X	X
E35	Proteína ribosomal L7/L12 (Rpl7/l12)	HP1199	-	X	X
E43	Proteína hipotética	HP0697	-	X	-
E62	Flavodoxina (FldA)	HP1161	-	-	X
F6	Co-chaperona (GroES)	HP0011	-	X	X
F9	Co-chaperona (GroES)	HP0011	-	X	X
F16	Co-chaperona (GroES)	HP0011	-	X	X

En la revisión de la literatura se encontró que a la fecha se han identificado cuatro antígenos en la cepa 26695 asociados a carcinoma gástrico mediante técnica MALDI-MS. La proteína A de captación de Hydantoina (HyuA), ATP sintasa F1 sub-unidad alfa (AtpA), chaperonina GroES y la proteína de choque térmico y chaperona GroEL. **Tabla número 9.**

Tabla número 9. Características de antígenos asociados a cáncer gástrico identificados mediante técnica MALDI-TOF-MS en *Helicobacter pylori* 26695.

Proteína A de captación de hidantoina	ATP sintasa F1 sub-unidad alfa	Chaperonina GroES	Chaperona GroEL
Nombre corto: HyuA	Nombre corto: AtpA	Nombre corto: GroES, HSP70	Nombre corto: GroEL, cpn60, HSP60
ORF: HP 0695	ORF: HP 1134	ORF: HP 0011	ORF : HP 0010
Peso (Da): 78532.8	Peso(Da): 55143.1	Peso: 12990.9	Peso (Da) 58263
Punto isoeléctrico: 6.9	Punto isoeléctrico: 5.1	Punto isoeléctrico: 6.6	Punto isoeléctrico: 5.5
Función molecular ND	Función molecular: hidrolasa	Sunción molecular: co- chaperona	Función molecular: chaperona
Localización ND	Localización: membrana celular interna.	Localización	Localización: citoplasma
Proceso biológico ND	Proceso biológico: síntesis ATP, transporte iones Hidrogeno.	Proceso biológico	Proceso biológico: respuesta a tensión celular.
Función ND	Función: producción de ATP a partir de ADP en presencia de protones a travez de un gradiente de membrana.	Función: forma complejo con GroEL para promover el plegamiento de otras proteínas.	Función: promueve el plegamiento de otras proteínas

En el estudio inmunoproteómico llevado a cabo por Haas y colaboradores, en donde se tomaron 24 pacientes con patologías asociadas a *Helicobacter pylori* para saber que antígenos de la cepa 26695 eran reconocidos, se evidencio una frecuencia mayor de 40 en las proteínas HyuA, PdxJ, FrdA, Cad, una proteína de la membrana externa y una proteína hipotética

conservada, que fueron reconocidas por la cepa 26695 de los pacientes que padecían adenocarcinoma gástrico. **Tabla número 10.**

Tabla número 10. Proteínas de *Helicobacter pylori* 26695 reconocidas por sueros de pacientes con cáncer gástrico con frecuencias mayores a 10 identificadas mediante MALDI-MS. (Haas 2002)

Clase de proteína	Numero spot	Proteína identificada	Nombre corto	gastritis % frecuencia	Úlcera % frecuencia	Cáncer % frecuencia
A6 biosíntesis de aminoácidos	2_377	Proteína A captadora de Hidantoína	HyuA	13	5	45
D7 piridoxina, biosíntesis de cofactores	4_314	Proteína J fosfato piridoxal	ND	10	14	42
E4 metabolismo central intermediario	4_200	Anhidrasa carbonica	ND	1	0	17
F3 metabolismo energético anaerobio	2_17	Subunidad flavoproteína fumarato reductasa	FrdA	13	23	45
F11 ciclo TCA	2_2	Aconitasa hidratada 2	AcnB	8	6	23
G4 proteínas ligadoras y transportadoras	4_313	Proteína captadora de hierro periplásmico	CeuE	4	4	21
I2 RNA polimerasa dependiente de DNA	1_29	RNA polimerasa dirigida a DNA dominio α	RpoA	0	0	20
K2 proteína de estabilización y chaperona	1_177	GroEL	GroEL	4	6	19
M2 estructuras de superficie	4_132	proteína putativa ligadora neuraminil-lactosa homóloga Hemaglutinina	HpaA	18	15	33
M5 envoltura celular	4_202	Proteína de membrana externa		12	29	50
P1 desconocida	2_35	Cinamil-alcohol deshidrogenasa ELI3-2	Cad	5	3	40
Q1 hipotética conservada	4_262	Proteína secretora hipotética conservada	ND	12	14	42

En el presente estudio se analizó el trabajo inmunoproteómico de Krah en donde se compararon 30 sueros de pacientes de dos patologías distintas: úlcera duodenal y cáncer gástrico con *Helicobacter pylori* cepa 26695 y haciendo un análisis de condiciones como la edad y el sexo. El ponderado de las edades entre cada grupo fue significativamente diferente, luego de obtener los resultados correspondientes se hicieron subgrupos de 18 pacientes de cáncer gástrico y 19 de úlcera duodenal con una media de 60+/-7 DS y 55+/-9 DS respectivamente, donde los spots 1511(no identificado), 2505(GroEL), 4404(no asignado), 4706(no identificado) y 5708(HyuA) de pacientes con cáncer gástrico influyeron en los niveles de significancia. **Tabla número 11.**

Tabla número 11. Características de sueros de los pacientes utilizados en comparación proteómica entre cáncer gástrico, úlcera duodenal y cepa 26695 de *Helicobacter pylori*. (Krah 2003)

grupo	N° pacientes	Rango edad	Media de edad	N° hombres	N° mujeres	Estado h.pylori
Cáncer gástrico	30	41-87	66(+/-10)	14	16	positivo
Úlcera duodenal	30	24-71	47(+/-13)	15	15	positivo

En el grupo de 14 antígenos identificados se dio un punto de iniciación para evaluar posibles combinaciones entre ellos para la obtención de un nuevo test de diagnóstico. En este estudio se realizó un modelo hipotético de un kit de diagnóstico posible para cáncer gástrico basado en 5 spots candidatos potenciales como: 2509(especie 1 de GroEL), 4003(especie 1 de GroES),

4005(otras especies de GroES), 4706(no identificado) y 5708(1 especie de HyuA); basados en el criterio de que 3 de los 5 spots fueron altamente reconocidos por los sueros en estudio logrando una sensibilidad de 77% y una especificidad del 83%. **tabla número 12.**

Tabla número 12. Lista de proteínas identificadas de los 14 spots con mayor significancia en un estudio inmunoproteómico de *Helicobacter pylori* 26695. (Krah 2003).

N° Spot	TIGR locus	Nombre proteína	Nombre corto	Método identificación.
1511	ND	No identificada	ND	MALDI-TOF
2412	HP1134	ATP sintasa F1 sub-unidad α	GroEL	DATABASE
2505	HP0010	Proteína de choque térmico 60	GroEL	DATABASE
2508	HP0010	Proteína de choque térmico 60	GroEL	DATABASE
2509	HP0010	Proteína de choque térmico 10	GroES	DATABASE
4003	HP0011	Proteína de choque térmico 10	GroES	DATABASE
4005	HO0011	Proteína de choque térmico 10	GroES	DATABASE
4404	ND	No asignado	ND	ND
4706	ND	No identificado	ND	ND
4720	HP0695	Proteína A captadora de hidantoina	HyuA	DATABASE
5002	HP0011	Proteína de choque térmico 10	GroES	DATABASE
5101	ND	No asignado	ND	ND
5707	HP0695	Proteína A captadora de hidantoina	HyuA	DATABASE
5708	HP0695	Proteína A captadora de hidantoina	HyuA	DATABASE

7. CONCLUSIONES

Los análisis proteómicos realizados mediante la combinación de 2-DE e inmunoblotting son altamente sensibles y específicos ya que solamente revelan los spots que realmente tienen una reacción antígeno-anticuerpo lo que nos proporciona datos de posibles biomarcadores de enfermedad.

Las proteínas antigénicas de *Helicobacter pylori* son muy pocas a pesar de la alta variabilidad genética de sus diferentes cepas.

UreE y AhpC, proteínas accesorias de la ureasa pueden ser listadas como posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden en la erradicación de *Helicobacter pylori*.

La correlación entre las funciones de las proteínas y su expresión en el cáncer gástrico nos provee una importante información para poder identificar biomarcadores específicos de la enfermedad.

La aplicación principal de la 2D-PAGE es la proteómica de expresión. En esta aproximación, la expresión de proteínas de dos muestras se puede comparar de forma cualitativa y cuantitativa.

El análisis proteómico de microorganismos se halla en una etapa de descubrimiento, ya que todas las publicaciones consultadas se centran en la búsqueda de biomarcadores, mecanismos de virulencia y dianas terapéuticas.

Los alelos pro inflamatorios del locus de la IL-1 β fueron asociados muy consistentemente con un incremento en el riesgo de Cáncer gástrico

La expresión de factores de virulencia, la infección por *Helicobacter pylori* y su duración, la respuesta inmune, el nivel de secreción de ácido y factores

externos además de la expresión de ciertas proteínas tienen una contribución muy relativa en el progreso hacia el cáncer gástrico.

La proteómica es una potente herramienta a nivel de investigación y diagnóstico de enfermedades tumorales como el cáncer gástrico pero de difícil aplicación a nivel clínico.

No se identificó un protocolo estandarizado para los usos de técnicas proteómicas en la práctica clínica actual para el manejo de ninguna enfermedad gástrica asociada a la infección por *Helicobacter pylori*.

La espectrometría de masas produce información acerca de la masa de las moléculas presentes en una muestra, y en algunos casos se puede tener una estimación de su concentración.

La 2D-PAGE también presenta muchas limitaciones. Es una técnica muy laboriosa que requiere bastante tiempo, y difícil de automatizar. La 2D-PAGE está limitada por el número y el tipo de proteínas a resolver.

Las proteínas muy grandes o hidrofóbicas no entran en el gel durante la primera dimensión y las proteínas muy ácidas o muy básicas no se resuelven bien. Algunos de estos problemas se pueden resolver mediante fraccionamiento, la utilización de determinadas condiciones de solubilización y la utilización de IPGs con diferentes rangos de pH.

La posibilidad de explorar el proteoma de los sistemas biológicos en base a tecnologías cada vez más potentes abre unas expectativas sin precedentes en el estudio de la patogénesis molecular de enfermedades así como en la identificación de paneles de biomarcadores específicos que permitan diagnosticar, clasificar, pronosticar y predecir enfermedades.

8. RECOMENDACIONES

Realizar estudios experimentales con población de nuestro país, ya que desafortunadamente en toda las bases consultadas solo ese encontró un estudio realizado con pacientes colombianos, siendo de gran relevancia que somos un país con tasas muy altas por infección con *Helicobacter pylori* y también con altas incidencias de cáncer gástrico.

Investigar sobre el uso de las técnicas proteómicas mas allá de la identificación de biomarcadores ya que una vez identificadas dichas proteínas, por ejemplo a nivel de laboratorio clínico que como bacteriólogos nos compete la determinación de las mismas se haría de la forma convencional.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Anderson N, Anderson N. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998; 19: 1853- 1861
2. Backert S, Kwok T, Schmid M, Selbach M, Moese S, Peek R, König W, Meyer T. Subproteomes of soluble and structure-bound *Helicobacter pylori* proteins analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5: 1331-1345.
3. Backert S, Jungblut PR, Meyer TF. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the *Helicobacter pylori* CagA protein after translocation into gastric epithelial cells. *Proteomics*. 1: 608-617
4. Baltrus D.A, Amicva M. R, Covacci A. The complete genome sequence of *Helicobacter Pylori* Strain G27. *J. of Bacteriology*. 2009; 447-448
5. Bumann d, Aksu S, Wendland M, Janek K, Arndt U, Sabart N, Meyer T, Jungblut P. proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*. 2002; 3396-3403.
6. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Gastric precancerous process in a High Risk population: Cross-sectional Studies. *Cancer Research*. 1990; 50:4731-4736.
7. Cho M.J, Jeon B.S, Park J.W, Jung T.S, Lee W.K, Choi Y.Y, Lim D. identifying the major proteome components of *Helicobacter pylori* strain 26695. *Electrophoresis*. 2002; 23: 1161:1173.

8. Chuang M, Wu MS, Lin JT, Chiou SH. Proteomic analysis of proteins expressed by *Helicobacter pylori* under oxidative stress. *Proteomics*. 2005; 5: 3895-3901.
9. Ellmarkc P, Ingvarssont J, Carlssont A, Lundins S, Wingrent C, Borrebaeck C. identification of protein expression signatures associated with *Helicobacter pylori* infection and gastric adenocarcinoma using recombinant antibody microarrays. *Molecular and cellular proteomics*. 2006; 1638-1646.
10. Govorun V.M, Moshkovskii S.A, Tikhonova O.V, Goufman E.I, Serebryakova M.V, Kudryavtseva L.V. comparative analysis of proteome maps of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Biochemistry(Moscow)*. 2003; 68: 52-60.
11. Haas G, Karaali G, Ebermayer K, Meyer T, Aebischer T, Jungblut P. Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics*. 2002; 2: 313-324.
12. Jungblut P.R, Bumann D, Haas G, Zimny U, Holland P, Iamer S, Siejak L. comparative proteome analysis of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiology*. 2000; 36(3). 710-725.
13. Khoder G, Yamaoka Y, Fauchere J, Burucoa C, Atanassov C. proteomic *Helicobacter pylori* biomarkers discriminating between duodenal ulcer and gastric cancer. *J. of Chromatography*. 2009; 1193-1199.
14. Krah A, Miehke S, Pleissner K, Arndt U, Meyer T, Jungblut P, Aebischer T. identification of candidate antigens for serologic detection

of *Helicobacter pylori*-infected patients with gastric carcinoma. *Int.J. Cancer*. 2004; 108: 456-463.

15. Kusters J.G, Van H.M, Kuipers E. pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin. Micr. Rev.* 2006; 19(3): 449-490.
16. Lanz H, utilidad de la proteomica en la identificación de nuevos biomarcadores. *Salud publica de Mexico*. 2007; 49: 62-63
17. Latterich M, Abramovitz M, Leyland B. Proteomics: New technologies and clinical applications. *European Journal of Cancer*. 2008; 44: 2737-2741
18. Li W, Fang J, Qu Y, Chen X, Qin J, Gu Q, Yan M, Zhu Z, Liu B. comparative proteomics analysis of human gastric cancer. *World J. of Gastroenterology*. 2008; 14(37): 5657-5664.
19. Lin Y.F, Chen Ch. Y, Tsai M, Shiang M, Wang Y. Ch, Chuang E, Chow L. Duodenal ulcer- related antigens from *Helicobacter pylori*. *Molecular and cellular proteomics*. 2007; 10018-1026.
20. Lin Y.F, Wu M.Sh, Chang Ch, Lin S, Lin J, Sun Y, Chen D, Chow L. comparative immunoproteomics of identification and characterization of virulence identification and characterization of virulence factors from *Helicobacter pylori* related to gastric cancer. 2006; 1484-1496.
21. Lock R, Cordwell S, Coombs G, Walsh B, Forbes G. proteome analysis of *Helicobacter pylori* of type strain NCTC 11637. *Pathology*. 2001, 33: 365-374.

22. Lock R, coombs G, Williams tracy, Pearman J, Grubb W, Melrose J:H. proteome analysis of highly immunoreactive proteins of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2002; 7: 175-182.
23. Mendoza H, Utilidad de la proteomica en la identificacion de nuevos biomarcadores. *Salud publica de mexico*. 2007; 49: 62_64.
24. Mini R, Bernardini G, Salzano A, Renzone G, Scaloni A, Figura N, Santucci A. comparative proteomics and immunoproteomics of helicobacter pylori related to different gastric pathologies. *J. of Chromatography B*. 2006; 833: 63-79.
25. Oh J.D, Backed K, Giannakis M. the complete genome sequence of a chronic atrophic gastritis *Helicobacter Pylori* strain: Evolution during disease progression. *PNAS*. 2006; 103(26):9999-10004.
26. Pereira D, Martins D, Winck F, Smolka M, Novello J.C. Comparative analysis of two-dimensional electrophoresis maps (2-DE) of *Helicobacter pylori* from brazilian patients with chronic gastritis and duodenal ulcer: a preliminary report. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 2006; 48(3): 175-177.
27. Sabarth n, Lamer S, Arndt U, Jungblut P, Meyer T, Bumann D. identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. *The journal of biological chemistry*. 2002; 277(31): 27896-27902.

28. Smith T, Lim JM, Weinberg M, Wells L, Hoover T. Direct analysis of the extracellular proteome from two strains of *Helicobacter pylori*. *Proteomics*.2007; 7: 2240-2245.
29. Tomb J.F, White O, Kerlavaje A. the complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 1997; 388:539-547
30. Velculescu V, Zhang L, Zhou W. Characterization of the Yeast Transcriptome. *CELL*. 1997; 88: 2443-251
31. Won J, Gyu S, Young J. Proteomic analysis of *Helicobacter pylori* cellular proteins fractionated by ammonium sulfate precipitation. *Electrophoresis*. 2008; 29: 2891-2903
32. Won J, Song JY, Lee SG, Jun JS, Park JU, Chung MJ, Jung, Lee WK. Quantitative analysis of representative proteome components and clustering of *Helicobacter pylori* clinical strains. *Helicobacter*.2006, 11: 533-543.
33. Yan j, Fei Y. Frequencies of the expression of main protein antigens from *Helicobacter pylori* isolates and production of specific serum antibodies in infected patients. *World Journal of Gastroenterology*. 2005; 11: 421-425
34. Yu He Q, Cheung Y, Leung S, Yuen S, Chu K.M, Chiu J.F. Diverse proteomic alterations in gastric adenocarcinoma. *Proteomics*. 2004; 4: 3276-3287.

ESTADO DEL ARTE SOBRE PROTEÓMICA DE LA INFECCIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI* Y ENFERMEDADES ASOCIADAS

María Elvira Díaz Macías

Directora: Alba Alicia Trespalacios Rangel MSc

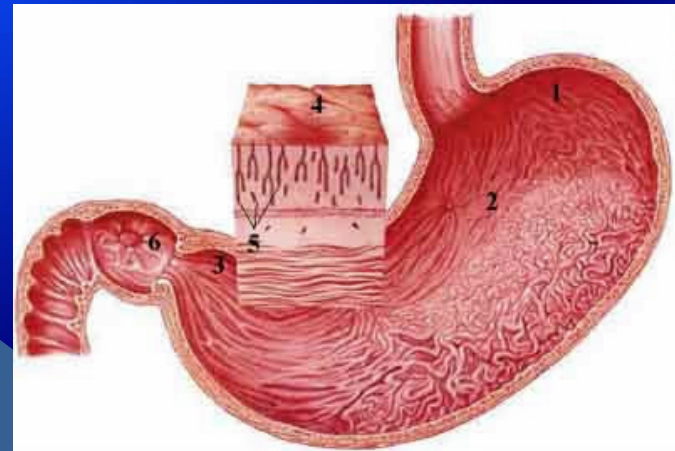
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Facultad de Ciencias Básicas



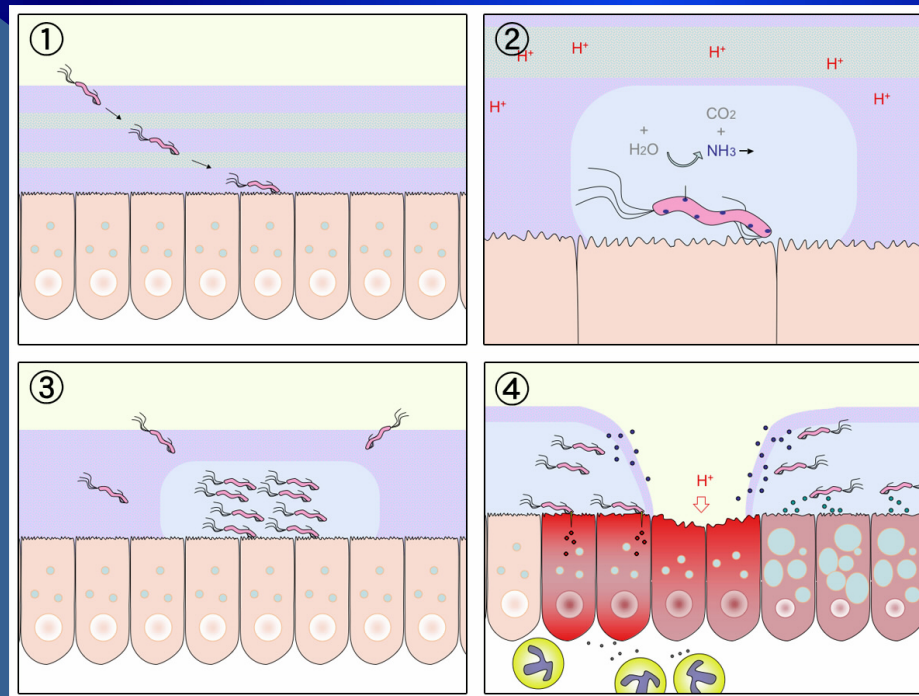
Helicobacter pylori

- ❖ movilidad 4 ó 6 flagelos
- ❖ 0,5 a 1,0 μm de ancho y de 3 μm de largo
- ❖ Carcinógeno tipo I desde 1994
- ❖ 5 a 7 días de incubación a 37°C
- ❖ atmósfera microaerofílica
- ❖ catalasa, oxidasa y ureasa positivas



www.zonamedica.com

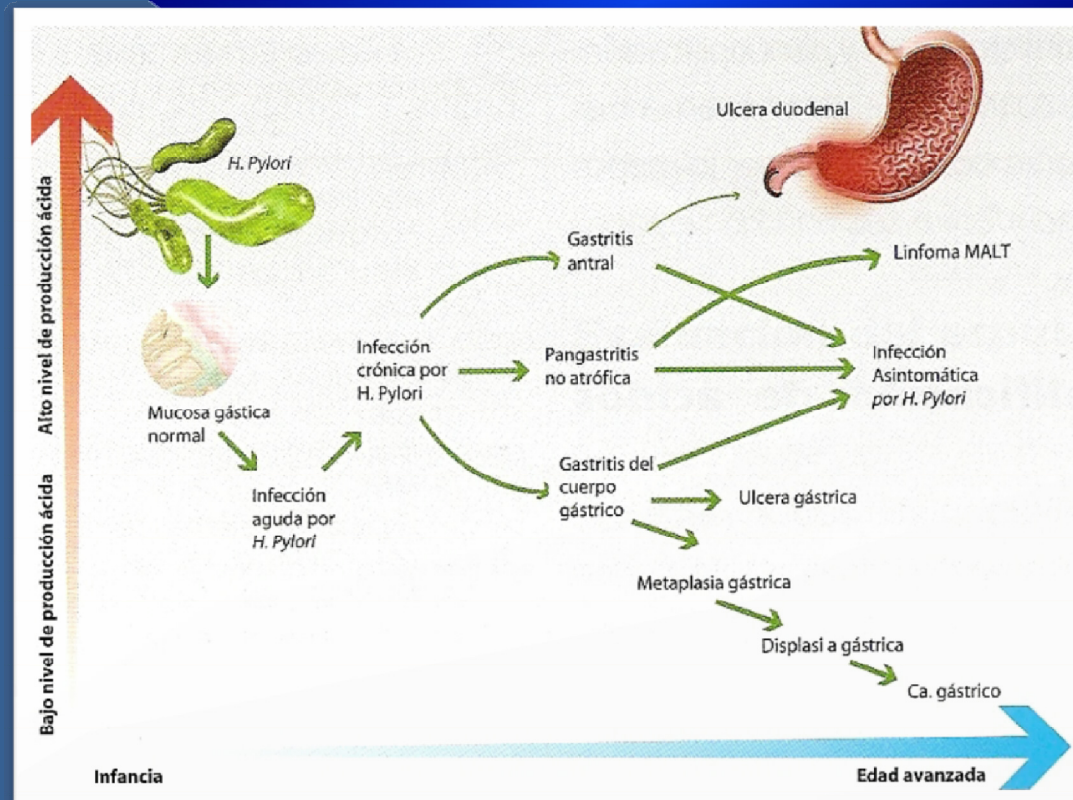
Modo de infección de *Helicobacter pylori*



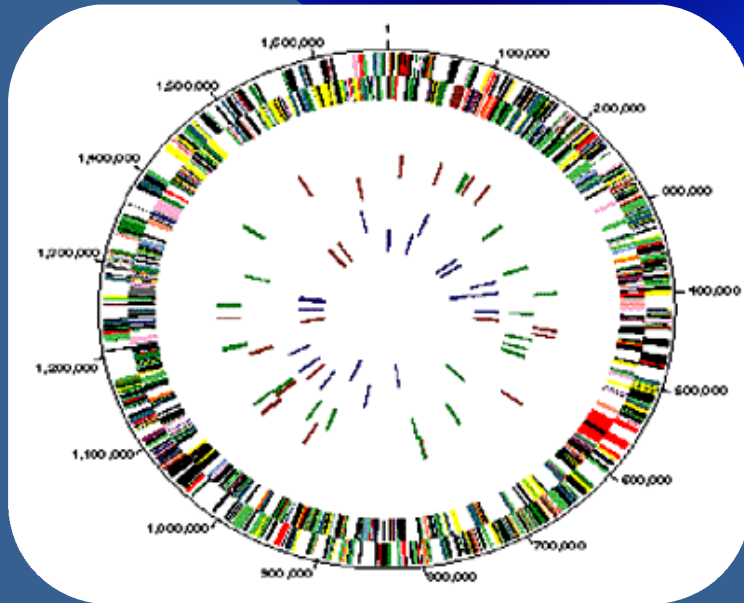
<http://es.wikipedia.org>

1. Penetra la capa mucosa del estómago y se adhiere a la superficie de la capa mucosa epitelial gástrica.
2. Produce amoníaco a partir de la urea, para neutralizar el ácido gástrico.
3. Migración y proliferación de *H. pylori* al foco de infección.
4. Se desarrolla la ulceración gástrica con destrucción de la mucosa, inflamación y muerte de células mucosas.

Implicación clínica de la infección por *Helicobacter pylori*

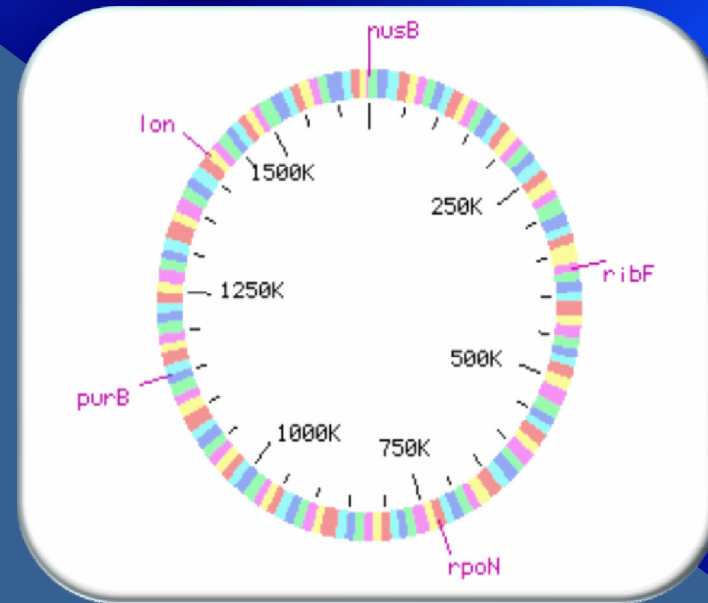


Secuenciación genómica



Tomb et al. Nature 1997; 388: 539-547

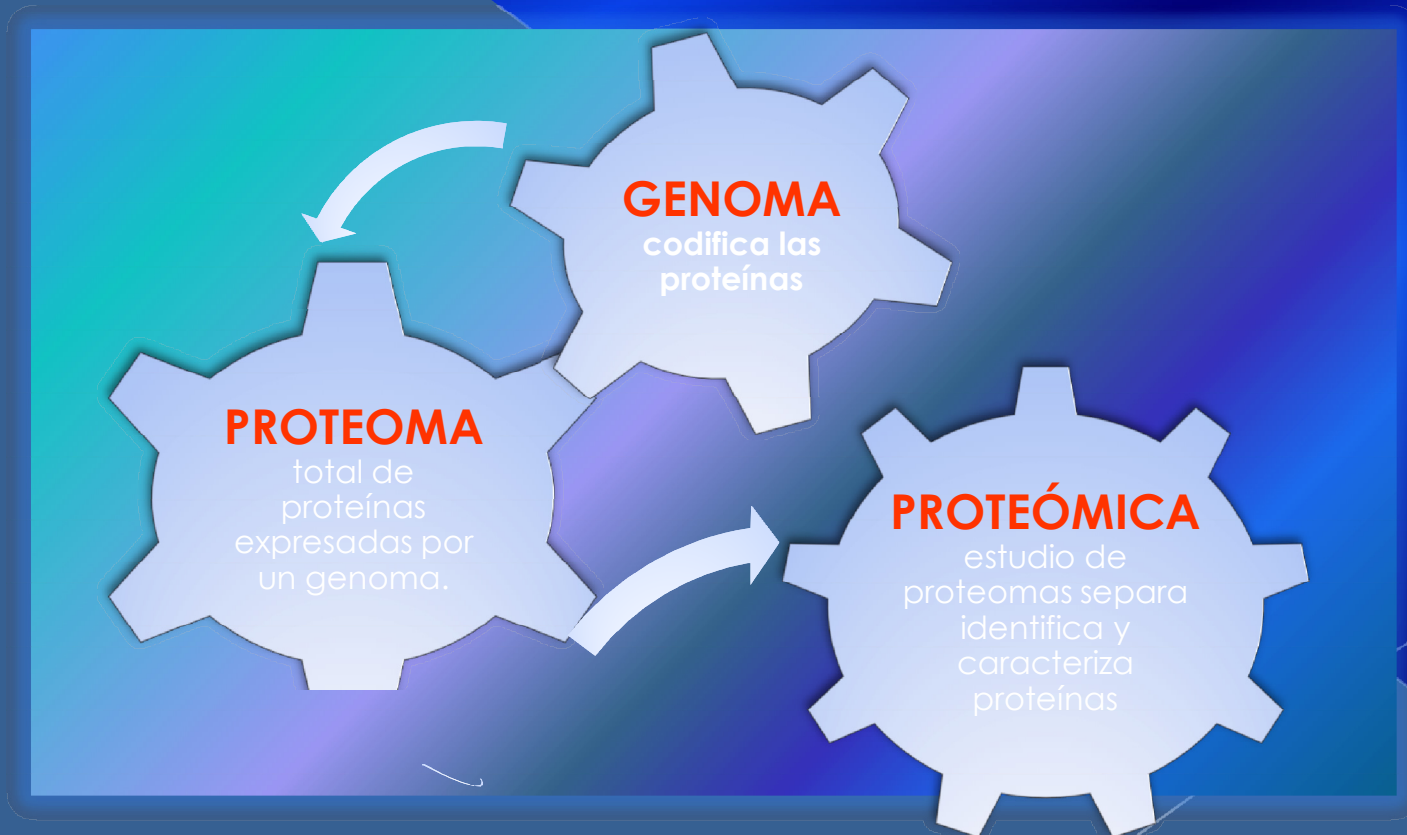
- ❖ 26695 agosto de 1997
- ❖ J99 enero de 1999
- ❖ HPAG1 junio de 2006
- ❖ G27 octubre de 2008



Alm et al. Nature 1999; 397: 176-180).

Introducción a la proteómica

Serie de métodos y técnicas destinados a estudiar y caracterizar el conjunto de proteínas que se expresan en el genoma de una célula o tejido bajo unas condiciones dadas



Técnicas proteómicas

SIN SEPARACION

- MATRICES
- MICROMATRICES

CON SEPARACION

- LC
- SDS
- 2-DE

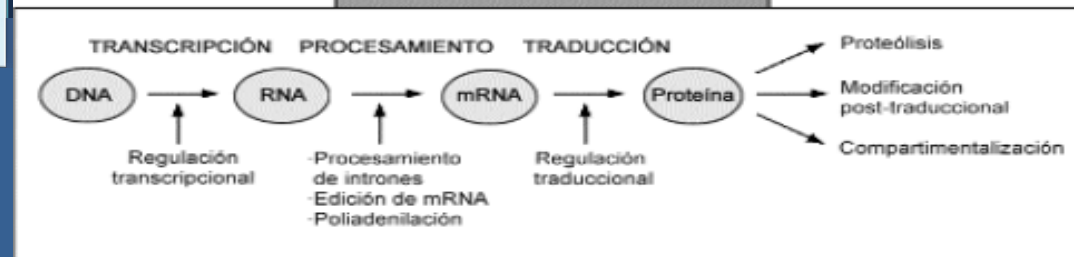
ANALISIS INDIVIDUALIZADO

- MS (ESI, MALDI)

PROCESAMIENTO E INTERPRETACION

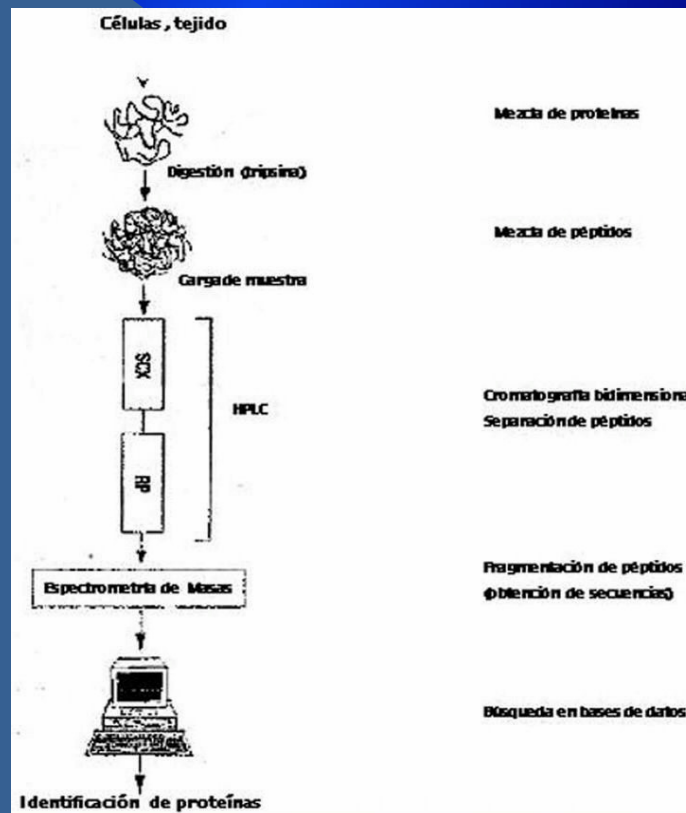
- HUELLA PEPTIDICA O ESPECTRO (MS/MS)

EL PROTEOMA ES DINÁMICO

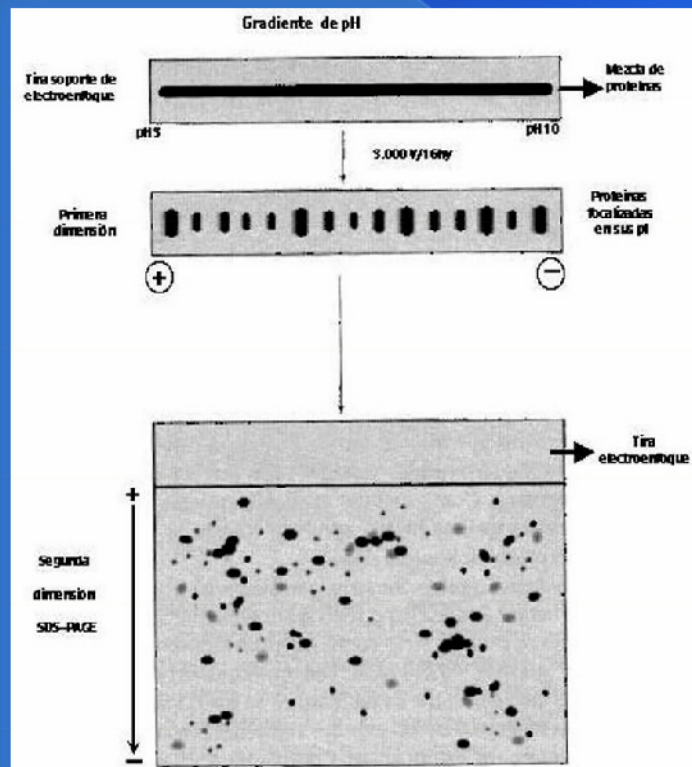


Separación de proteínas mediante cromatografía líquida

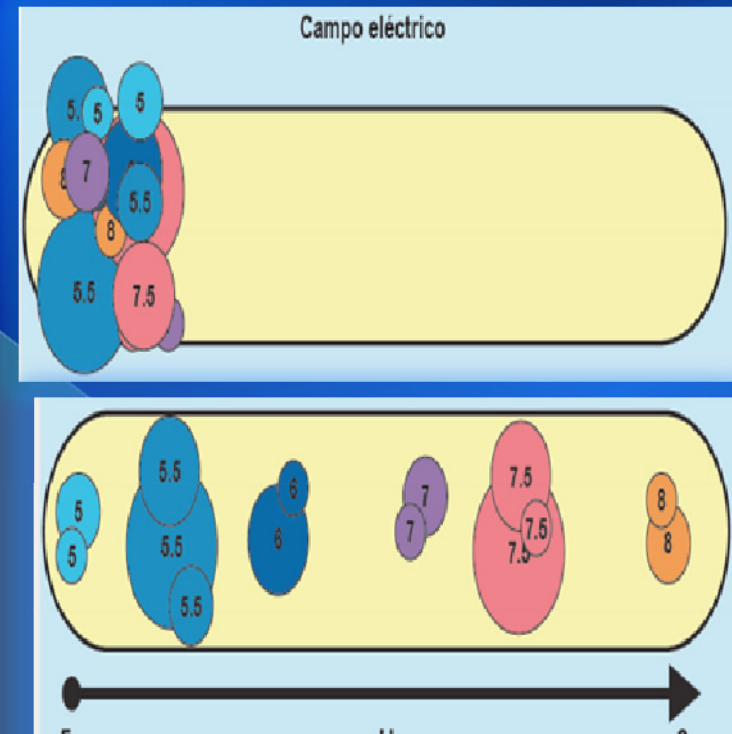
técnica analítica que separa las moléculas en función del tipo de soporte (columna cromatográfica) que se utilice (cambio iónico, fase reversa, afinidad, etc)



Separación de proteínas mediante electroforesis



Fernando Vivanco 2003



Fernando Vivanco 2003

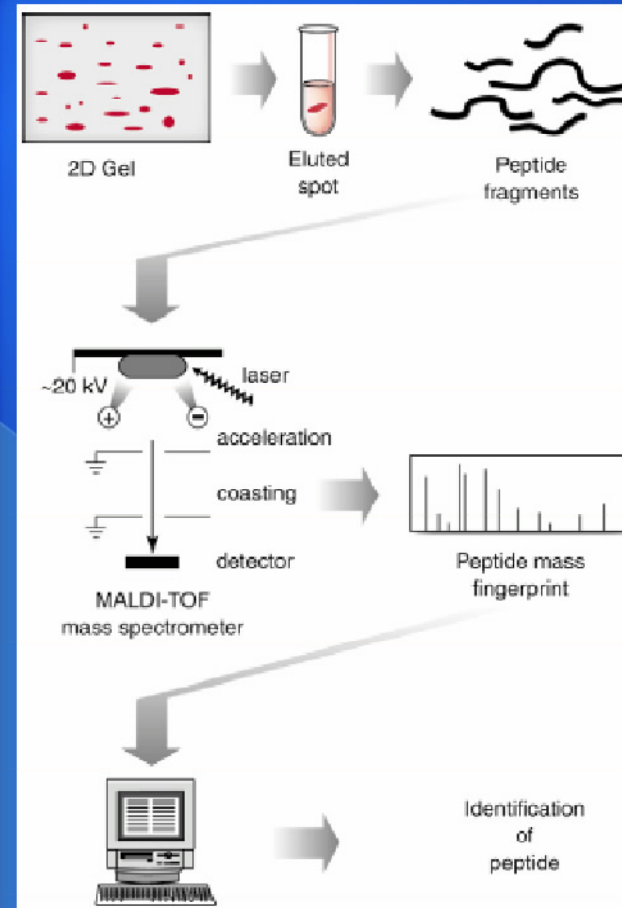
Deteccción de proteínas en geles de poliacrilamida

- ❖ Colorantes anionicos: azul de coomassie.
- ❖ Tinción negativa con metales cationicos: tinción de Zinc
- ❖ Tinción de Plata
- ❖ Fluorescencia
- ❖ Isótopos radiactivos

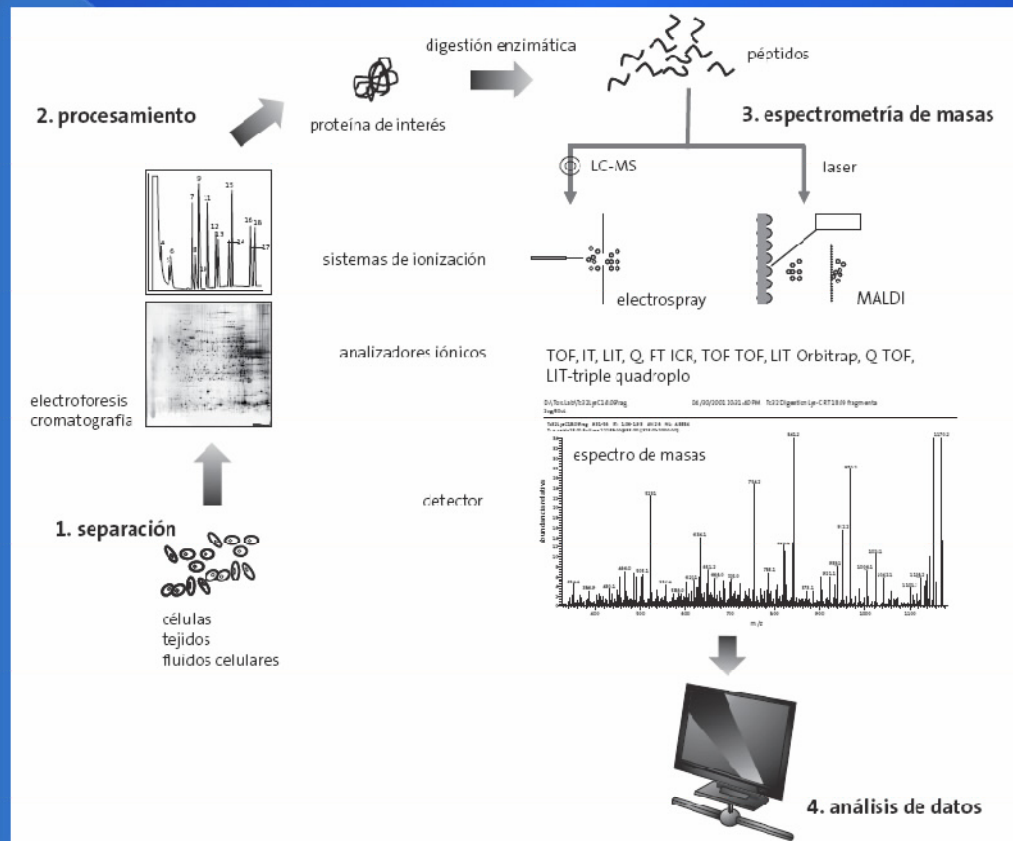
Espectrometría de masas

MALDI TOF

- ❖ Muestras disueltas en matrices sólidas
- ❖ Péptidos digeridos con tripsina
- ❖ Vaporización con un pulso de láser
- ❖ Aceleración con alto voltaje (HV) hacia el tubo de vuelo.
- ❖ El ordenador recoge los datos del detector
- ❖ Presentación del resultado o espectro de masas,



Metodología para el análisis proteómico de una muestra



JUSTIFICACIÓN

Helicobacter pylori importante patógeno gástrico que infecta a la mitad de la población mundial y que esta asociado a enfermedades tumorales como linfoma MALT y cáncer gástrico, es el primer microorganismo que cuenta con varias secuenciaciones genómicas, lo cual ha desencadenado un gran interés en los últimos años por varios grupos de investigación alrededor del mundo para conocer la funcionalidad de dichos proteomas.

Esta Información se encuentra dispersa, el planteamiento es hacer una revisión del estado actual del arte acerca del tema, de manera practica y detallada. Útil introducción hacia la proteómica, tecnología de vanguardia en este momento en el campo de la investigación, involucrando los fundamentos de una de las infecciones bacterianas mas comunes en los Colombianos.

Objetivos

Objetivo principal

Revisar el estado del arte actual sobre biomarcadores proteómicos de *Helicobacter pylori* relacionados con la evolución de esta infección hacia desordenes gastrointestinales.

Objetivos específicos

- ❖ Identificar las técnicas de proteómica aplicables en el campo de la microbiología clínica.
- ❖ Estudiar los avances en el estudio del proteoma de *Helicobacter pylori* a la actualidad.
- ❖ Correlacionar los proteomas de *Helicobacter pylori* con enfermedades asociadas a esta infección.

Metodología

- ❖ Investigación de tipo descriptivo
- ❖ Estudios con resultados obtenidos solo mediante técnicas proteómicas de interés como MALDI-TOF, ESI, SELDI, MS/MS, 2-DE
- ❖ Búsqueda de artículos publicados entre el año 1997 a 2009
- ❖ artículos en inglés y español

Criterios de inclusión

- ✓ Revisiones con hallazgos de proteínas de *Helicobacter pylori* mediante técnicas proteómicas
- ✓ Artículos con explicación de métodos y condiciones experimentales utilizadas en proteómica
- ✓ Estudios comparativos entre proteomas de *H. pylori* y desordenes gastrointestinales

Criterios de exclusión

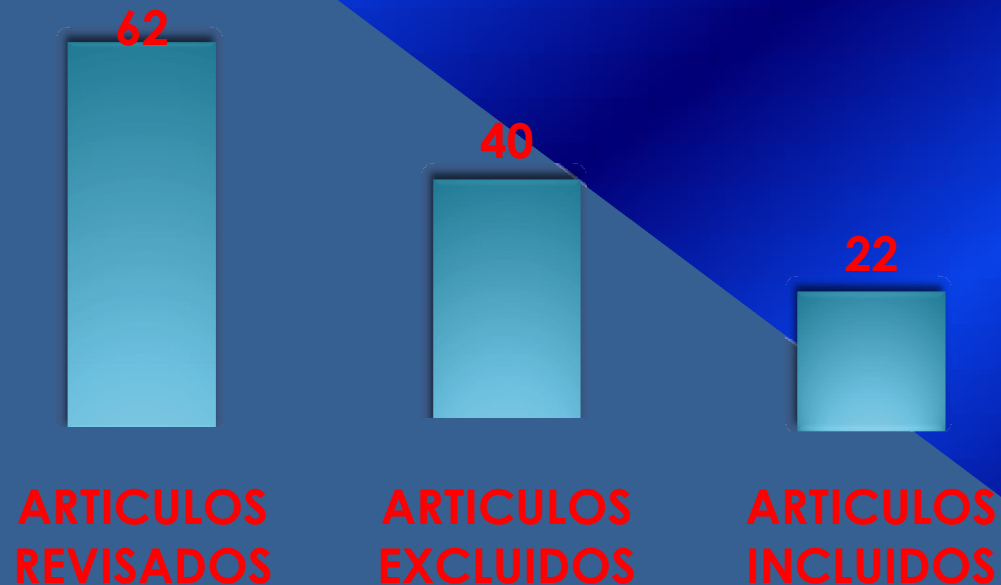
- ✓ Revisiones con identificación de biomarcadores por técnicas diferentes a las de interés.
- ✓ Artículos con descripción de proteínas implicadas en desordenes gastrointestinales sin nexo con *Helicobacter pylori*
- ✓ Artículos o comentarios de páginas de internet, resúmenes de libros de medicina o gastroenterología

Estrategia de búsqueda de artículos

- ❖ **PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL:** técnicas proteómicas, proteoma *H.pylori*, cáncer gástrico, biomarcadores *pylori*, cepa 26695, cepa J99, linfoma gástrico, úlceras, gastritis, electroforesis, genomas *H.pylori*.
- ❖ **PALABRAS CLAVES EN INGLÉS:** proteomics, vaccines pylori, diagnostic, biomarkers, disease, proteins, proteomics techniques
- ❖ **CONECTORES:** and - or
- ❖ **BASES DE DATOS:** Science Direct, Hinari, Pubmed, Scielo, Elsevier

Resultados y Discusión

En el presente estudio se realizó una revisión de la literatura sobre la proteómica de *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas, haciendo un énfasis principalmente en cáncer gástrico



Estudios Incluidos

11

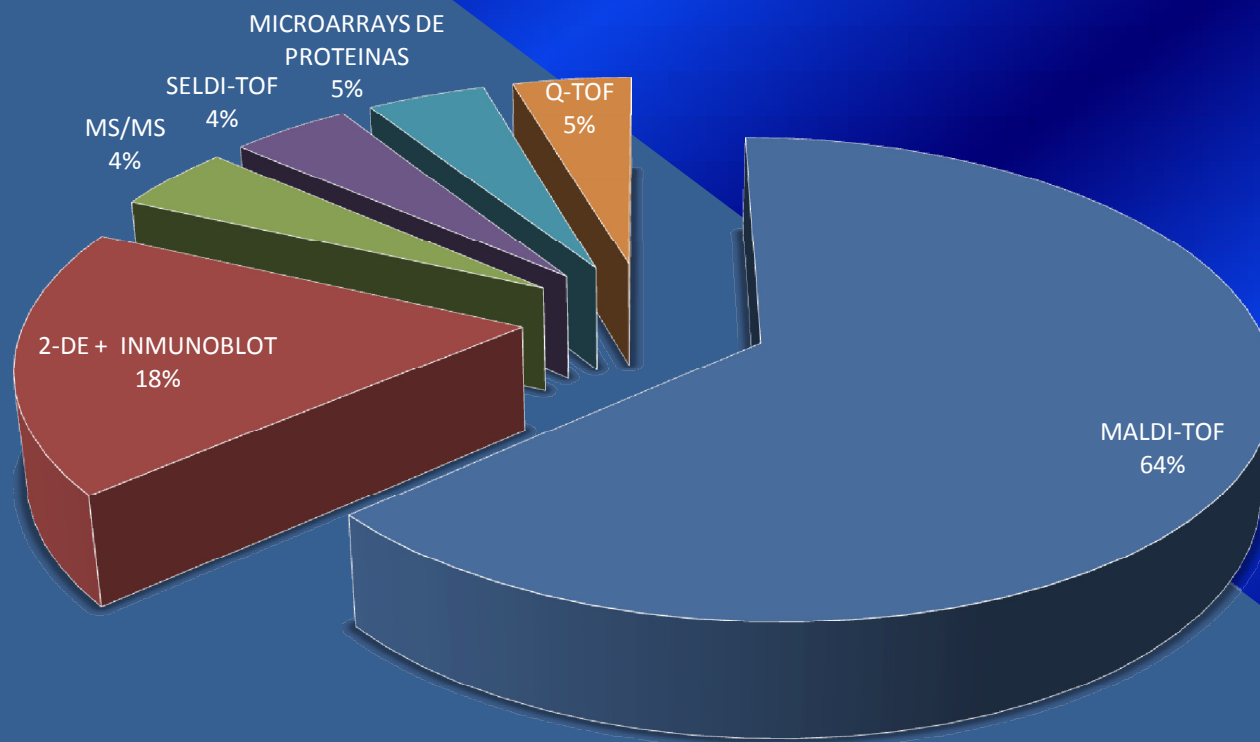
PROTEOMA H. PYLORI

11

BIOMARCADORES DE
PATOLOGIA

Técnicas Proteómicas

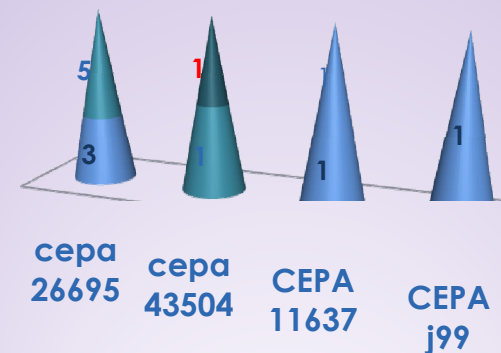
Para la identificación, la técnica proteómica más utilizada fue MALDI-TOF en 14 artículos



AUTOR	AÑO	CEPA	CARACTERÍSTICAS
Jeong wong	2008	26695	Precipitación fraccionada con sulfato de amonio con diferentes %
Todd Smith	2007	26695 43504	Análisis directo de proteínas extracelulares en 2 cepas
Jeong Wong	2006	26695	Análisis de proteínas mas representativas de <i>Helicobacter pylori</i>
Ming Hong	2005	43504 HD30 HC28	Proteínas expresadas por <i>Helicobacter pylori</i> en una atmosfera con 20% de O2.
Steffen Backert	2005	26695 P12 B128	Identificación de proteínas estructurales y proteínas solubles
Dirk Bumann	2002	26695 J99	Análisis de proteínas secretadas por <i>Helicobacter pylori</i>
Robert Lock	2002	NCTC 11637	Análisis de proteínas inmunoreactivas.
Myung Je	2002	26695	Identificación proteómica de la cepa 26695
Nicolás Sabarth	2002	26695	Identificación de proteínas de superficie
Robert Lock	2001	11637	Análisis proteómico de la cepa NCTC 11637
Jungblut	2000	26695	Análisis proteómico de la cepa 26695 y detección de antígenos de cáncer gástrico.

Caracterización proteómica de H. pylori

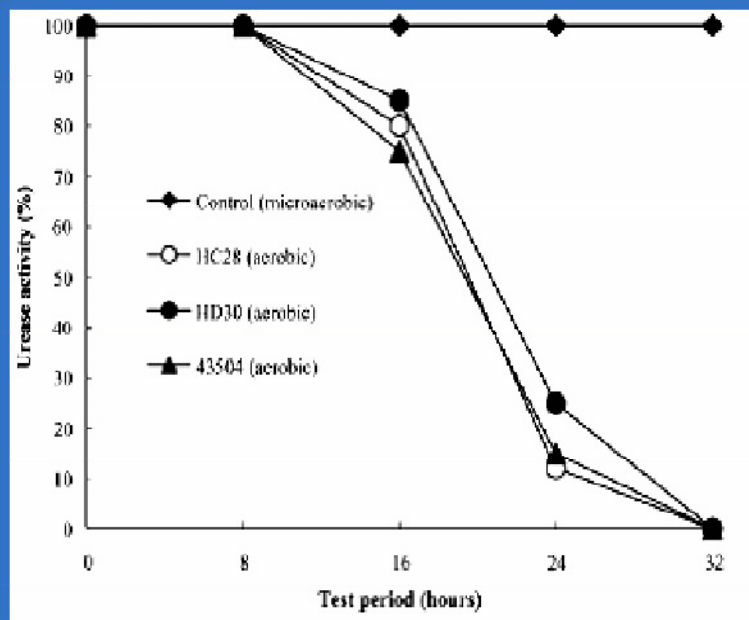
identificación de la cepa
 proteínas extracelulares
 PROTEINAS DE TENSION OXIDATIVA
 PROTEINAS INMUNOREACTIVAS



Cepa 43504

Proteínas expresadas bajo tensión oxidativa

UreE, Ahpc, Alkil-hidroperoxido reductasa, HP0660, Orotidina 5-fosfato decarboxilasa, riboflavin sintasa β , adenilato kinasa, CheY, NapA, GroEL, UreB



UreE y AhpC (proteínas accesorias de Ureasa), cuyo potencial antioxidante se ve disminuido ante tensiones de oxígeno al 20% e inhibiendo la enzima ureasa por completo a las 32 h.

Proteínas extracelulares cepa 43504

amidasa alifática
Keto acil reductoisomerasa
Proteína captadorade hierro copper
Cis-trans propil-isomerasa
Enolasa, fosfopiruvato hidratasa
Catalasa
Putativa zinc proteas
Γ-glutamil transpeptidasa
Glutamato deshidrognasa
Aminopeptidasa α/i
Tioredoxina
Citrato sintasa
Proteasa carboxi -terminal
Cag24
UDP-N-acetil-glicosaina aciltransferasa

Caracterización proteómica cepa 26695

NOMBRE CORTO	ANOTACION
KdsA	Acido 8 fosfato sintetasa
Pfs	Proteína pfs
MetB	Cistationina γ -sintasa
PpsA	Fosfoenol-piruvato sintasa
RecA	Recombinasa
GlyA	Serina hidroximetil-transferasa
ND	Proteína hipotetica conservada
HemA	Glutamil-tRNA reductasa
XseA	Exonucleasa VII sub-unidad larga
ND	Proteína hipotetica conservada
IlyC	Ketoacido reducto-Isomerasa
ND	Proteína hipotetica conservada
Hst	Seudoridilato sintasa I
NrdB	Difosfato ribonucleosido reductasa
HslU	Proteína de choque térmico
CagB	Proteína Isla patogenicidad
Cag25	Proteína Isla patogenicidad
HemE	Uroporfirinogeno decarboxilasa
RnhA	Ribonucleasa H
AnsB	Asparginasa II
ND	Proteína hipotetica conservada
GmhA	Fosfoheptosa isomerasa
SurE	Proteína de fase estacionaria
DapA	Dihydrodipicolinato sintetasa
ToxB	Proteína de tolerancia colicina

precipitación
fraccionada con
sulfato de amonio

25 proteínas sin
identificación previa
(won 2005)

Proteínas mas abundantes en la Cepa 26695

Proteína identificada	Nombre corto
proteína chaperona y de choque térmico	GroEL
Ureasa sub-unidad β	UreB
Alkil-Hidroperoxido reductasa	TsaA
proteína chaperona y de choque térmico	GroEL
Proteína de la isla de patogenicidad Cag	Cag26
proteína chaperona y de choque térmico	GroEL
Ureasa sub-unidad α	UreA
Proteína ribosomal	Rps4
Proteína de tensión general S4	Ctc
Proteína ribosomal L7/L12	Rpl7A12
Tiol-adhesina peroxidasa	TagD
proteína chaperona y de choque térmico	GroEL
Co-chaperona	GroES
Ureasa sub-unidad β	UreB
Proteína activadora neutrófilos	NapA
Ureasa sub-unidad β	UreB
ND	ND
ND	ND
Proteína secretora hipotética	ND
Aminopeptidasa a1	PepA
Factor de elongación de traducción EF-Tu	TufB

Proteínas extracelulares cepa 26695

Proteína de activación
de neutrófilo

Proteína secretora
conservada homóloga a
jhp1206

Homóloga HPAG1_0937

Homóloga HPAG1_1112

Proteínas extracelulares cepa

J99

Vac A

FlgE

FldA

UreB

FlgD

VacA

Anhidrasa carbonica

FliE

TrxC

DsbC

Tiorredoxina TrxA

Proteínas extracelulares comunes entre cepas 26695 y 43504

(Smith 2007)

Anhidrasa carbonica

Lipoproteina homologa
HPAG1_1458

Citotoxina vacuolizante

Serina proteasa

Lipoproteina Lpp20
asociada a membrana

GroES

Nucleasa dependiente de
ATP

Proteasa de procesamiento

Correlación proteómica entre infección *Helicobacter pylori* y enfermedades asociadas

AUTOR	AÑO	CEPA	CARACTERÍSTICAS	TECNICA
Ghalia Khoder	2009	aislamientos clínicos	biomarcadores en ulcera duodenal y cáncer gástrico	SELDI-TOF-MS
Yu Fen Lin	2007	HD12	Detección de antígenos de ulcera duodenal.	Q-TOF-MS
Diego Pereira	2006	Aislamientos clínicos	Análisis proteómico comparativo entre ulcera duodenal y cáncer gástrico	MALDI-TOF-MS
Roberta Mini	2006	HP 328 G39 10K	Detección de antígenos en tres cepas diferentes	MALDI-TOF-MS
Peter Ellmark	2006	SinFabs	Identificación de proteínas asociadas a patologías gástricas	Arrays de proteínas
Yu Fen Lin	2006	HC5	Detección antígenos relacionados con cáncer gástrico Y UD	IMMUNO-BLOTING
Qin Yu He	2004	Aislamientos clínicos	Detección de proteínas alteradas en cáncer gástrico	IMMUNO-BLOTING
Govorun	2003	Aislamientos clínicos	Caracterización proteomica de enfermedades asociadas	MALDI-TOF-MS
Alexander Kra	2003	26695	Identificación de antígenos relacionados con cáncer gástrico	MALDI-TOF
Gaby Haas	2002	26695	Reconocimiento de antígenos relacionados con cáncer gástrico	
Jungblut	2000	26695	Análisis proteómico de la cepa 26695 y detección de antígenos de cáncer gástrico.	MALDI-TOF

4,5
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0

ulcera
duodenal



cancer
gastrico y
ulcera
duodenal



patologias
gastricas en
general



cancer
gastrico y
ulcera
duodenal



■ ulcera duodenal

cancer gastrico y
ulcera duodenal

patologias gastricas
en general

cancer gastrico y
ulcera duodenal

Helicobacter pylori y cáncer gástrico

14 Antígenos de cáncer gástrico reconocidos por la cepa 26695

Los antígenos para úlcera fueron:
GlnA, FrdA9, Cag 26 y Flavodoxina.

Identificada		gastritis Crónica Hp - Mpi40	Cancer gástrico Hp+ Mpi44	ventriculi Pac. Hp + Mpi54
Proteína de choque térmico y chaperona (GroEL)	HP0010	X	X	X
Ureasa sub-unidad β (UreB)	HP0072	-	X	-
Ureasa sub-unidad β (UreB)	HP0072	-	X	-
Ureasa sub-unidad β (UreB)	HP0072	-	X	-
Proteína ligadora-GTP homologa de FusA (YihK)	HP0480	-	X	-
Proteína de choque térmico y chaperona GroEL	HP0010	X	X	X
Glutamina sintasa (GlnA)	HP0512	-	-	X
Aconitasa B (AconB)	HP0779	-	X	-
Flavoproteína sub-unidad Fumarato Reductasa (FrdA)	HP0192	-	-	X
Proteína isla de patogenicidad Cag (Cag26)	HP0547	-	-	X
Isocitrato deshidrogenasa (Icd)	HP0027	-	X	-
Proteína de la señal de reconocimiento de partículas (Ffh)	HP1152	-	X	-
Catalasa	HP0875	X	X	-
Procesamiento de proteasa (YmxG)	HP00657	-	X	-
Citrato sintasa (CitA)	HP0026	-	X	-
Proteína de formación/expresión hidrogenasa (HypB)	HP0900	-	X	X
Nitroreductasa oxígeno insensible NAD(P)H	HP0954	-	X	-
Factor 2 plegador de células	HP0175	-	X	-
Proteína de tolerancia a la penicilina (LytB)	HP0400	-	X	-
Tiol-Adhesina peroxidasa (TagD)	HP0390	-	X	-
Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa sub-unidad γ	HP1108	-	X	-
Proteína β -ketoacil- acil transportadora reductasa (FabG)	HP0581	-	X	-
Transportador ABC sideroforo (III), proteína ligadora de hierro periplasmático (CeuE)	HP1562	-	X	-
Ureasa sub-unidad α (UreA)	HP0073	X	X	-

Proteínas con mayor frecuencia en cáncer gástrico

Proteína identificada	Nombre corto	gastritis % frecuencia	Úlcera % frecuencia	Cáncer % frecuencia
Proteína A captadora de Hidantoína	HyuA	13	5	45
Proteína J fosfato piridoxal	ND	10	14	42
Anhidrasa carbonica	ND	1	0	17
Subunidad flavoproteína fumarato reductasa	FrdA	13	23	45
Aconitasa hidratasa 2	AcnB	8	6	23
Proteína captadora de hierro periplasmico	CeuE	4	4	21
RNA polimerasa dirigida a DNA dominio α	RpoA	0	0	20
GroEL	GroEL	4	6	19
proteína putativa ligadora neuramini-lactosa homologa Hemaglutinina	HpaA	18	15	33
Proteína de membrana externa		12	29	50
Cinamil-alcohol deshidrogenasa ELI3-2	Cad	5	3	40
Proteína secretora hipotética conservada	ND	12	14	42

Proteínas de *H. pylori* asociadas a cáncer gástrico identificadas mediante arrays

C1q	Component 1q of the complement system
FB	Factor B of the complement system
C5	Component 5 of the complement system
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MCP-3	Monocyte chemotactic protein 3
MCP-4	Monocyte chemotactic protein 4
Eotaxin	CC-chemokine
RANTES	Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
IL-8	Interleukin 8
IL-4	Interleukin 4
IL-13	Interleukin 13
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
INF- γ	Interferon γ
IL-2	Interleukin 2
IL-12	Interleukin 12
TNF- β	Tumor necrosis factor β
TGF- β	Transforming growth factor β
IL-10	Interleukin 10
IL-11	Interleukin 11
GM-CSF	Granulocyte monocyte colony stimulating factor
TNF- α	Tumor necrosis factor α
IL-1ra	Interleukin 1 ra
IL-1 α	Interleukin 1 α
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-9	Interleukin 9
IL-16	Interleukin 16
IL-18	Interleukin 18
Angiomotin	
TM peptide	Peptide from a transmembrane protein

Aumento de diferentes proteínas citoquinas TH1 como IL-5, IL-6, y la IL-13 y por otro lado citoquinas TH2 como IFN- γ e IL-2.

Adicionalmente la IL-10 y TGF- β que están asociadas con la regulación de células T, aumentaron su

Proteínas alteradas en cáncer gástrico asociadas a *H. pylori*

PROTEÍNAS ALTERADAS EN CÁNCER GÁSTRICO				
PROTEÍNA IDENTIFICADA	(Mr/p)	(Mr/p) EXPERIMENTAL	ACCESO (NCBI)	FUNCIÓN REPORTADA
Citokeratina 8 (CK8)	54 kD/5.5	55 kD/5.5	2506774	filamentos intermedios del citoesqueleto
Citokeratina 20 (CK20)	48 kD/5.5	50 kD/5.5	547750	filamentos intermedios del citoesqueleto
Tropomiosina isoforma (TPM)	29kD/4.8	30KD/4.6	9508585	plegadora de micro filamentos del citoesqueleto
Enolasa 1	47kD/7.0	48KD/7.0	693933	glicolisis
Trifosfato isomerasa (TPI)	27KD/6.4	26KD/6.5	136060	glicolisis
Fosfoglicerato mutasa (PGM)	29KD/6.7	30KD/6.6	130348	glicolisis
Piruvato quinasa (PK)	58KD/8.0	56KD/8.0	478822	glicolisis
Chaperonina contenedora TCP1 (CCT)	58KD/6.2	60KD/6.2	627402	chaperona de tensión térmica
Proteína de choque térmico 60 (HSP 60)	61 KD/5.7	60KD/5.5	129379	chaperona de tensión térmica
Proteína de choque térmico 71 (HSP 70)	71 KD/5.4	70KD/5.5	123648	chaperona de tensión térmica
Proteína Disulfuro isomerasa (PDI)	57KD/6.2	55KD/6.3	2135267	chaperona, isomerasa y oxidoreductasa
Factor de elongación EF-Tu (EF-Tu)	49KD/7.7	50KD/7.4	7443384	factor de traducción, crecimiento celular y chaperona
Alpha-1 anti tripsina (α 1-AT)	47KD/5.4	51KD/5.2	15990507	proteína de fase aguda
Apolipoproteína A-1 (ApoA1)	31 KD/5.6	30KD/5.7	4557321	proteína de fase aguda
GMP reductasa 2 (GMPR)	38KD/6.8	22KD/7.1	25008511	proteína promotora de diferenciación monocítica
Creatina quinasa B (CK-B)	43KD/5.3	42KD/5.2	180570	proliferación, transformación y reguladora de energía
Proteína plegadora de selenio 1 (SeBP)	52KD/5.9	51KD/6.0	16306550	detoxificación, inhibición de células malignas
Prohibitina	30KD/5.6	30KD/5.4	4505773	supresora de tumores, inhibidora de proliferación celular
Anhidrasa carbónica I (CA-I)	29KD/6.6	31KD/7.0	115449	hidratación del CO ₂ por metabolismo intermedio
Anhidrasa carbónica II (CA-II)	29KD/6.9	31KD/7.1	115456	hidratación del CO ₂ por metabolismo intermedio
Proteína mucosa del antro 185 kD (AMP-18)	22KD/5.9	20KD/6.0	26000208	Actividad mito génica específica en células Epiteliales humanas de estomago

Conclusiones

- UreE y AhpC, proteínas accesorias de la enzima ureasa pueden ser listadas como posibles dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos que ayuden en la erradicación de *Helicobacter pylori*.
- *FusA*, *KatA* y *UreA* son antígenos fuertemente relacionados a la patología de ulcera duodenal, que en combinación con arrays de proteínas proveen un rápido método de diagnóstico para la ulcera duodenal.

No se identifico un protocolo estandarizado para los usos de técnicas proteómicas en la practica clínica actual, para el manejo de ninguna enfermedad gástrica asociada a la infección por *Helicobacter pylori*

La posibilidad de explorar el proteoma de los sistemas biológicos en base a tecnologías cada vez mas potentes abre las expectativas sin precedentes en el estudio de la patogénesis molecular de enfermedades así como la identificación de paneles de biomarcadores específicos que permitan diagnosticar, clasificar, pronosticar y predecir enfermedades.

- Las técnicas de MALDI, ESI, 2-DE, ARRAYS DE PROTEINAS son aplicables al campo de la microbiología clínica, aunque deben estandarizarse para que puedan implementarse en el trabajo de rutina
- En la revisión de la literatura se encontró que a la fecha se han identificado cuatro antígenos en la cepa 26695 asociados a carcinoma gástrico mediante técnica MALDI-MS. La proteína A de captación de Hydantoina (HyuA), ATP sintasa F1 sub-unidad alfa (AtpA), chaperonina GroES y la proteína de choque térmico y chaperona GroEL.

- *Helicobacter pylori* expresa cinco proteínas biomarcadores de carcinoma gástrico difuso que son: la proteína hipotética HP0958, el factor de elongación de transcripción GreA, la sub-unidad quinona reactiva Ni/Fe hidrogenasa, la flavina-NADPH oxido-reductasa y la proteína RecA las cuales fueron identificadas mediante técnica MALDI-MS.
- Los sueros de pacientes con gastritis crónica no asociada a *H. pylori* reaccionan solo con algunas de las proteínas mas abundantes en *Helicobacter pylori* como: GroEL, UreA y Catalasa

Recomendaciones

1. Realizar estudios experimentales con población de nuestro país, ya que es de gran relevancia que somos un país con tasas muy altas por infección con *Helicobacter pylori* y también con altas incidencias de cáncer gástrico.
1. Estandarizar protocolos para la búsqueda de los biomarcadores identificados a nivel de laboratorio clínico.



**GRACIAS POR LA
ATENCIÓN PRESTADA**