

Universidad de Zaragoza

Facultad de Ciencias

Departamento de Bioquímica y Biología

Molecular y Celular

MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR

Inhibición de la actividad biológica del regulador transcripcional HsrA de *Helicobacter pylori* mediante el empleo de ligandos de bajo peso molecular y estudio de la capacidad antimicrobiana de estos compuestos

Javier Casado Apastegui

Trabajo de Fin de Máster dirigido por:

Dr. Andrés González Rodríguez

Dr. Eduardo Chueca Lapuente

Curso 2019-2020



ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	1
1.1.1. Taxonomía y microbiología	1
1.1.2. Condiciones de cultivo	2
1.1.3. Factores de virulencia.....	4
1.1.3.1 Complejo ureasa	4
1.1.3.2. Citotoxina CagA.....	5
1.1.3.3. Citotoxina CagE	7
1.1.3.4. Endonucleasa IceA	7
1.1.3.5. Citotoxina vacuolizante VacA.....	8
1.1.3.6. Adhesina BabA.....	8
1.1.3.7. Toxina DupA	9
1.1.3.8. Proteína inflamatoria de membrana externa OipA	9
1.1.3.9. Proteína activadora de neutrófilos NapA.....	10
1.1.3.10. Vesículas de membrana externa	10
1.1.4. Patogenia	11
1.2. Tratamientos y mecanismos de resistencia a antibióticos	13
1.2.1. Inhibidor de la bomba de protones	14
1.2.2. Sales de bismuto.....	14
1.2.3. Claritromicina.....	15
1.2.4. Metronidazol	15
1.2.7. Levofloxacin.....	16
1.2.5. Amoxicilina.....	16
1.2.6. Tetraciclina.....	16
1.3. Crisis de antibióticos: necesidad de nuevas dianas para el desarrollo de nuevas clases de antimicrobianos	17
1.3.1. Reguladores transcripcionales como dianas terapéuticas.....	21
1.3.1.1 Regulador de respuesta ArsR	22
1.3.1.2. Regulador de respuesta “huérfano” HsrA	24
1.4. Antecedentes	25
2. Objetivos.....	30
3. Materiales y métodos.....	30

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	30
3.2. Compuestos químicos	31
3.3. Expresión recombinante y purificación del regulador de respuesta HsrA.....	31
3.4. Ensayo de retardo en gel (EMSA)	32
3.4.1. Síntesis y purificación de fragmentos de DNA.....	32
3.4.2. Estimación de la actividad <i>in vitro</i> de HsrA recombinante mediante EMSA.....	32
3.4.3. Ensayos de inhibición de la actividad <i>in vitro</i> de HsrA	33
3.5. Predicción del sitio de unión de los inhibidores de HsrA a la estructura proteica mediante acoplamiento (<i>docking</i>) molecular	34
3.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI)	34
3.6.1 Preparación del inóculo estandarizado	34
3.6.2. Inhibición del crecimiento.....	35
3.6.3. Revelado y lectura de resultados	35
3.7. Concentración mínima bactericida (CMB).....	35
4. Resultados.....	36
4.1. Capacidad inhibitoria de los ligandos de HsrA sobre la actividad biológica <i>in vitro</i> del regulador transcripcional.....	36
4.2. Predicción del sitio de interacción entre HsrA y sus inhibidores	38
4.3. Los inhibidores de HsrA muestran una actividad bactericida variada frente a <i>H. pylori</i>	40
5. Discusión	41
6. Conclusiones.....	44
7. Perspectivas de futuro.....	44
8. Bibliografía.....	45
9. Anexos	57
9.1. Anexo I: Cebadores	57
9.2. Anexo II: Figuras	58

Lista de abreviaturas

- AINE: Antiinflamatorio no esteroideo
- BSA: Albúmina sérica bovina (del inglés, *bovin serum albumin*)
- C-: Control negativo
- C+: Control positivo
- Clr-R: Claritromicina-resistente
- DBD: Dominio de unión al DNA (del inglés, *DNA binding domain*)
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- dNTP: Desoxirribonucleótido trifosfato (del inglés, *deoxynucleotid triphosphate*)
- DTT: 1,4-ditiotreitol
- EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, *epidermic growth factor receptor*)
- EMSA: Ensayo de retardo en gel (del inglés, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*)
- FAK: Quinasa de adhesión focal (del inglés, *focal adhesion kinase*)
- FDA: Agencia de Medicamentos y Alimentación (del inglés, *Food and Drug Administration*)
- HTH: Hélice-giro-hélice (del inglés, *helix-turn-helix*)
- IBP: Inhibidor de la bomba de protones
- IFN: Interferón
- IL-8: interleuquina 8
- IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
- ITC: Calorimetría de titulación isotérmica (del inglés, *isothermal titration calorimetry*)
- m/v: Relación masa/volumen
- MALT: Tejido linfóide asociado a mucosa (del inglés, *mucose associated lymphoid tissue*)
- MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*)
- Mtz-R: Metronidazol-resistente

- NF-κB: Factor nuclear kappa-B (del inglés, *nuclear factor kappa-B*)
- NFAT: Factor nuclear de células T activadas (del inglés, *nuclear factor of activated T-cells*)
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PBP: Proteína fijadora de penicilinas (del inglés, *penicillin binding protein*)
- PBS: Tampón fosfato salino (del inglés, *phosphate buffered saline*)
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, *polymerase chain reaction*)
- PKB: Proteína quinasa B
- RMN: Resonancia magnética nuclear
- ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés, *reactive oxygen species*)
- rpm: Revoluciones por minuto
- RR: Regulador de respuesta
- SFB: Suero fetal bovino
- SK: Sensor quinasa
- Th: Linfocito T helper
- Th1: Linfocito T helper 1
- Tm: Temperatura media de desnaturalización
- Tris: Tris-hidroximetil-aminometano
- v/v: Relación volumen/volumen

RESUMEN

Helicobacter pylori es el patógeno bacteriano de mayor prevalencia mundial, infectando a más de la mitad de la población y estando relacionado con más del 90% de casos de cáncer gástrico. El incremento y acumulación de resistencias frente a la mayoría de los antibióticos convencionales ha determinado una disminución apreciable de la eficacia de los regímenes de erradicación empleados para este patógeno. En la actualidad resulta imperativa la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas para la investigación y desarrollo de nuevas familias de antimicrobianos efectivas, que logren evadir los mecanismos de resistencia actuales. Nuestro grupo de investigación ha sido el primero en validar el regulador de respuesta esencial HsrA de *H. pylori* como diana molecular para el descubrimiento de nuevos fármacos con actividad bactericida frente a este microorganismo. Mediante cribados masivos de quimiotecas han sido identificados varios ligandos de HsrA que se unen al regulador, formando un complejo con mayor estabilidad térmica que la proteína. En el presente trabajo se evaluó la capacidad inhibitoria de 20 ligandos de bajo peso molecular y naturaleza química diversa sobre la actividad *in vitro* del HsrA mediante estudios de retardo en gel. Se estudió la interacción molecular proteína-inhibidores mediante acoplamiento (*docking*) molecular y se analizó la actividad antimicrobiana de los inhibidores de HsrA frente a diferentes cepas de *H. pylori* mediante la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las concentraciones mínimas bactericidas (CMB). Seis de los ligandos estudiados inhibieron efectivamente la actividad biológica *in vitro* de la proteína HsrA a concentraciones iguales o inferiores a 2 mM. Todos los inhibidores de HsrA se unieron preferiblemente al dominio efector C-terminal de la proteína, interaccionando con residuos directamente implicados en la estructura del motivo HTH de unión al DNA o con residuos aparentemente imprescindibles para la estabilidad del dominio. Al menos 2 de estos inhibidores mostraron una alta capacidad antimicrobiana frente a *H. pylori*, con valores de CMI y CMB ≤ 8 mg/L. Los resultados obtenidos avalan el uso del regulador transcripcional HsrA como diana terapéutica e incrementan la batería de potenciales nuevas herramientas para el tratamiento de infecciones refractarias causadas por cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos convencionales.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is the most worldwide prevalent bacterial pathogen, infecting more than half of the world's population and it has been associated with more than 90% of gastric cancer cases. The increase and accumulation in the resistance against most of the conventional antibiotics has determined a greatly and noticeable reduction in the efficacy of eradication therapies used for the treatment of infections caused by this pathogen. Currently, it is imperative to search for new therapeutic targets for the research and development of novel and effective antimicrobial families which can surpass current resistance mechanisms. Our research group has been the first one to validate the essential response regulator HsrA from *H. pylori* as a molecular target for the discovery of new drugs with bactericidal activity against this microorganism. Through high-throughput screening of some chemical libraries several HsrA ligands that bind to the response regulator were found, forming a complex with a higher thermal stability compared to the free protein. In the present work we studied the inhibitory capacity of 20 low-weight and structurally diverse ligands over the *in vitro* activity of HsrA by electrophoretic mobility shift assays. The molecular interaction between the protein and its inhibitors was studied by molecular docking and antimicrobial activity of HsrA inhibitors was analysed against different *H. pylori* strains by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). Six of the studied ligands effectively inhibited the *in vitro* biological activity of HsrA at concentration equal to or lower than 2 mM. All HsrA inhibitors bound preferably to the C-terminal effector domain in the protein, interacting with residues directly involved in the structure of the HTH DNA-binding motif or with residues apparently essential for the domain stability. At least two of these inhibitors showed a high antimicrobial activity against *H. pylori*, with MIC and MBC values ≤ 8 mg/L. The results obtained in this study support the use of response regulator HsrA as a therapeutic target and increase the battery of potential novel tools for the treatment of refractory infection caused by *H. pylori* strains resistant to conventional antibiotics.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Helicobacter pylori*

1.1.1. Taxonomía y microbiología

Helicobacter pylori es una bacteria perteneciente al género *Helicobacter*, clase ϵ -Proteobacteria, orden *Campilobacterales* y familia *Helicobacteraceae* [1]. El género *Helicobacter* está compuesto por al menos 20 especies distintas de bacterias descritas hasta la fecha, las cuales muestran una gran especificidad en cuanto al tejido que colonizan, clasificándose en dos grupos según esta característica distintiva: especies de *Helicobacter* enterohepáticas (11 especies validadas) y especies de *Helicobacter* gástricas (7 especies validadas), la mayoría de estas especies son incapaces de crecer en otros órganos. En el caso concreto de *H. pylori*, pertenece al segundo grupo [2,3].

H. pylori es una bacteria Gram-negativa, microaerófila, de forma espiralada y cuyo tamaño oscila entre los 0,5 y los 5 μm , con un número de giros que van desde uno hasta tres [4]. A diferencia de la mayoría de bacterias Gram-negativas, el peptidoglicano de este microorganismo muestra una estructura más simple, como resultado de una composición en muroproteínas única que se cree puede estar relacionada con el cambio en la estructura de pared para la formación de formas de resistencia [5]. Además, esta bacteria posee entre 4 y 8 flagelos polares que le facilitan la motilidad a través de la mucosa gástrica por medio de tres tipos distintos de movimientos: natación, dispersión y de tipo *swarming* [6] (Figura 1).

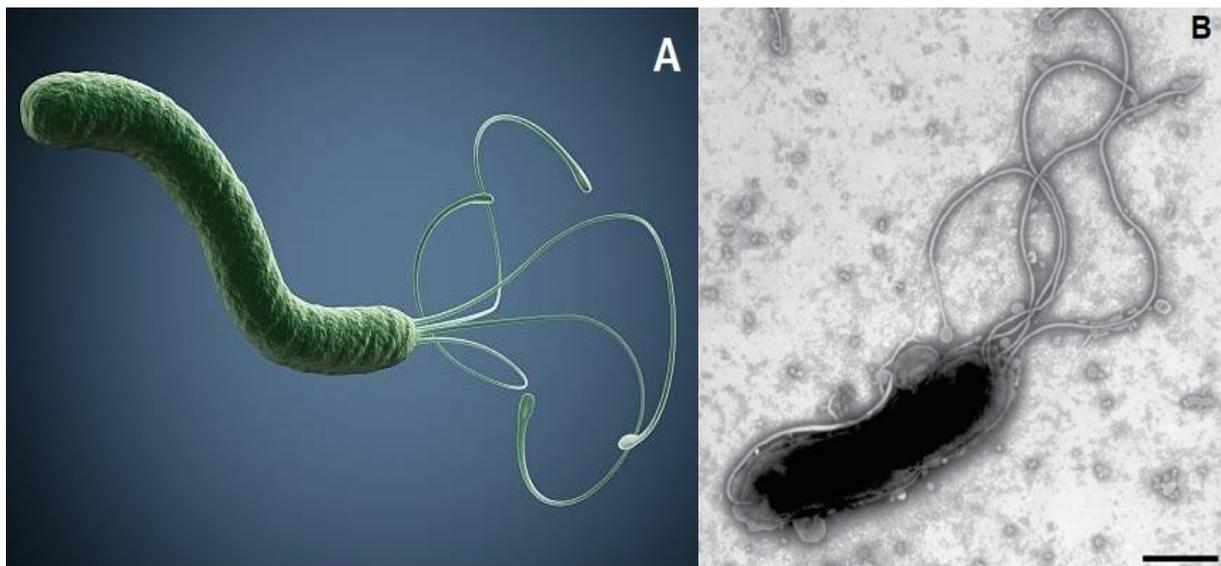


Figura 1. Imagen digitalizada (A) y microfotografía electrónica de transmisión (B) de *Helicobacter pylori*. Barra: 0,5 μm . Tomado de Getty Images (www.gettyimages.com) y Bie M., *et al.*, *Ann Transl Med* 2019;7(14):320 [180].

Como se ha mencionado anteriormente *H. pylori* es capaz de adquirir una forma de resistencia con morfología cocoide (Figura 2) en respuesta a diversos estreses, tales como condiciones de aerobiosis, temperatura o pH extremos, exposición a antibióticos o el cultivo *in vitro* durante períodos de tiempo prolongados [7].

Si bien estas formas cocoides no son cultivables en el laboratorio, se cree que son capaces de permanecer en un estado de latencia en el estómago, conservando los factores de virulencia e incluso sobrevivir en el ambiente hospedero hasta que las condiciones sean más propicias [8,9]. Este cambio morfológico es el resultado de una alteración de numerosas actividades metabólicas, debido a una reducción en la biosíntesis de la mayoría de proteínas [5,7]. No obstante, en muestras provenientes de pacientes se ha observado que *H. pylori* es capaz de formar biofilms en los que coexisten ambas formas bacterianas, la cocoide y la espiralada, lo cual sugiere que las formas cocoides constituyen no solo una forma de resistencia al estrés, sino también un mecanismo de evasión del sistema inmune [10,11].

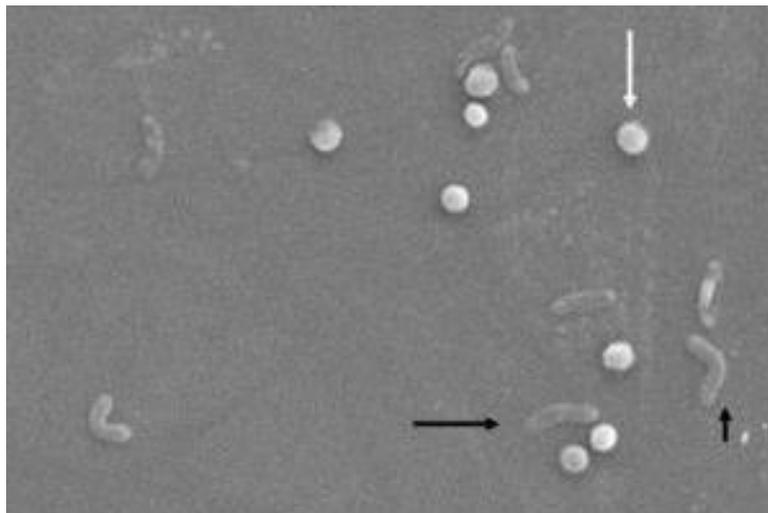


Figura 2. Diferentes morfologías en un cultivo de *H. pylori*. Las flechas negras señalan las formas espiraladas y la blanca la forma cocoide. Tomado de Sarem M. and Corti R. Gastroenterología y Hepatología (English Edition) 2016;39(1):28–35 [7].

1.1.2. Condiciones de cultivo

H. pylori es un microorganismo de crecimiento fastidioso, requiriendo medios de cultivo complejos y tiempos de incubación prolongados para el correcto desarrollo *in vitro*. Para el crecimiento de este microorganismo es necesario generar unas condiciones de microaerobiosis con concentraciones de oxígeno entre el 3% y el 5% y mantenerlo a 37 °C con una humedad del 95%. Para obtener estas condiciones de cultivo, usualmente se emplean jarras de anaerobiosis o cubetas con cierre hermético donde se introducen sobres generadores de atmósfera disponibles

comercialmente (Figura 3). El medio de cultivo, que puede ser un medio Columbia, Brucella o infusión cerebro-corazón, debe ser enriquecido con sangre o suero fetal para aportar los nutrientes necesarios de los que carecen los medios de cultivo comunes [12,13]. Cuando se trata de aislar esta bacteria a partir de una muestra o biopsia en un cultivo primario, los tiempos de incubación suelen ser como mínimo de 3 o 4 días para que aparezcan colonias; sin embargo, en ocasiones es necesario prolongarlo entre 7 y 10 días según la carga bacteriana de la biopsia. En el caso de los subcultivos el crecimiento óptimo se obtiene entre las 48 y 72h. Las cepas pueden ser conservadas a -80 °C indefinidamente en medio líquido con un 10-15% de glicerol [14].

Los aislamientos clínicos de *H. pylori* pueden proceder de distintas partes. Aunque el estómago es el principal sitio de colonización el microorganismo puede localizarse además en el esófago, el recto, la vejiga o incluso la placa dental, la saliva o el ácido gástrico. Esto puede ser útil en pacientes que presenten sangrado en las paredes estomacales, a los que no es posible realizar una gastroscopia. Sin embargo, no es seguro que el microorganismo se encuentre en localizaciones extragástricas, lo que hace incierto su aislamiento a partir de ellas [15].



Figura 3. Sistema de cultivo para *H. pylori* comercializado por la empresa Thermo Fisher Scientific Inc. (EE.UU.), compuesto por una caja con tapa de cierre hermético y sobres de atmósfera microaeróbica. Imagen tomada del Catálogo de Productos de Thermo Fisher Scientific.

Hay que tener en cuenta que las muestras procedentes de biopsias deben ser conservadas en medios especiales, protegidas del ambiente y solo durante periodos de tiempo relativamente cortos hasta ser procesadas, pues este patógeno es muy sensible a las condiciones ambientales, especialmente el oxígeno [16].

Si se desea realizar un subcultivo a partir de la muestra conservada, este tardará entre 48 y 72 horas en crecer hasta niveles adecuados [17]. Si el cultivo secundario se prolonga más allá de las 72h, la viabilidad empieza a decaer drásticamente. Debido al agotamiento de nutrientes la población cambia su metabolismo y morfología, transformándose en las formas cocoides no cultivables como resultado del estrés nutricional [18].

1.1.3. Factores de virulencia

1.1.3.1 Complejo ureasa

El principal factor de virulencia de *H. pylori* lo constituye el complejo enzimático ureasa, el cual permite al microorganismo multiplicarse y colonizar la mucosa estomacal, sobreviviendo a las condiciones de pH extremo existentes en el estómago a la vez que aprovecha la urea presente de forma fisiológica como fuente de nitrógeno [19].

Cuando el pH del medio baja, los niveles de expresión de los canales UreI aumentan, lo que lleva a una mayor entrada de urea desde el estómago hacia el interior de la bacteria [20]. En el citoplasma del microorganismo la enzima ureasa cataliza la transformación de la urea en dos moléculas de amoníaco y una de dióxido de carbono, los cuales salen hacia el espacio periplásmico. La expresión, tanto de la enzima ureasa como de los canales UreI dependientes de pH, está controlada principalmente por el regulador transcripcional ArsR en respuesta a la concentración de H⁺ citoplasmático [21,22], sin bien la cantidad de la enzima está regulada no solo a nivel transcripcional sino también a nivel postranscripcional y postraslacional [23].

Existen dos modelos relativos al destino del amoníaco, uno de ellos sostiene que el amoníaco pasa al espacio periplásmico y adquiere allí un protón del medio, tamponando el microambiente adyacente a la pared bacteriana [24,25], mientras que el otro sugiere que el amoníaco permanece en el citoplasma y tampona únicamente el interior celular [26] (Figura 4).

En la cara orientada hacia el periplasma de la membrana citoplasmática interna se encuentra asociada la enzima anhidrasa carbónica, la cual emplea el CO₂ y una molécula de agua para producir bicarbonato con una alta capacidad tamponante. Dado que se producen dos moléculas de amoníaco y un único protón por cada molécula de urea, todavía queda una molécula de amoníaco disponible para neutralizar un protón del microambiente adyacente a la pared bacteriana [27]. A su vez, el amonio cumple otra función, al poder ser asimilado por la bacteria como fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos [1].

Alternativamente se ha observado que en la superficie de *H. pylori* la ureasa también se expresa en cantidades elevadas asociada a la membrana. No está claro el papel que cumple la enzima en la membrana, pues se creía que en las condiciones de pH estomacal la enzima era totalmente inactiva,

empero, algunos experimentos sugieren que en condiciones fisiológicas esta enzima se encuentra protegida en forma de *cluster* y permanece activa, permitiendo la supervivencia inicial de la bacteria al evitar el daño en la membrana [28,29].

El amonio y el bicarbonato están implicados además en la patogenia de la enfermedad, pues el amonio tiene efectos citotóxicos en las células epiteliales del estómago [30,31], mientras que, por su parte, el bicarbonato neutraliza el peroxinitrito que se cree tiene capacidad bactericida [32].

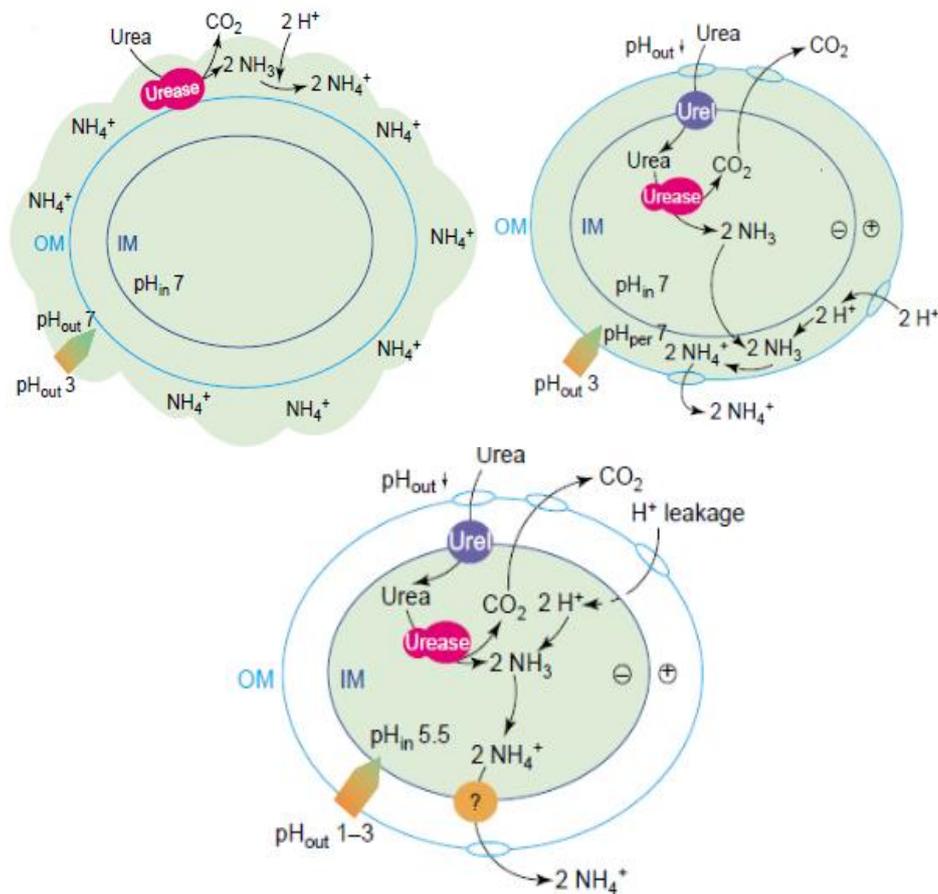


Figura 4. Modelos sobre funcionamiento del complejo Ureasa en la protección de *H. pylori* frente al estrés por el pH ácido estomacal. Tomado de Stingl *et al.* Trends in Microbiology. Elsevier Current Trends; 2002;70–4 [26].

1.1.3.2. Citotoxina CagA

Cag es una caja o “isla” de patogenicidad compuesta por 32 genes que codifican para un sistema de secreción tipo IV (T4SS). Este sistema es usado por la bacteria para la inyección directa de moléculas efectoras en el interior de las células epiteliales del estómago [33]. Uno de los componentes más importantes de este sistema es *CagA*, codificada por el gen *cagA* (del inglés, *cytotoxin-associated gene A*), una proteína oncogénica transportada por el sistema de secreción IV [34] con cuatro segmentos que poseen dominios de fosforilación *EPIYA* [35] (Figura 5).

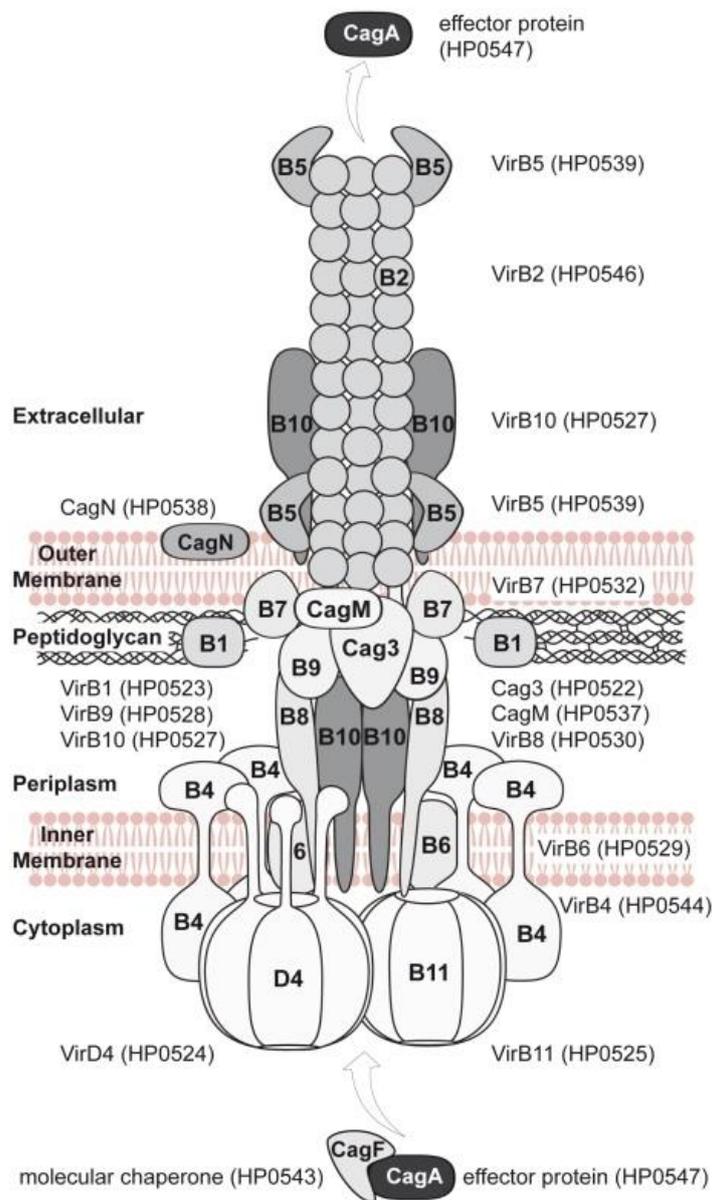


Figura 5. Modelo del sistema de secreción tipo IV (T4SS), codificado por una variedad de genes ubicados en la isla de patogenicidad *cag* de *H. pylori*. Tomado de Olbermann. *et al.* PLOS Genetics 2010; 6(8) [181].

Una vez liberada en el citoplasma de la célula epitelial, CagA actúa sobre dos quinasas eucariotas, Src y Abl, de manera distinta en función de la etapa de la infección [36]. En los primeros momentos CagA es fosforilada por Src, de forma que CagA fosforilada recluta a Csk, el inhibidor de Src, e impide así su acción fisiológica a la vez que se produce un efecto de *feedback* negativo [37]. La inhibición de Src lleva a la desfosforilación de proteínas de unión a actina, lo que genera cambios morfológicos y en especial la elongación de las células afectadas, junto con la dispersión de las células epiteliales [38]. Una vez fosforilada, CagA puede activar a Abl (de ahí se explica la actividad secuencial de CagA sobre estas proteínas en cada periodo de la infección) y se mantienen

los efectos a pesar de que Src se encuentre inactivada [39]. No obstante, CagA también muestra actividad en su forma desfosforilada, interaccionando e inhibiendo proteínas implicadas en diversos procesos como la adherencia entre células epiteliales, la pérdida de la polaridad celular, mecanismos proinflamatorios y mitogénesis [40–42].

Adicionalmente, se ha visto que algunas cepas de *H. pylori* poseen una variante de CagA capaz de inducir la producción de IL-8 por medio de la ruta de NF- κ B [43], lo cual se ve potenciado por el transporte del peptidoglicano por este sistema de secreción, el cual induce a su vez la generación de diversas citoquinas (entre ellas IL-8) al promover la activación del receptor NOD1 y la producción de interferón [44]. Como resultado se genera una respuesta proinflamatoria por la IL-8 y una respuesta inmunitaria tipo Th1 por el IFN [45]. Se ha demostrado que CagA es un factor de riesgo para el desarrollo de ulceración péptica (gástrica o duodenal), así como de cáncer gástrico, existiendo una relación directa entre el tipo y número de copias del motivo EPIYA con la probabilidad de sufrir estas patologías [46].

1.1.3.3. Citotoxina CagE

CagE es una toxina codificada por el gen *cagE* (del inglés, *cytotoxin-associated gene E*), localizado en la misma caja de patogenicidad que la citotoxina CagA. Al igual que ocurría con el anterior factor de virulencia, CagE es transportado por un sistema de secreción tipo IV y activa la producción de citoquinas en las células epiteliales del hospedador, principalmente IL-8. Esta interleuquina es un potente quimioatrayente para los neutrófilos, generando una fuerte respuesta inflamatoria en el tejido colonizado. CagE se ha asociado con un aumento en el desarrollo de ulceración duodenal, así como de cáncer gástrico [47,48]; Este factor de virulencia se ha relacionado además con el desarrollo de gastritis erosiva, un tipo especialmente grave de gastritis [49].

1.1.3.4. Endonucleasa IceA

La proteína IceA es una endonucleasa de tipo Nla-III, codificada por el gen *iceA* (del inglés, *induced by contact with epithelium gene A*) [50]. Este gen presenta dos alelos distintos *iceA1* e *iceA2*, de los cuales únicamente el primero se ha correlacionado con un incremento en la patogenicidad de *H. pylori*. Este factor de virulencia ha sido asociado principalmente con el desarrollo de la enfermedad ulcerosa péptica (en especial con la ulceración duodenal), aunque en menor medida también parece estar implicado con la aparición de cáncer gástrico. Concretamente *iceA1* actúa induciendo la producción de citoquinas (IL-8 e IL-6) por parte de las células de la

mucosa epitelial gástrica, aumentando la infiltración neutrofílica y agravando tanto la inflamación como la ulceración péptica [47,50,51].

1.1.3.5. Citotoxina vacuolizante VacA

La mayoría de las cepas de *H. pylori* cuentan en su genoma con una secuencia codificante para la toxina de vacuolización VacA [52]. El gen *vacA* (del inglés, *vacuolating cytotoxin gene A*) codifica la secuencia de una protoxina (con numerosos genotipos) que al sufrir procesamiento postraduccional da lugar a los monómeros que componen la toxina, los cuales se pueden asociar entre ellos para dar lugar a un homopolímero formado por entre 6 y 12 monómeros [53,54]. La toxina es exportada por un sistema de transporte tipo IV [55], no obstante, su estructura es inestable a pH ácido, por lo que se mantiene en forma de monómeros para facilitar su internalización en las células dianas y una vez en el citoplasma de estas, al encontrarse en un pH neutro, se ensambla hasta formar el homopolímero [56]. Una vez la toxina entra en la célula y oligomeriza produce numerosos efectos, tales como la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial [57], la activación de p38-MAPK (implicada en la apoptosis y autofagia) [58], la permeabilización del tejido epitelial [59] o la disrupción del esqueleto de actina [60]. Sin embargo, una de las acciones más interesantes de esta toxina reside en su capacidad para inhibir la respuesta inmunitaria en varios niveles: primero bloquea la activación del regulador transcripcional NFAT, imprescindible para la activación de linfocitos T en general, y en segundo lugar inhibe la proliferación de linfocitos T CD4+, en concreto bloqueando su progresión en el ciclo celular [61]. Finalmente, la actividad de los linfocitos B se ve impedida directamente, no solo por la inhibición de los linfocitos T CD4+ implicados en la señal de coestimulación, sino también por el bloqueo de la ruta de presentación antigénica asociada al MHC-II [62,63]. Se ha visto que la relación entre el desarrollo de cáncer gástrico y ulceración duodenal con la toxina VacA es mayor en el caso del genotipo s1, siendo lo más habitual que las cepas s1 cuenten también con la citotoxina CagA [47,64].

1.1.3.6. Adhesina BabA

BabA es una adhesina perteneciente a la familia de las proteínas de membrana externa de *Helicobacter*, codificada por el gen *babA2* (del inglés *blood group antigen binding adhesin 2*). Esta proteína media la adhesión de *H. pylori* a la mucosa del huésped al interactuar de manera específica con el antígeno de Lewis, expresado en las células epiteliales del estómago, en especial el antígeno Le^b [65]. Se ha observado que existe una asociación directa entre los niveles de expresión de BabA y la densidad a la que se encuentra colonizando *H. pylori* el estómago (debido a la mayor capacidad para adherirse a la superficie gástrica), lo que finalmente lleva a un

agravamiento de los síntomas derivados de la infección como resultado de la mayor carga bacteriana. No obstante, en pacientes infectados por cepas que expresaban bajos niveles de una variante de BabA con afinidad reducida por Le^b, la gravedad del cuadro clínico fue mayor, si bien todavía no se conoce la razón de este fenómeno [66,67]. Otro factor que puede explicar una mayor virulencia en las cepas que expresan BabA es que una vez adheridas muestran un incremento en la traslocación de CagA, facilitando así la acción de esta toxina y aumentando la inflamación intestinal [68]. Además, la mayoría de cepas aisladas positivas para BabA no solo lo eran para CagA sino también para VacAs1, asociándose con una mayor tendencia a desarrollar metaplasia, así como un cuadro de ulceración duodenal y cáncer gástrico más severo [69].

1.1.3.7. Toxina DupA

DupA, codificada por el gen *dupA* (del inglés, *duodenal ulcer promoting gene A*), es una proteína capaz de inducir la producción de IL-8, lo cual lleva a una respuesta inmune principalmente de tipo Th1. Se ha demostrado que esta toxina es capaz de activar cuatro factores de transcripción en el hospedero que regulan positivamente la traducción del gen de IL-8, los reguladores NF-kB, AP-1, ISRE y CRE [70]. Aunque originalmente se creía que la inducción en la producción de esta citoquina tenía lugar a nivel de las células epiteliales, más tarde se demostró que no era así, sino que lo hace actuando sobre los monocitos y linfocitos infiltrados en la mucosa [71]. DupA ha sido relacionada con la aparición de ulceración duodenal; sin embargo, se ha demostrado que ejerce un efecto protector contra el desarrollo de atrofia, cáncer y ulceración en el estómago por un mecanismo aún desconocido [72–74].

1.1.3.8. Proteína inflamatoria de membrana externa OipA

La proteína OipA (del inglés, *Outer membrane inflammatory protein A*), pertenece al grupo de proteínas externas HOP (*Helicobacter Outer Proteins*) [75]. La expresión de esta proteína puede ser controlada por un sistema de SSM (*Slipped Stran Misparing*) durante la replicación cromosómica, actuando como un interruptor que permite o impide su traducción [76]. OipA parece actuar a diversos niveles, en primer lugar induciendo la fosforilación de FAK, lo que lleva a su vez a la activación de MAPK y a la formación de fibras de estrés de actina [77]. En segundo lugar, OipA es capaz de inducir la fosforilación del regulador PKB por medio de EGFR, el cual controla diversos aspectos del ciclo celular tales como la proliferación, el crecimiento, la diferenciación y la motilidad celular [78]. En tercer lugar, se ha observado que esta proteína es capaz de inducir la apoptosis en las células epiteliales al aumentar el ratio Bax/Bcl-2, incrementando la concentración del primero y disminuyendo la del segundo [79]. Por último, se sabe que OipA también actúa

aumentando la producción de IL-8 a través de la vía del interferón, al igual que otros factores de virulencia [80]. OipA se ha asociado con un aumento de la adherencia de *H. pylori* sobre las células epiteliales del estómago, con el consiguiente aumento en la carga bacteriana [81], además de ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad ulcerosa péptica (especialmente en el estómago) y cáncer gástrico [82,83].

1.1.3.9. Proteína activadora de neutrófilos NapA

NapA es una proteína, perteneciente a la familia de proteínas Dps, que está codificada por el gen *napA* (del inglés *neutrophil-activating protein A*). Este factor de virulencia muestra una estructura dodecamérica con hierro como cofactor y está presente en prácticamente todas las cepas de *H. pylori*, expresándose en grandes cantidades. Esta proteína ejerce un efecto quimioatrayante sobre los neutrófilos y monocitos del hospedador, favoreciendo su extravasación hacia el sitio de la infección; además, induce la producción de ROS en estas células mediante la activación de la enzima NADPH oxidasa, a través de una cascada de eventos que incluyen el aumento en los niveles de calcio citosólico y la fosforilación de numerosas proteínas. Si bien esta proteína aumenta la producción de ROS que dañan el DNA de las células, también ejerce un efecto protector en la bacteria mediante el secuestro del hierro intracelular, de forma que solo las células del hospedero se ven afectadas por las ROS. Adicionalmente, NapA también actúa como modulador de la respuesta inmune favoreciendo la producción de dos interleuquinas, IL-8 e IL-12, por parte de los neutrófilos y monocitos. Estas citoquinas provocan un aumento de la inflamación en el tejido afectado y la supresión de la respuesta Th2 en favor de una respuesta de tipo Th1 en los linfocitos T CD4+ respectivamente [84–86]. NapA se ha asociado no solo con un aumento en la inflamación gástrica sino también con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer gástrico [87].

1.1.3.10. Vesículas de membrana externa

Aunque no se tratan de factores de virulencia en sí mismas, las vesículas de membrana externa (VME) son estructuras esféricas producidas principalmente por bacterias Gram-negativas que permiten la vehiculización de otros factores, como es el caso de VacA [88]. Estas vesículas son generadas a partir de extrusiones de la membrana externa bacteriana que luego se escinden y liberan, llevándose consigo parte del periplasma. Por ello, la composición de las vesículas suele ser muy similar en cuanto a lipopolisacáridos (LPS) y proteínas de superficie con respecto a la membrana bacteriana [89]. Hay que tener en cuenta que las condiciones ambientales, tales como el estrés oxidativo o la presencia de antibióticos puede alterar tanto la cantidad como la composición de estas vesículas [90,91], observándose además que el contenido de LPS puede determinar a su

vez las proteínas presentes en las vesículas [92]. Las funciones que cumplen estas VME son muy variadas y van desde promover la supervivencia bacteriana [93], la comunicación con otros microorganismos [94] y el transporte de factores de virulencia hasta la modulación del sistema inmune. Asimismo, estas vesículas son capaces de bloquear el crecimiento de las células epiteliales y disminuir su viabilidad [95].

En el caso concreto de *H. pylori* las VME muestran unas cantidades relativas de LPS mayores a las presentes en la membrana plasmática, además de lipoproteínas, porinas y adhesinas [89]. Aparte de VacA, existen otros factores de virulencia que pueden ser transportados por este sistema de forma alternativa a su transporte habitual, como es el caso de CagA y NapA, [96,97]. Cabe destacar que las formas cocoides de *H. pylori* siguen siendo capaces de producir estas vesículas, si bien con una composición diferente a la que expresan las formas helicoidales [98].

1.1.4. Patogenia

H. pylori es el patógeno de mayor prevalencia mundial (Figura 6), infectando a más de la mitad de la población global [99]; no obstante, la incidencia en algunos países (principalmente aquellos en vías de desarrollo) puede superar el 80%. España es considerado un país con alta prevalencia, con un 55% de incidencia entre su población, siendo superado en Europa Occidental únicamente por Italia, Finlandia y Portugal, con una prevalencia del 56, 57 y 86% respectivamente [100].

Si bien el mecanismo de transmisión exacto de la infección no se conoce con total seguridad, se sabe que esta suele adquirirse durante los primeros años de vida y perdura hasta la edad adulta [101]. Algunos estudios parecen indicar que la transmisión ocurre especialmente por vía fecal-oral u oral-oral, mayormente entre miembros de la misma familia [102,103]. Un gran número de los pacientes infectados por *H. pylori* son asintomáticos, sin embargo, hasta el 68% de los casos desarrollan patologías de gravedad variada en algún momento, desde gastritis hasta cáncer gástrico. El 90% de los casos de cáncer gástrico, la tercera causa de muerte mundial, se han asociado con la infección por *H. pylori*, es por ello que este patógeno es la única bacteria clasificada como carcinógeno de grado I por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [104–106].

La patología más común asociada con la infección por *H. pylori* es la gastritis. Si bien no es lo más habitual, tampoco es infrecuente que en los primeros momentos de la infección se desarrolle una gastritis aguda. Estos pacientes pueden padecer de dispepsia, con sensación de saciedad, náuseas, vómitos e inflamación de la mucosa gástrica [107]. En esta etapa se ve afectada la totalidad del estómago, cursando con una disminución de la secreción de ácido gástrico y la infiltración de neutrófilos en la mucosa, lo que lleva a daño tisular debido a las ROS y otros productos liberados por estas células del sistema inmunitario. Cuando la infección se prolonga a lo largo del tiempo los

linfocitos van sustituyendo a los neutrófilos y se pasa a una gastritis crónica, normalmente más focalizada [108].

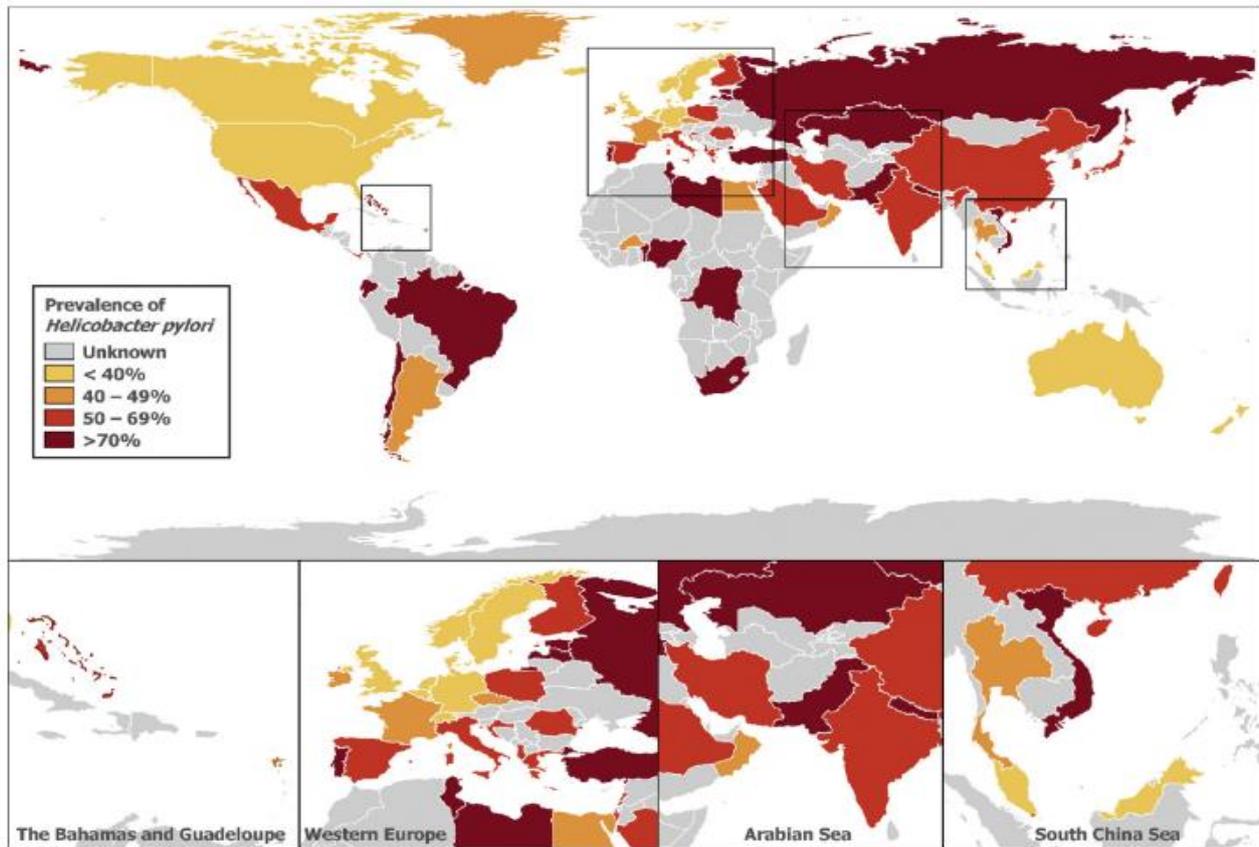


Figura 6. Mapa de la prevalencia mundial por países de la infección por *H. pylori*. Tomado de Hooi *et al.* Gastroenterology. 2017;153(2):420–9 [99].

Otra complicación relativamente frecuente en las infecciones por *H. pylori* es la ulceración péptica. Las úlceras pépticas se definen como daños en la mucosa, ya sea gástrica o duodenal, que llegan hasta las capas musculares inferiores. Estas heridas suelen ser más comunes en los lugares con mayor grado de inflamación del tejido u órgano afectado. Cuando la ulceración se complica lleva a sangrado, perforación del tejido y obstrucción duodenal. Además, se sabe que el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), como el ibuprofeno o la aspirina, aumenta la probabilidad de que aparezcan este tipo de úlceras en pacientes infectados por *H. pylori* [109,110]. El desarrollo de úlceras puede estar o no asociado a dispepsia, siendo en el segundo caso una dispepsia funcional, una variante más frecuente en la que el paciente muestra los síntomas típicos sin que se aprecie a simple vista ningún daño intestinal [111].

La inflamación crónica causada por *H. pylori* puede derivar en una pérdida de la estructura fisiológica de la mucosa y a la destrucción del tejido, ocasionando la formación de tejido fibrótico en su lugar. Se ha demostrado que *H. pylori* es capaz de provocar la hipermetilación del DNA en

los promotores de genes supresores de tumores por un mecanismo aún desconocido, si bien el aumento en la inflamación parece ser un factor clave para ello. Esto, unido al incremento de la división celular en la zona dañada que tiene lugar para tratar de regenerar el tejido afectado y al daño sobre el DNA que causan las ROS y demás productos liberados por los neutrófilos infiltrados en la mucosa gástrica, puede llevar a una desregulación del ciclo celular debido a la modificación en la expresión de numerosos genes (oncogenes y genes supresores de tumores). Esto puede inducir finalmente la transformación de las células epiteliales a células tumorales capaces de proliferar descontroladamente, migrar a otros órganos e invadirlos. [1,112].

Una de las enfermedades más graves que pueden desarrollar los pacientes infectados por *H. pylori* es el linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (linfoma MALT), una neoplasia de linfocitos B maduros producidos por los centros germinales en los folículos linfoides. Normalmente este tipo de linfoma no suele metastatizar, limitándose su localización a la mucosa y submucosa gástrica y, en algunos casos a la capa muscular [113]. Sin embargo, en raras ocasiones puede transformarse en un linfoma difuso de células B grandes mucho más agresivo [114]. Desgraciadamente, los síntomas de este cáncer son bastante inespecíficos: dispepsia, acidez, dolor epigástrico, anemia, obstrucción y sangrado intestinal, lo que dificulta su diagnóstico en las primeras etapas [115]. Dada la gran asociación entre esta bacteria y el linfoma MALT, la terapia con antibióticos ha demostrado ser efectiva para disminuir la progresión de este cáncer, facilitando su ataque por parte del sistema inmune. Además, la antibioticoterapia ha sido efectiva incluso en algunos tipos de linfoma MALT independientes de *H. pylori* [116].

La infección por *H. pylori* se ha asociado con la incidencia, progresión y gravedad de otras enfermedades extragástricas tales como enfermedad coronaria, alteraciones dermatológicas, tiroiditis autoinmune (enfermedad de Hashimoto), trombocitopenia púrpura, anemia por déficit de hierro, síndrome de Guillain-Barré, migrañas y esclerodermia, entre otros [117].

1.2. Tratamientos y mecanismos de resistencia a antibióticos

Tradicionalmente el tratamiento de primera línea para la erradicación de *H. pylori* consistía en una terapia triple en la que se administraba un inhibidor de la bomba de protones (IBP) y dos antibióticos que pueden ser claritromicina, en combinación con metronidazol o amoxicilina, durante 10-14 días. Esta terapia mostraba una eficacia superior al 90%, sin embargo, el aumento en las resistencias de este patógeno frente a los antibióticos ha determinado que las tasas de erradicación disminuyan por debajo del 60%, lo que ha obligado a emplear terapias cuádruples.

La terapia cuádruple concomitante puede contener, además de sales de bismuto, un IBP, metronidazol y tetraciclina, debiéndose administrar en ese caso también durante 10-14 días; o bien

puede ser una terapia cuádruple sin bismuto, en cuyo caso consistiría en la administración de un IBP, amoxicilina, claritromicina y metronidazol durante 14 días, siendo esta la terapia más recomendada (salvo en pacientes con alergia a la penicilina).

Cuando falla el tratamiento de primera línea se elige otro como terapia de segunda línea, que en general puede ser: (1) una terapia triple con IBP, claritromicina y levofloxacina (solo en el caso de pacientes alérgicos a los betalactámicos), (2) una terapia cuádruple con IBP, bismuto, metronidazol y tetraciclina o (3) una terapia cuádruple con IBP, bismuto, amoxicilina y levofloxacina.

En caso de que esta terapia también falle se prueba con una terapia de tercera línea que, a ser posible, no contenga los anteriores antibióticos y, si finalmente esta también fracasase, sería necesario plantearse otras alternativas menos convencionales. Lo más recomendable en este tipo de casos en los que fallan múltiples terapias sería la realización de pruebas de resistencia para dilucidar *in vitro* los antibióticos que van a ser efectivos antes de su administración; sin embargo, debido a la dificultad de llevar a la práctica generalizada esta aproximación, lo más habitual suele ser optar directamente por una terapia de rescate. Esta terapia, de cuarta o quinta línea según las terapias fallidas administradas previamente, emplea furazolidona y/o rifabutina, los cuales no suelen usarse salvo que sea imprescindible, debido a la toxicidad del primero y a que el segundo es un antibiótico empelado en el tratamiento para la tuberculosis, por lo que se desea evitar la aparición de resistencias frente a él [118–121].

1.2.1. Inhibidor de la bomba de protones

El ciclo de vida de *H. pylori* depende en gran medida del pH del medio en el que se encuentre. Cuando el pH se encuentra entre 3 y 6, un gran número de bacterias adquieren forma cocoide, la cual es mucho más resistente a los antibióticos. Sin embargo, a pH neutro predomina la forma espiralada, mucho más sensible. Los inhibidores de la bomba de protones (IBP) actúan inhibiendo la actividad de la enzima ATPasa presente en la membrana de las células epiteliales del estómago. Este hecho impide la liberación de protones al jugo gástrico y evita su acidificación, induciendo un cambio de *H. pylori* hacia la forma replicativa más sensible y aumentando la eficacia del tratamiento con antibióticos. El tratamiento con IBP favorece la ausencia de formas cocoides resistentes capaces de revertir a espiraladas una vez culminado el tratamiento [122,123].

1.2.2. Sales de bismuto

El bismuto se administra en forma de compuestos que al exponerse al pH ácido del estómago son hidrolizados en sales o polímeros de bismuto. Las sales producidas son capaces de interactuar con la mucosa gástrica y unirse a las proteínas expuestas en las úlceras generadas por *H. pylori*

[124]. Las sales de bismuto muestran capacidad bactericida contra diversas especies de patógenos intestinales; frente a *H. pylori* el bismuto actúa de cuatro formas distintas: (1) formando complejos con la pared bacteriana e introduciéndose en el periplasma, (2) inhibiendo la actividad de diversas enzimas esenciales para la supervivencia (ej. la ureasa, fumarasa, alcohol deshidrogenasa y la fosfolipasa), (3) inhibiendo la síntesis de ATP y (4) impidiendo la adherencia de *H. pylori* sobre la mucosa gástrica [125]. Hasta el momento no se ha observado el desarrollo de resistencia frente a las sales de bismuto siempre que se utilicen como parte de una terapia cuádruple [126].

1.2.3. Claritromicina

La claritromicina es un antibiótico sintetizado a partir de la eritromicina, que pertenece a la familia de los macrólidos. Los macrólidos impiden el desarrollo celular mediante el bloqueo de la síntesis de proteínas, uniéndose al rRNA 23S de la subunidad mayor del ribosoma, en el túnel por el que emerge la cadena polipeptídica, actuando de esta forma como barrera que impide la salida de la proteína recién sintetizada. Adicionalmente, debido a que el sitio de unión coincide con el lugar de interacción de la enzima peptidil-transferasa, los macrólidos pueden impedir su correcta unión con el ribosoma, imposibilitando así la formación de los enlaces peptídicos [127,128].

Uno de los principales mecanismos de resistencia en *H. pylori* que le confiere una menor sensibilidad a la claritromicina es la mutación de la subunidad 23S del ribosoma, lo que disminuye la afinidad del macrólido por su sitio de unión [129]. Otro mecanismo relevante frente a este grupo de antibióticos consiste en el desarrollo de bombas de eflujo, que expulsan los macrólidos del interior celular con el objetivo de que no alcancen su diana [130].

1.2.4. Metronidazol

El metronidazol es un antibiótico y antiparasitario sintético perteneciente al grupo de los nitroimidazoles. Este compuesto es un profármaco que da lugar al fármaco activo mediante la reducción del grupo nitro [131]. En el caso de *H. pylori*, esta reacción es mediada por una serie de enzimas, principalmente la NADPH-nitrorreductasa, la NADPH-flavin-oxidoreductasa y las enzimas de tipo ferredoxina [132]. La reacción de reducción del grupo nitro del metronidazol genera una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno, las cuales provocan daño citotóxico en la bacteria, a la par que el fármaco activo se une al DNA y lo desestabiliza, impidiendo su replicación y reparación [133].

Existen tres mecanismos de resistencia frente a este antimicrobiano. En primer lugar, la mutación génica de las enzimas encargadas de metabolizar el profármaco a su forma activa, con lo cual disminuye la afinidad por el sustrato, en especial la NADPH-flavin-nitrorreductasa (las mutaciones

en las otras dos enzimas pueden disminuir la sensibilidad de la bacteria, pero únicamente acompañadas de mutaciones en la flavin-nitrorreductasa). Como consecuencia no se generan ni las ROS ni la molécula de fármaco activa capaz de desestabilizar el DNA [134]. Otro mecanismo de resistencia frente al metronidazol es la sobreexpresión de la enzima superóxido dismutasa (por mutaciones en el regulador Fur), lo cual provoca un incremento de la neutralización de las ROS, disminuyendo significativamente la efectividad del antibiótico [135]. También se ha descrito la existencia de bombas de eflujo capaces de extraer el metronidazol del citoplasma de la bacteria [136].

1.2.7. Levofloxacin

La levofloxacin es un antibiótico bactericida perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas, que actúa uniéndose e inhibiendo el dominio ligasa de la DNA-girasa, de forma que el DNA bacteriano se fragmenta y se queda en estado superenrollado, por lo que se bloquea la división celular [137]. A diferencia del resto de antibióticos para el tratamiento de la infección por *H. pylori*, en el caso de la levofloxacin solo se ha identificado un mecanismo de resistencia hasta el momento, la adquisición de mutaciones en el dominio girasa de la diana [138,139].

1.2.5. Amoxicilina

La amoxicilina es un antibiótico semisintético del grupo de los betalactámicos, que actúa interfiriendo la síntesis de peptidoglicano al bloquear las enzimas transpeptidasas (PBP), encargadas del entrelazamiento de las cadenas que forman el peptidoglicano [140]. Los mecanismos de resistencia frente a este antibiótico consisten principalmente en la mutación de los genes que codifican las PBP, lo que resulta en una disminución de la afinidad por el antibiótico [141] y la producción de enzimas betalactamasas, que degradan el antibiótico antes de que llegue a su diana [142].

1.2.6. Tetraciclina

La tetraciclina es un antiparasitario y antibiótico perteneciente al grupo de antimicrobianos homónimo, cuya acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica, principalmente en las bacterias, mediante la unión a la subunidad 30S del ribosoma. Este antimicrobiano bacteriostático entra al interior de la bacteria tanto por sistemas de transporte como por difusión pasiva e interacciona de forma reversible con el ribosoma en el sitio de unión al aminoacil-tRNA, de manera que no se pueden incorporar aminoácidos para la formación de la cadena peptídica, por lo que se bloquea el crecimiento y la división celular [143]. *H. pylori* cuenta con varios sistemas que le confieren resistencia frente a este antibiótico, principalmente disminuyendo la afinidad por el

antibiótico mediante la mutación de la subunidad 30S del ribosoma [144], la expulsión mediante bombas de eflujo [145] y el secuestro intracelular de la molécula mediante la interacción con la proteína Tet(O), de modo que no pueda hacerlo con el ribosoma [146].

1.3. Crisis de antibióticos: necesidad de nuevas dianas para el desarrollo de nuevas clases de antimicrobianos

Debido al desarrollo y acumulación de mecanismos de resistencia frente a la mayoría de los antibióticos de uso actual, las tasas de erradicación obtenidas con las terapias clásicas están comenzando a decaer peligrosamente. En la actualidad, el aislamiento de cepas clínicas de *H. pylori* multirresistentes, es decir, resistentes a tres o más familias de antibióticos, constituyen un hecho bastante común [147,148]. El uso extensivo e indiscriminado de antibióticos y la mala gestión de estos por parte de los pacientes (tomarlos sin prescripción médica o no completar el régimen de tratamiento) ha aumentado la adquisición de mecanismos de resistencia, usualmente por la transferencia horizontal de genes de resistencia entre cepas y especies, así como por la generación de resistencias cruzadas, puesto que en algunos casos, los mecanismos de resistencia desarrollados frente a una familia de antibióticos pueden ser lo suficientemente inespecíficos como para conferir resistencia frente a la acción de otras [149].

Dada la velocidad de aparición de resistencias frente a los antibióticos, el corto periodo de los tratamientos antimicrobianos y el gasto, tanto económico como en tiempo, necesario para sacar estos fármacos al mercado, la rentabilidad económica del desarrollo de nuevos antibióticos resulta relativamente baja, por ende las compañías farmacéuticas optan por no invertir en ellos, lo que constituye otro factor relevante en la actual crisis de antibióticos [150]. El marcado incremento en los mecanismos de resistencia antimicrobiana por *H. pylori* determinó que la Organización Mundial de la Salud lo incluyera en febrero de 2017 en su lista de “patógenos prioritarios”, compuesta por 12 microorganismos para los que resulta imperativa la búsqueda de nuevos antimicrobianos y entre los cuales *H. pylori* se encuentra en el grupo de alta prioridad (Figura 7).

En la actualidad existen alrededor de 20 familias de antibióticos diferentes, que agrupan a decenas de fármacos. Sin embargo, esta amplia variedad de antimicrobianos ejerce su acción solo contra 5 dianas moleculares en la célula microbiana: (1) la integridad de la membrana celular, (2) bloquean la síntesis de proteínas, (3) la síntesis de la pared celular, (4) la síntesis de folatos y (5) la síntesis de ácidos nucleicos. Esta notable carencia de dianas terapéuticas propicia la aparición de mecanismos de resistencias en ocasiones eficaces frente a varios antibióticos simultáneamente (Figura 8).

Priority 1: CRITICAL

Acinetobacter baumannii, carbapenem-resistant
Pseudomonas aeruginosa, carbapenem-resistant
Enterbacteriaceae, carbapenem-resistant, 3rd generation cephalosporin-resistant

Priority 2: HIGH

Enterococcus faecium, vancomycin-resistant
Staphylococcus aureus, methicillin-resistant, vancomycin intermediate and resistant
Helicobacter pylori, clarithromycin-resistant
Campylobacter, fluoroquinolone-resistant
Salmonella spp., fluoroquinolone-resistant
Neisseria gonorrhoeae, 3rd generation cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

Priority 3: MEDIUM

Streptococcus pneumoniae, penicillin-non-susceptible
Haemophilus influenzae, ampicillin-resistant
Shigella spp., fluoroquinolone-resistant

Figura 7. Lista de 12 patógenos bacterianos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, según la OMS. Tomado de Tacconelli E. *et al.* The Lancet Infectious Diseases. 2018;18(3):318–27 [182].

Los mecanismos mediante los cuales las bacterias adquieren resistencia a la acción de los antibióticos se pueden agrupar en diferentes tipos: (1) disminución de la permeabilidad de la membrana al antimicrobiano, (2) modificación química de la diana del antibiótico, (3) mutación de la diana a nivel génico, (4) destrucción o degradación enzimática del antibiótico, (5) sobreexpresión de la diana para compensar su inhibición, (6) reemplazo de la diana por una molécula similar pero no esencial para el microorganismo, (7) desarrollo de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico antes de que ejerza su efecto, (8) inactivación química del fármaco o (9) protección por otras moléculas (Figura 9). Aunque las bacterias Gram-negativas pueden desarrollar todos estos mecanismos de resistencia, el número de bacterias Gram-positivas con capacidad para bloquear la

entrada de fármacos es reducido (debido a la falta de LPS), al igual que tampoco pueden hacer uso de determinados sistemas de eflujo [151–153].

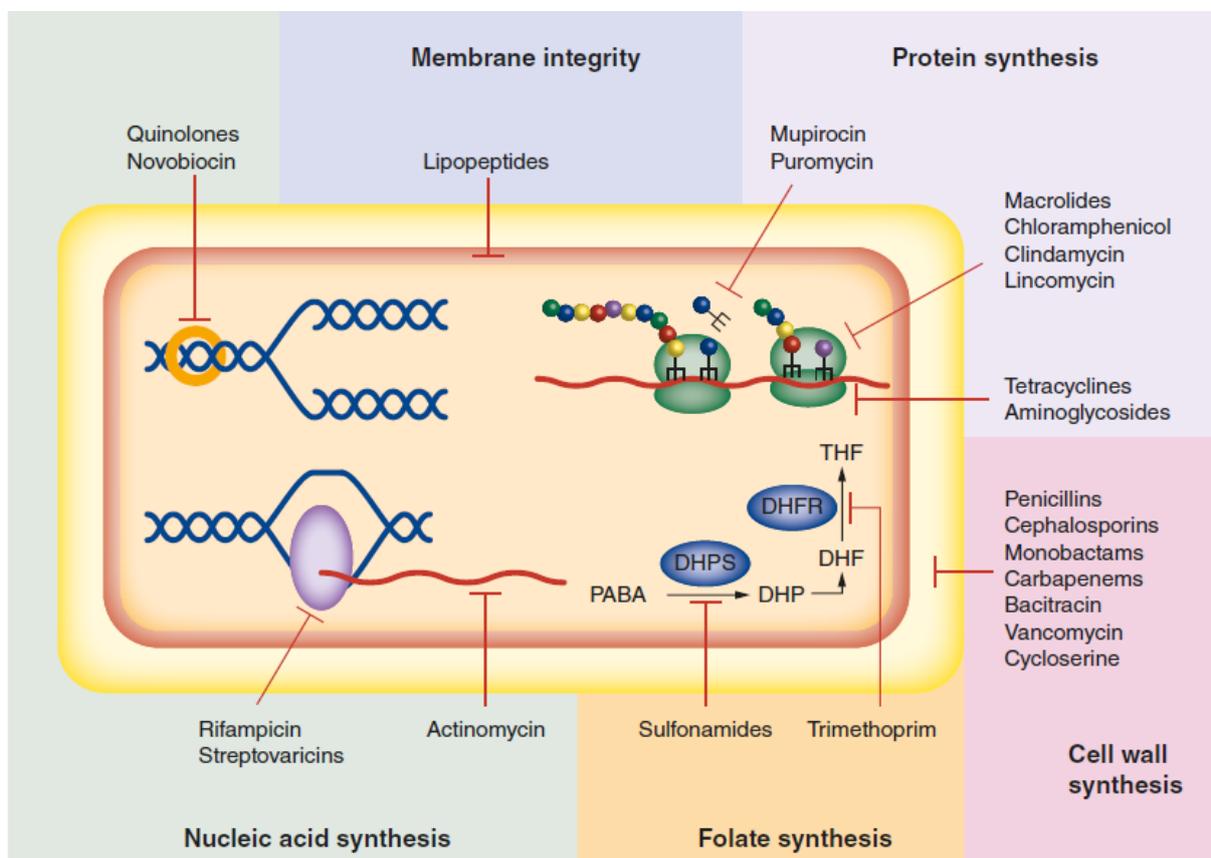


Figura 8. Dianas moleculares de los antibióticos de uso actual y algunas familias de antibióticos que actúan sobre estas dianas. Tomado de González *et al.* Future Medicinal Chemistry. 2018. p. 541–60 [151].

La adquisición de mecanismos de resistencia puede tener diferentes orígenes: (1) la aparición de mutaciones al azar en el genoma por errores en la replicación o reparación del DNA, (2) desarrollo de mutaciones por sistemas intrínsecos de la bacteria (transposición) y (3) transferencia de genes de resistencia provenientes de otras bacterias (mediante transducción, transformación o conjugación). La aparición de estos mecanismos se ve propiciada en ocasiones por la presión selectiva a la que se ve sometida el patógeno como resultado del tratamiento [152,153].

El método convencional para la búsqueda de nuevos antibióticos consistía tradicionalmente en la identificación de metabolitos con actividad inhibitoria sobre los patógenos, producidos de forma natural por otros microorganismos (especialmente hongos y actinomicetos). Ante la aparición de numerosas resistencias y la dificultad de encontrar nuevos antibióticos naturales, una estrategia eficaz consistió en la modificación química, bien al azar o bien racional, de los compuestos antimicrobianos previamente existentes de forma que aumentasen su capacidad bactericida. Sin

embargo, la modificación química muchas veces solucionaban el problema solo de forma temporal y rápidamente aparecían cepas resistentes a los antibióticos modificados [154].

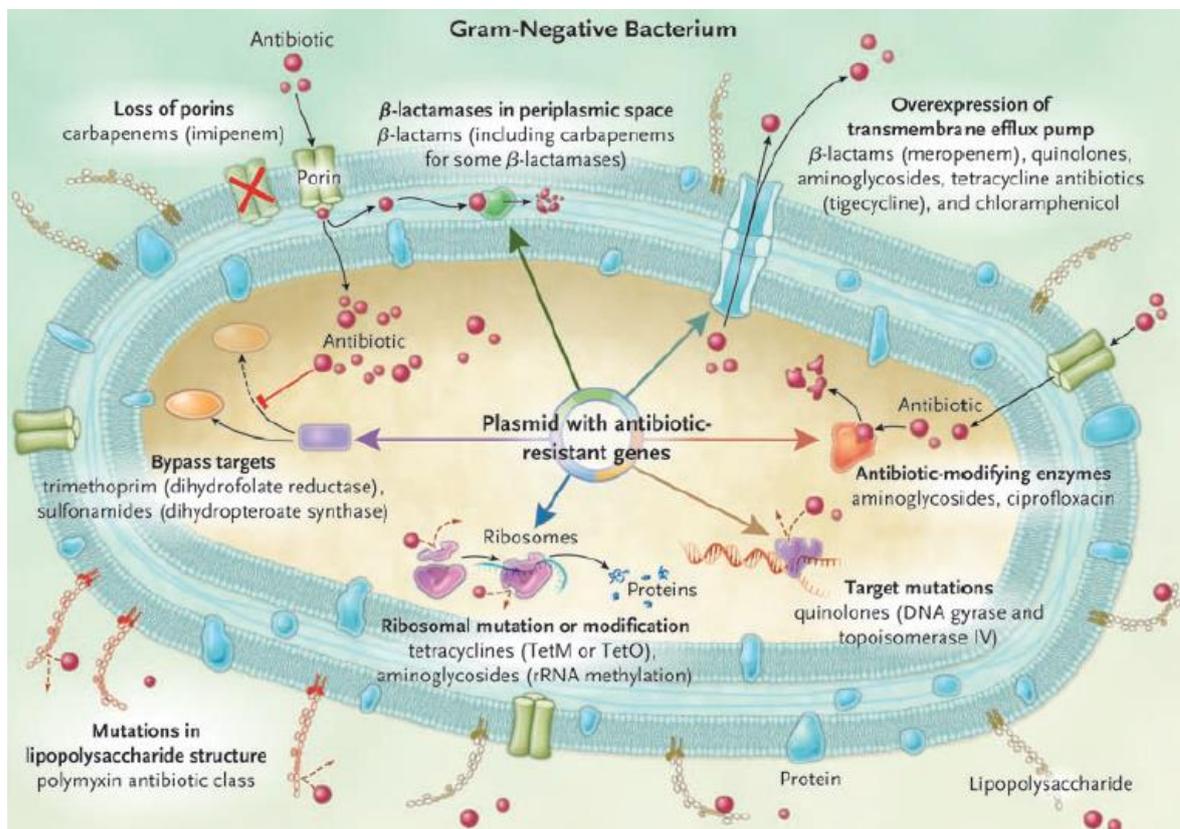


Figura 9 Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias Gram-negativas y las familias de antibióticos a las que se vuelven insensibles. Tomado de Peleg AY. *et al.* New England Journal of Medicine. 2010. p. 1804–13 [183].

Una estrategia prometedora para evadir los mecanismos de resistencia actuales consiste en la identificación y validación de nuevas dianas moleculares en el microorganismo, que permitan el desarrollo de nuevas clases de antibióticos frente a los cuales no existan mecanismos de resistencia en la actualidad. Una diana terapéutica ideal se debe caracterizar por: (1) ser esencial para la viabilidad de la bacteria o su patogenicidad, (2) no tener un equivalente en humanos o, de haberlo, que la homología sea reducida, (3) ser relativamente específica (una especificidad elevada minimiza los efectos secundarios sobre la microbiota, sin embargo, una diana menos específica permite el desarrollo de antibióticos de amplio espectro) y (4) debe poder ser sobreexpresada de forma recombinante y purificable en cantidades suficientes para realizar los ensayos experimentales [151,155].

En *H. pylori*, numerosas biomoléculas han sido empleadas como prometedoras dianas terapéuticas, pero todas ellas con éxito. Entre estas potenciales nuevas dianas frente a *H. pylori* encontramos:

(1) enzimas del metabolismo (enzimas de la ruta de síntesis del ácido shikímico, enzimas de la síntesis de coenzima CoA, la enzima fumarato reductasa, enzimas de la respiración bacteriana y enzimas o transportadores de electrones implicados en la descarboxilación del piruvato), (2) enzimas implicadas en la formación de la pared celular, (3) reguladores de la homeostasis del pH (como la enzima ureasa, el regulador de respuesta a níquel NikR, el transportador de níquel-cobalto NixA, el canal de transporte UreI y la enzima anhidrasa carbónica), (4) numerosos factores de virulencia relacionados con la motilidad, la formación de biofilms y la citotoxicidad (destacando VacA, CagA, BabA y OipA), (5) enzimas y bombas de eflujo implicadas en la regulación de los niveles de iones metálicos (principalmente para hierro, cadmio, cobalto y zinc) y (6) biomoléculas relacionadas con la protección frente a ROS (como reguladores de respuesta al estrés y enzimas implicadas en la neutralización de las ROS, incluyendo la enzima flavodoxina, encargada de sintetizar el cofactor FMN) [156].

1.3.1. Reguladores transcripcionales como dianas terapéuticas

Un grupo de moléculas con gran potencialidad como dianas terapéuticas son los reguladores transcripcionales bacterianos. Los reguladores transcripcionales son un grupo de proteínas capaces de interactuar con secuencias concretas de las regiones promotoras situadas en posición *upstream* respecto a la región codificante de sus genes diana, modificando de este modo la transcripción y expresión génica. Normalmente estas moléculas cuentan con dos dominios, un dominio regulador que es el que responde a las señales ambientales y un dominio efector de unión al DNA (DBD, del inglés *DNA binding domain*) que interactúa con la secuencia específica del DNA, generalmente a través de un motivo hélice-giro-hélice o HTH (del inglés *helix-turn-helix*). De esta forma, la señal detectada por el dominio regulador (la unión de un ligando, un cofactor u otro estímulo) suele inducir un cambio conformacional en la proteína que aumenta o disminuye la afinidad del DBD por el DNA. Los reguladores transcripcionales modulan la transcripción de dos maneras, bien actuando como activadores (provocando un cambio conformacional en el promotor que promueve la transcripción o reclutamiento de la RNA polimerasa, por efecto anti-represor, interactuando con la subunidad α de la RNA polimerasa, o con la subunidad σ) o bien actuando como represores (mediante impedimento estérico, por bloqueo de la elongación, formando un bucle en el promotor o por efecto anti-activador). En muchos casos, un mismo regulador transcripcional puede ejercer como represor de unos genes y como activador de otros simultáneamente. De hecho, muchos promotores cuentan con repeticiones consecutivas de la secuencia reconocida por el DBD, lo que permite la unión de varios reguladores transcripcionales con distintos dominios reguladores, pudiendo estar controlada así la expresión de un gen por varios estímulos simultáneamente.

Los reguladores transcripcionales constituyen prometedoras dianas terapéuticas debido a los efectos pleiotrópicos que pueden conllevar su inhibición, al alterarse la expresión de genes esenciales regulados no solo de forma directa por ellos sino también de forma indirecta. Los reguladores transcripcionales modulan la expresión de genes implicados tanto en la fisiología de la bacteria como en la expresión de factores de virulencia, lo cual hace que su inhibición pueda tener efectos tanto bactericidas/bacteriostáticos como de antivirulencia. Los fármacos antivirulencia no matan al microorganismo, sino que actúan sobre sus mecanismos de patogenicidad, impidiendo el daño al hospedador y aumentando su susceptibilidad al ataque por el sistema inmunitario y a la acción de los antibióticos convencionales [151].

1.3.1.1 Regulador de respuesta *ArsR*

ArsR es un regulador de respuesta de tipo Omp-R en *H. pylori*, que forma parte del sistema de dos componentes *ArsS*-*ArsR*, mecanismo esencial en la respuesta a la acidez del medio estomacal [157]. Los sistemas de transducción de señales de dos componentes (Figura 10) constituyen mecanismos de respuesta inmediata a estímulos ambientales en bacterias que garantizan una rápida adaptación ante los frecuentes cambios ambientales.

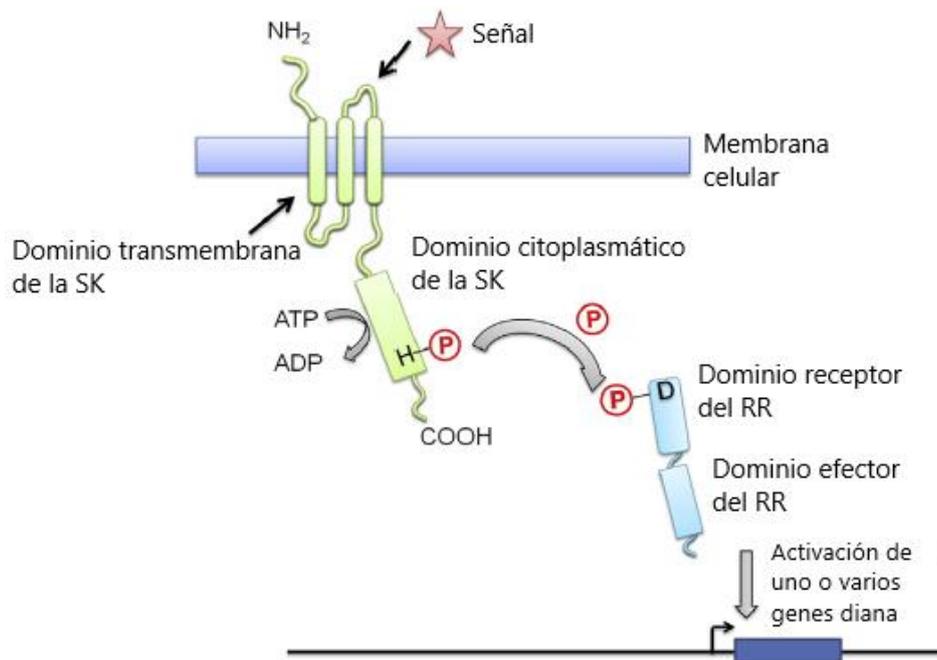


Figura 10. Esquema de un sistema de transducción de señales de dos componentes, con una SK integral de membrana y un RR citoplasmático con actividad de regulador transcripcional. Modificado de Connan C. and Popoff MR. *Research in Microbiology* 2015;166(4):332–43 [184].

Estos sistemas de respuesta están compuestos por dos proteínas, una sensor quinasa (SK) que reacciona ante el estímulo y transduce la señal a un regulador de respuesta (RR), con capacidad efectora. Las SK pueden ser proteínas de membrana o citoplasmáticas, según el estímulo al que responden, mientras que en el caso de los RR su naturaleza es muy diversa, según si actúan como reguladores transcripcionales (siendo estos la gran mayoría), como enzimas, como proteínas de unión al mRNA (ejerciendo un efecto anti-terminador sobre la transcripción), como reguladores de otras proteínas o simplemente intermediarios en la transferencia de grupos fosfato.

La señal del ambiente es captada por el dominio sensor de la SK, lo que genera cambios conformacionales en su estructura que favorecen la autofosforilación del dominio quinasa a expensas de ATP citoplasmático. Posteriormente, el dominio de fosforilación de la SK transfiere el fosfato a un aspartato del dominio de fosforilación del RR, lo cual provoca la activación del dominio efector específico de esta proteína [158]. En el sistema ArsSR de *H. pylori*, la proteína sensor quinasa ArsS detecta la acidificación del periplasma mediante la protonación de varios residuos de histidina presentes en el dominio sensor periplasmático [159], lo cual induce su autofosforilación y la consecuente transfosforilación del regulador de respuesta ArsR, aumentando su afinidad por el DNA en las secuencias de sus promotores diana y activando o reprimiendo la expresión de los genes que regula [160] (Figura 11).

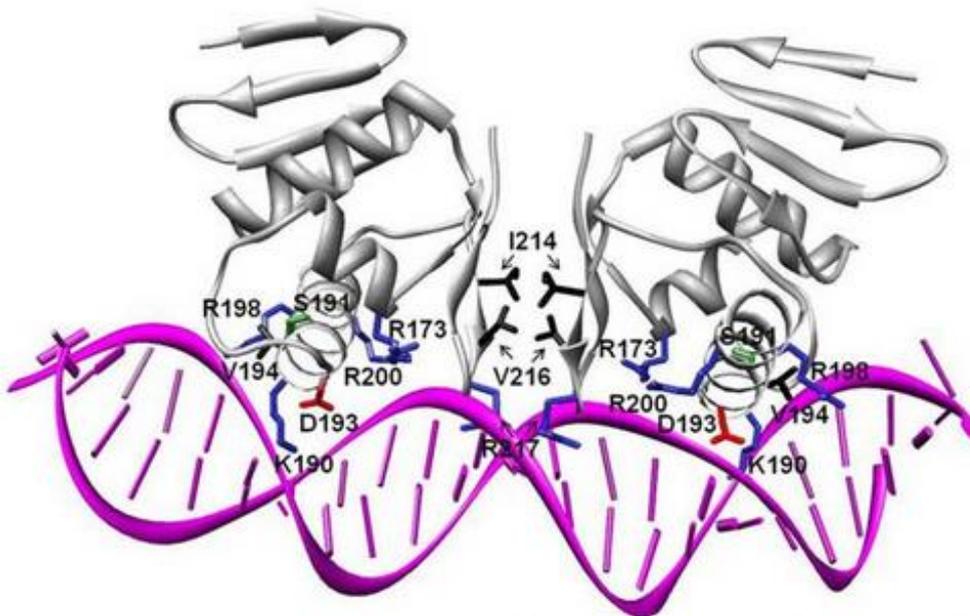


Figura 11. Modelo de la estructura tridimensional de los dominios de unión al DNA de dos moléculas (dímero) de ArsR, unido a la secuencia diana de DNA. Tomado de Gupta SS. *et al*; Journal of Biological Chemistry. 2009;284(10):6536–45 [185].

Adicionalmente, dentro del sistema de dos componentes ArsS-ArsR, la proteína sensor quinasa ArsS resulta esencial para el crecimiento a pH ácido y, por tanto, la colonización del hospedador; sin embargo, mutantes de delección de ArsS logran ser viables en ambientes no ácidos; no obstante, no ocurre lo mismo con los mutantes de delección del regulador de respuesta ArsR, los cuales pierden la viabilidad. Esto se debe a que el regulador de respuesta ArsR resulta esencial, mostrando actividad sobre ciertos promotores aun en ausencia de ArsS, lo cual sugiere que la forma desfosforilada de ArsR también es capaz de mediar la transcripción de genes [160,161]. ArsR actúa regulando una gran variedad de procesos importantes como la expresión de canales UreI, la arginasa RocF, la α -anhidrasa carbónica, componentes del complejo ureasa y dos amilasas alifáticas [21,157,162], así como diversos factores de virulencia implicados en la adhesión y formación de biofilms [163–166].

Nuestro grupo ha empleado por primera vez el regulador de respuesta esencial ArsR de *H. pylori* como diana terapéutica en la búsqueda de nuevos antimicrobianos frente a la infección por *H. pylori* [167].

1.3.1.2. Regulador de respuesta “huérfano” HsrA

HsrA (*homeostatic stress regulator*) es un regulador de respuesta de tipo Omp-R, esencial y altamente conservado entre los miembros de la clase *Epsilonproteobacteria*, codificado por el gen *hsrA* (también llamado *hp1043*) [168]. Esta proteína, formada por 223 residuos, se une a las secuencias específicas en los promotores de sus genes diana, modulando su expresión normalmente como un activador transcripcional [169]. El regulador HsrA modifica su propia expresión y actúa como un regulador homeostático global de diversos procesos como la división celular, la expresión de factores de virulencia, el metabolismo energético y del nitrógeno, la disponibilidad de nutrientes y la respuesta a estrés oxidativo [170–172].

Los estudios espectroscópicos realizados por RMN y cristalografía de rayos X demuestran que HsrA actúa como un homodímero *in vivo*, con un dominio regulador en N-terminal y un dominio efector de unión al DNA en C-terminal (Figura 12) [173]. A diferencia de la mayoría de los RR no existe una sensor quinasa capaz de fosforilarlo, los dos dominios del regulador actúan de manera independiente y es capaz de unirse al DNA sin ser fosforilado, razón por la cual se considera un regulador de respuesta tipo “huérfano” [169,173].

Los intentos de deleccionar el gen o suprimir la expresión de la proteína han dado como resultado la muerte del microorganismo, lo que demuestra su esencialidad, y dado que se trata de una proteína altamente conservada únicamente en el género *Epsilonproteobacteria*, resulta un candidato ideal como nueva diana terapéutica [168,169]. De forma similar a ArsR, el regulador de respuesta HsrA

ha sido utilizado por primera vez por nuestro grupo de investigación como diana terapéutica en la búsqueda de nuevos antimicrobianos frente a *H. pylori* [174,175].



Figura 12. Modelo de la estructura tridimensional de un dímero del regulador HsrA unido a la secuencia de DNA de un promotor diana, donde se muestran los dominios N-terminal de dimerización, y los dominios C-terminal de unión al DNA. Tomado de Hong, E. *et al*; Journal of Biological Chemistry. 2007;282(28):20667–75 [173].

1.4. Antecedentes

Desde hace 4 años, el grupo de Investigación Traslacional en Patologías Digestivas del Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS Aragón), viene trabajando en la identificación y evaluación básica y preclínica de potenciales nuevas drogas antimicrobianas dirigidas contra reguladores transcripcionales esenciales de *H. pylori*. Nuestro equipo constituye el primer grupo de investigación en el mundo que ha utilizado y validado con éxito a los reguladores de respuesta HsrA y ArsR como nuevas dianas terapéuticas frente a la infección por *H. pylori*.

Para el descubrimiento de nuevos antimicrobianos frente a *H. pylori*, el grupo de Patología Digestiva está siguiendo dos estrategias: (1) reposicionamiento de fármacos y (2) descubrimiento por desarrollo *de novo*. Cabe destacar que el desarrollo de nuevos compuestos farmacológicos y su comercialización, conocido como descubrimiento *de novo*, es un proceso largo y costoso, con requerimientos regulatorios cada vez más exigentes y un elevado riesgo de fracaso; todo lo cual hace de ello una opción carente de interés para los inversores de la industria farmacéutica. El descubrimiento *de novo* y el desarrollo de nuevos antimicrobianos para uso en humanos puede

llevar de 10 a 17 años desde la idea hasta la salida al mercado y costar entre 2 y 3 mil millones de dólares de media, con una probabilidad de éxito inferior al 10%. En la actualidad, el reposicionamiento de fármacos constituye una alternativa válida para el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas efectivas. Esta estrategia, que consiste en el descubrimiento de nuevos usos terapéuticos en medicamentos previamente aprobados para otras indicaciones clínicas, puede minimizar significativamente los costes y riesgos asociados a los programas de desarrollo de fármacos, acelerando la disponibilidad de nuevas terapias para pacientes con infecciones refractarias o enfermedades infecciosas emergentes. El reposicionamiento de fármacos se ha convertido en una estrategia exitosa para la obtención rápida de agentes terapéuticos frente a numerosas enfermedades emergentes o raras, como enfermedades de transmisión sexual (ETSs), Alzheimer y cáncer. Esta vía de obtención de nuevos fármacos disminuye los costes de I+D, debido a que varias de las fases de investigación necesarias para el descubrimiento y desarrollo de fármacos por vía *de novo* pueden sortearse, al haber pasado los candidatos al reposicionamiento muchas de estas fases durante su desarrollo para la indicación terapéutica original. En tal sentido, llevar un fármaco reposicionado al mercado puede costar de media unos 300 millones de dólares y alrededor de 6,5 años.

Teniendo en cuenta este hecho, la primera estrategia del grupo de Patología Digestiva en la búsqueda de nuevos fármacos frente a *H. pylori* consistió en el cribado masivo (HTH, del inglés High-Throughput Screening) de la quimioteca Prestwick, una colección de 1120 fármacos de bajo peso molecular, aprobados por la FDA y libres de patentes; para identificar moléculas que se unan específicamente a nuestra diana, el regulador transcripcional HsrA de *H. pylori*, y potencialmente inhiban su función biológica esencial. Para el cribado se empleó la técnica del desplazamiento de la temperatura media de desnaturalización (T_m) (Figura 13). Mediante este método, cualquier compuesto de la quimioteca que se una preferentemente a la conformación nativa de HsrA y forme un complejo estable, aumentará su estabilidad conformacional y causará un desplazamiento de la curva de desnaturalización de la proteína hacia temperaturas superiores, debido al incremento de la T_m del complejo proteína-ligando respecto a la proteína sola. Para minimizar la identificación de falsos positivos, definimos como compuestos relevantes aquellos que incrementaban la estabilidad térmica de HsrA en más de dos veces la desviación estándar (SD) del valor de la T_m media en los controles (proteína + DMSO). Siguiendo este criterio de selección, nuestro HTS identificó 14 compuestos de la colección de 1120 de fármacos (1,25%) como ligandos de HsrA. A pesar de la gran heterogeneidad química de los ligandos identificados mediante esta aproximación, se encontraron dos clases predominantes de compuestos aprobados por la FDA con

capacidad de unión a HsrA: (1) flavonoides naturales y (2) 1,4-dihidropiridinas (DHP), un grupo de fármacos antihipertensivos.

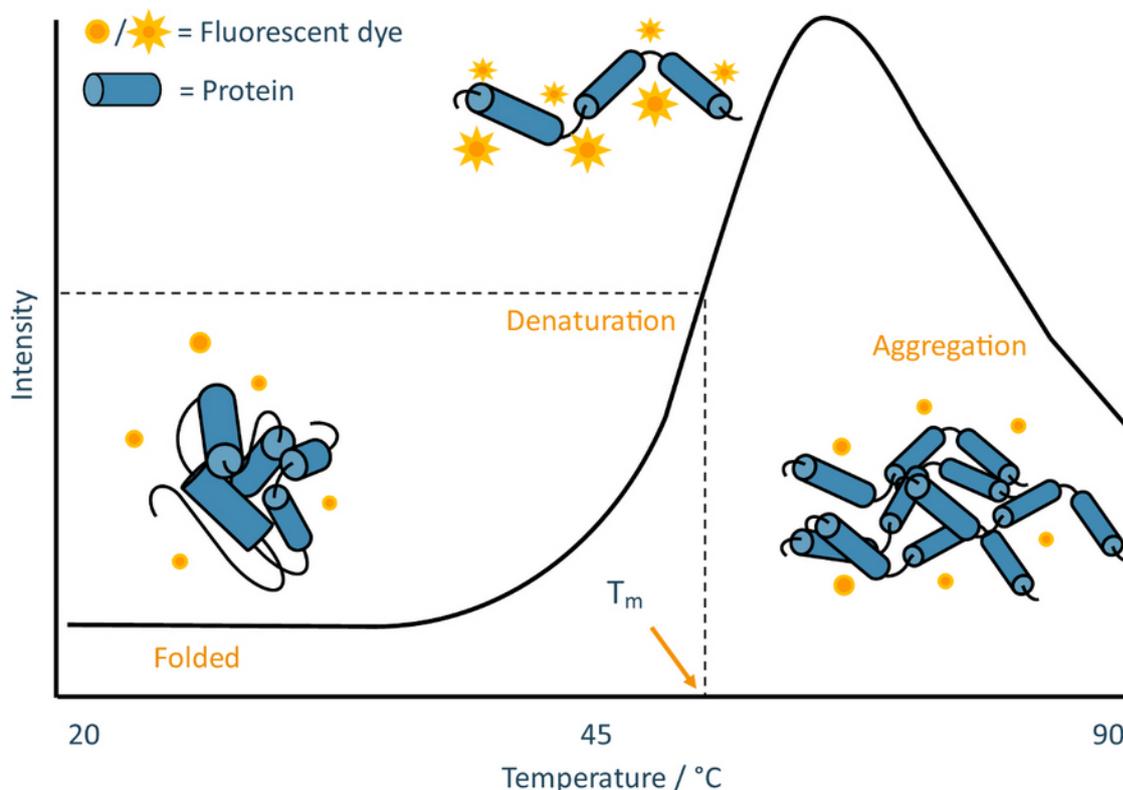


Figura 13. Curva de desnaturalización de una proteína con ayuda de una sonda hidrofóbica para la estimación de la temperatura media de desnaturalización. Tomado de Bruce D. *et al.* JoVE. 2019;(144):e58666 [186]

Una vez identificados los ligandos de HsrA, se analizó su potencial capacidad para inhibir la actividad biológica esencial del regulador de respuesta mediante ensayos de retardo en gel (EMSA). Aquellos ligandos de HsrA que inhibieron totalmente la capacidad de unión de HsrA a su DNA diana a concentraciones ≤ 2 mM fueron considerados inhibidores de HsrA. La actividad antimicrobiana de estos inhibidores de HsrA fue evaluada frente a diferentes cepas de *H. pylori* mediante diversas técnicas, incluyendo la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima bactericida (CMB), ensayos de cinética de muerte y ensayos de sinergismo o “tablero de ajedrez”. Teniendo en cuenta los valores sugeridos por el Comité Europeo de Ensayos de Susceptibilidad a Antimicrobianos (EUCAST) para los antibióticos convencionales empleados tradicionalmente en terapias anti-*H. pylori* (ej. se consideran cepas sensibles a metronidazol aquellas que muestran una CMI ≤ 8 mg/L), hemos considerado una CMI = 8 mg/L como valor de corte para definir como “potente” la actividad bactericida en nuestros potenciales fármacos anti-*H. pylori*. De acuerdo con este criterio, varias pequeñas moléculas

aprobadas por la FDA, sin un uso terapéutico como antimicrobianos, mostraron una potente actividad bactericida ($CMI \leq 8 \text{ mg/L}$) frente a diferentes cepas de *H. pylori*, incluyendo cepas resistentes a claritromicina y metronidazol [174,175].

En algunos casos, estos potenciales nuevos fármacos anti-*H. pylori* demostraron además una fuerte actividad bactericida sinérgica cuando se emplearon en combinación con antibióticos convencionales, como claritromicina o metronidazol. La sinergia con los antibióticos convencionales es una cualidad altamente deseada para las nuevas clases de antimicrobianos frente a *H. pylori*, dado que estos compuestos podrían actuar como adyuvantes en terapias combinatorias y revertir la resistencia frente a los antibióticos convencionales. De esta forma, la inclusión de nuevos antimicrobianos, seguros y altamente bactericidas, que además incrementan la actividad antimicrobiana de otros componentes de las terapias combinatorias, podrían suponer una estrategia prometedora para tratamientos personalizados frente a infecciones refractarias por *H. pylori*.

La interacción molecular entre HsrA y sus inhibidores con capacidad bactericida ha sido analizada tanto por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) como por acoplamiento molecular, con el objetivo de determinar los parámetros termodinámicos de la interacción y estimar la conformación de los complejos HsrA-inhibidor. En todos los casos estudiados hasta el momento, las pequeñas moléculas inhibitorias se unen a HsrA con una constante de disociación en el rango micromolar y muestran una estequiometría 1:1, es decir, una molécula de inhibidor por cada monómero de HsrA. Las interacciones ocurren preferentemente en el dominio efector C-terminal del regulador transcripcional. Los inhibidores interaccionan con residuos directamente involucrados con el motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión al DNA y/o con otros residuos cercanos, presumiblemente esenciales para la estabilización del dominio efector.

Hasta la fecha, solo se ha llevado a cabo un experimento de eficacia preclínica en modelo animal. En este ensayo, varios grupos de ratones fueron infectados con *H. pylori* y 4 semanas después de la infección se trataron oralmente con 100 mg/kg/día de una formulación comercial de dos DHPs (tabletas orales, STADA S.L.): Nimodipino o Nitrendipino, en combinación con omeprazol (140 mg/kg/día), durante 7 días. Adicionalmente, se incluyeron dos grupos control, uno de animales no infectados y otro de animales infectados con *H. pylori*, pero no tratados. Ambos grupos control recibieron omeprazol (140 mg/kg/día) durante 7 días. Un mes después de la finalización de los tratamientos, todos los animales fueron sacrificados y se cuantificó la colonización de *H. pylori* en el estómago de todos los animales.

Ambas terapias antimicrobianas con DHPs comerciales disminuyeron significativamente la colonización de *H. pylori* en el estómago de los ratones en comparación con los animales sin tratar, según los resultados obtenidos mediante dos técnicas diferentes: (1) conteo de bacterias en

biopsias estomacales (UFC/mg de estómago) y (2) PCR cuantitativa (número de bacterias por cada 10.000 células murinas).

Empleando el regulador de respuesta ArsR como diana terapéutica se obtuvieron resultados similares a los anteriores. El cribado masivo de la quimioteca Prestwick mediante el ensayo de desplazamiento de la T_m nos permitió identificar 10 pequeñas moléculas de entre los 1120 compuestos de la colección (0,9%), que actuaban como ligandos de ArsR. Solo 4 de estos compuestos (tiratricol, yoduro de propidio, ácido litocólico y lorglumida), inhibieron notablemente la capacidad de unión al DNA de ArsR, bloqueando completamente la actividad biológica de 3 μ M de proteína con 1 mM de compuesto. Únicamente dos de los inhibidores de ArsR identificados en este estudio (yoduro de propidio y ácido litocólico), demostraron una moderada actividad bactericida frente a *H. pylori*, con un valor de CMI/CMB en el rango de 16-32 mg/L. Sin embargo, estos dos inhibidores de ArsR resultaron ser más eficaces que el metronidazol y la claritromicina frente a las respectivas cepas resistentes. Adicionalmente, el ácido litocólico (ALC), un ácido biliar secundario, mostró un rápido efecto bactericida frente a *H. pylori*, matando $\sim 10^6$ CFU/mL de la cepa ATCC 700684 resistente a claritromicina tras solo 2 horas de exposición a una concentración de compuesto 2 veces superior a su CMI. A esta misma concentración, el efecto bactericida del ALC sobre algunos microorganismos representativos de la microbiota humana como *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis* fue irrelevante, indicando un mecanismo de acción específico sobre *H. pylori* y garantizando unos efectos secundarios mínimos en su uso como potencial nuevo antimicrobiano [176].

Además de la identificación de nuevos antimicrobianos mediante el reposicionamiento de fármacos, en nuestra línea de investigación también buscamos potenciales nuevos antimicrobianos por vía *de novo* frente a *H. pylori*. Para este fin, se realiza el cribado de quimiotecas comerciales formadas por miles de compuestos de bajo peso molecular, sin caracterizar y de naturaleza química diversa, que todavía no han sido aprobados para su uso en humanos. El cribado de la quimioteca HitFinder de 10.000 compuestos (Maybridge, Thermo Fisher Scientific), para la identificación de pequeñas moléculas que se unieran de forma específica a HsrA y potencialmente inhibieran su función esencial permitió descubrir al menos 35 compuestos (0,35% de la quimioteca) que se unían a la conformación nativa de HsrA e incrementaban notablemente su estabilidad conformacional, provocando un aumento de $\geq 3^\circ\text{C}$ en la T_m del complejo proteína-ligando. El análisis de la actividad antimicrobiana de 15 de estos 35 ligandos sobre HsrA mediante EMSA demostró que 9 ligandos de HsrA inhibían totalmente la actividad de unión de HsrA a su DNA diana a concentraciones ≤ 2 mM de compuesto.

Al menos cinco de estos nuevos inhibidores de HsrA exhibieron una potente actividad anti-*H. pylori*, con valores de CMI ≤ 1 mg/L. Uno de estos compuesto exhibió un valor de CMI similar a la claritromicina frente a *H. pylori* (CMI = 0,032 mg/L), demostrando además una potente actividad antimicrobiana frente a *Campylobacter jejuni*, otro patógeno clínicamente relevante de la clase *Epsilonproteobacteria*. Sin embargo, la molécula apenas era activa (CMI > 64 mg/L) frente a miembros principales de la microbiota normal humana (*E. coli* y *S. epidermidis*), lo que sugiere un reducido nivel de efectos secundarios indeseados.

En el presente trabajo continuamos con la identificación de nuevos compuestos antimicrobianos frente a *H. pylori* por vía *de novo*, caracterizando la actividad inhibitoria sobre HsrA y la capacidad antimicrobiana frente a *H. pylori* de ligandos de HsrA procedentes de la quimioteca HitFinder

2. OBJETIVOS

Objetivo General

Avanzar en la identificación y evaluación de nuevos compuestos antimicrobianos frente a *Helicobacter pylori*, empleando como diana terapéutica el regulador de respuesta HsrA.

Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad inhibitoria de ligandos de HsrA sobre la actividad biológica *in vitro* del regulador transcripcional.
2. Predecir el sitio de interacción de los inhibidores de HsrA en la estructura proteica.
3. Estimar la actividad antimicrobiana de los inhibidores de HsrA sobre diferentes cepas de *H. pylori*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de referencia de *H. pylori* ATCC 700392, ATCC 700684 (resistente a claritromicina) y ATCC 43504 (resistente a metronidazol) fueron adquiridas de la American Type Culture Collection. (Rockville, MD, EE.UU.) para los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro*. Estas cepas fueron cultivadas en condiciones de microaerobiosis (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂) a 37 °C durante 48-72h en medio Agar Sangre Base N°2 (OXOID, Reino Unido) suplementado con un 8% de sangre desfibrinada de caballo (OXOID) o en caldo infusión sangre-corazón (OXOID) suplementado con un 4% de suero fetal bovino (Gibco), dependiendo del ensayo.

Para la expresión recombinante del regulador de respuesta HsrA se empleó la cepa de *Escherichia coli* BL21 (EMD Bioscience), crecida en medio LB bajo condiciones aeróbicas (200 rpm y 37 °C).

3.2. Compuestos químicos

Los 20 compuestos de interés provenientes de la quimioteca HitFinder (Maybridge) fueron adquiridos a la compañía Maybridge (Thermo Fisher, UK). Estos compuestos se prepararon a una concentración final de 10,24 mg/ml en DMSO al 100%, conservándose a -20 °C protegidos de la luz por no más de 3 meses. Los antibióticos metronidazol, claritromicina y ampicilina fueron adquiridos en Sigma (Merck, EE.UU.)

3.3. Expresión recombinante y purificación del regulador de respuesta HsrA

La secuencia completa del gen *hsrA* (*hp1043*) se amplificó mediante la técnica de PCR (la secuencia de los cebadores se incluye en el Anexo I) a partir del genoma de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392). El producto de amplificación fue digerido con las enzimas de restricción NdeI y HindIII (Fermentas, EE.UU.) e insertado en el vector pET-28a (Novagen). Este vector permite la expresión de altas concentraciones de proteína recombinante con una cola de poli-His, lo cual facilita la posterior purificación mediante cromatografía de unión a metales divalentes (IMAC) (Anexo II, Figura II.1.). El vector con el inserto fue clonado en *E. coli* BL21 (DE3), dejándose crecer hasta la fase logarítmica tardía ($DO_{600} = 0,6-0,8$) en caldo Luria Bertani (LB) con 50 µg/mL de kanamicina (para la selección positiva de las bacterias que han incorporado el vector pET28-a con éxito), a 37 °C y con agitación vigorosa. En ese momento, se indujo la expresión de *hsrA* mediante la adición de 1 mM IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) (Anexo II, Figura II.2.) y se incubó durante 6h adicionales. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, lavándose con *Buffer* PBS frío (155 mM NaCl, 1 mM KH₂PO₄, 3 mM Na₂HPO₄-7H₂O, pH 7,4) y conservándolas a -20 °C.

Para la purificación de la proteína HsrA recombinante, las células se resuspendieron en *Buffer* de lisis frío (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo y pH 8), sonicándolas en un baño de hielo durante 10 ciclos de 30 segundos de exposición seguidos de otros 30 segundos de reposo para enfriar. El extracto crudo resultante se centrifugó dos veces a 15.000 rpm, durante 20 minutos a 4 °C, para eliminar los restos celulares y detritos. La proteína HsrA recombinante con la cola de histidina se purificó por medio de una cromatografía de afinidad con metales inmovilizados, empleando la resina comercial Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, EE.UU.) cargada con Ni²⁺. La proteína fijada a la matriz mediante la interacción entre la cola His-tag y el Ni²⁺ se eluyó aplicando un gradiente de imidazol desde 10 mM hasta 1M, dializando finalmente el eluido en *Buffer* de conservación (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10% v/v glicerol, pH 8). Una vez purificada se determinó la concentración de HsrA con el kit comercial BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific) y se eliminó la cola de histidina tratando la proteína

con 10U de trombina (GE Healthcare, EE.UU.) por cada mg de proteína durante toda la noche. La proteína pura sin His-tag fue obtenida mediante una segunda etapa de purificación en columna de afinidad IMAC-Ni²⁺ y conservada en *Buffer* de conservación a -20 °C hasta su uso.

3.4. Ensayo de retardo en gel (EMSA)

3.4.1. Síntesis y purificación de fragmentos de DNA

Para los ensayos de retardo en gel se sintetizaron dos fragmentos de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el promotor del gen *porG* de *H. pylori* 26695 como secuencia diana de la proteína HsrA y un fragmento de 150 kb del gen *pkn22* de *Anabaena sp.* PCC1720 empleado como DNA inespecífico, que actúa como DNA competidor en el ensayo. La secuencia de los cebadores para la síntesis de ambos fragmentos de DNA está descrita en el Anexo I.

Para la síntesis de los fragmentos de DNA se prepararon 250 µl de mezcla para cada uno, con una composición de *Reaction Buffer* 1X (7,5 mM Tris-HCl, 5 mM KCl, 2 mM sulfato de amonio, pH 9), 1,5 µM MgCl₂, 200 nM de cada cebador (directo y reverso), 200 µM de dNTPs, 2 ng/ml de DNA genómico (de *H. pylori* 26695 para *PporG* y de *Anabaena sp.* PCC 7120 para *pkn22*) y 5U de enzima Taq polimerasa (Biotools, España). El DNA fue amplificado mediante 30 ciclos de: 30 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de hibridación (a 56 °C en el caso *PporG* y 54 °C en el de *pkn22*) y 45 segundos a 72 °C para la extensión; con una etapa inicial de desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos antes del primer ciclo y una etapa final de extensión después del último ciclo durante otros 5 minutos a 72 °C. Con el objetivo de determinar la especificidad y rendimiento de la reacción se procedió a realizar una separación en gel de agarosa al 1% (m/v) con Bromuro de Etidio al 1% (v/v). El gel se dejó correr durante 30 minutos a 90V sumergido en 50 ml de *Buffer* TBE 1X (90 mM Tris-HCl, 90 mM, 90 mM H₂BO₃, 2 mM EDTA y pH 8). La electroforesis fue analizada mediante GelDoc 2000 Image Analyzer (BioRad, España). Para la purificación de los fragmentos de DNA se empleó el kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante. La concentración final de DNA se determinó con ayuda de NanoVue (GE Healthcare).

3.4.2. Estimación de la actividad in vitro de HsrA recombinante mediante EMSA

Dado que la proteína HsrA actúa como un regulador transcripcional, la forma de estimar su actividad biológica *in vitro* consiste en medir su capacidad de unión específica a promotores de genes diana mediante ensayos de retardo en gel (EMSA). Como DNA diana se empleó el promotor del gen *porG* de *H. pylori*, que codifica para la enzima piruvato:ferredoxina oxidorreductasa. Estudios previo han demostrado que *porG* es regulado por HsrA [177].

Tras la purificación de la proteína HsrA recombinante se realizó una titulación de su actividad *in vitro* para comprobar su actividad biológica y determinar así la concentración óptima a emplear en los ensayos de inhibición. La concentración óptima de la proteína en el ensayo será aquella que logre unir todo el DNA diana en un complejo DNA-regulador y a la vez no interactúe inespecíficamente con el DNA competidor. Para titular la actividad de la proteína se prepararon mezclas de reacción conteniendo 120 ng de cada fragmento de DNA en *Buffer* de muestra (10 mM bis-Tris, 40 mM KCl, 1 mM DTT, 100 mg/l BSA, 10% v/v glicerol, pH 7,5), las cuales se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min en ausencia (DNA libre como control negativo) y en presencia de concentraciones crecientes de HsrA recombinante (2-7 μ M). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió un 10% (v/v) de *Buffer* de carga (25 mM Tris, 190 mM Glicina, 50% v/v glicerol y 0,002 % de azul de bromofenol) a cada muestra, cargándose en un gel de agarosa al 8% (m/v) y corriendo a 90V durante 180 minutos a 4°C. Los geles fueron tratados con SYBR Safe 10.000X (Invitrogen) durante 20 min a temperatura ambiente y analizados mediante GelDoc 2000 Image Analyzer (BioRad, España). La reacción positiva en el EMSA determina la formación de un complejo DNA-proteína que, por su mayor tamaño molecular, experimenta un retardo en la migración electroforética respecto al DNA libre (control)

3.4.3. Ensayos de inhibición de la actividad *in vitro* de HsrA

Una vez determinada la concentración de HsrA óptima a emplear en el EMSA se realizaron ensayos de inhibición de la actividad biológica *in vitro* en presencia de los compuestos de interés a concentraciones de 2 y 1 mM. Estos ensayos de retardo en gel se realizaron según el protocolo previamente descrito en el apartado 3.4.2., adicionando una cantidad fija de HsrA. Como controles se incluyeron una muestra sin proteína ni compuesto (DNA libre, control negativo) y otra muestra con proteína y un 10% DMSO en lugar de compuesto (control positivo) con el objetivo de corroborar que este no afecta a la capacidad de interacción de la proteína. Tras la incubación, las muestras fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 8% (m/v), tratadas con SYBR Safe 10.000X y analizadas mediante GelDock.

Se consideraron como inhibidores de HsrA aquellos compuestos que afectaron notablemente a la unión del regulador transcripcional con su DNA diana (*PporG*), al menos a 2 mM de concentración de compuesto. Aquellos compuestos cuya actividad inhibitoria sobre la unión de HsrA al DNA diana fue nula o muy ligera, con una concentración superior a 2 mM de compuesto, no fueron considerados inhibidores de HsrA.

3.5. Predicción del sitio de unión de los inhibidores de HsrA a la estructura proteica mediante acoplamiento (*docking*) molecular

El acoplamiento molecular se realizó con ayuda del software Autodock Vina 1.1.2 [178] para la predicción bioinformática del sitio de interacción más probable entre los compuestos con capacidad inhibitoria *in vitro* y su diana, la proteína HsrA.

La estructura tridimensional de los compuestos se tomó de la base de datos PubChem (convirtiendo la estructura después a formato pdb con la herramienta OpenBabel), a partir de la estructura 2D ya conocida que venía recogida dentro de la Quimioteca HitFinder en la página de la compañía Maybridge. La estructura tridimensional de la proteína HsrA de *H. pylori* (2HQR, modelo 1 y cadena A) se extrajo de la base de datos Protein Data Bank (PDB).

La proteína y los ligandos se prepararon con el programa Autodock Tools. Los enlaces rotables se establecieron como libres para las moléculas de compuestos y fijos para la proteína. Con el objetivo de estimar la energía de interacción de cada posición se realizó el acoplamiento con ayuda del software Autodock Vina, considerando como el modelo de unión proteína-ligando aquella posición que mostraba una menor energía de interacción (ΔG , kcal/mol). El modelo de unión se graficó mediante Pymol.

3.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

3.6.1 Preparación del inóculo estandarizado

Las cepas de *H. pylori* conservadas en medio BHI + 10% glicerol (v/v) a -80 °C, se sembraron por diseminación en medio Agar Sangre Base N°2 (OXOID, Reino Unido) suplementado con un 8% (v/v) de sangre desfibrinada de caballo (OXOID, Reino Unido). Las placas de agar sangre se incubaron en condiciones de microaerobiosis (85% N₂, 10% CO₂ y 5% O₂) durante 48 horas a 37 °C. Una vez el microorganismo había crecido se comprobó la pureza del cultivo, dada la uniformidad en la morfología de las colonias. A partir de este cultivo puro en agar sangre se recogió el crecimiento bacteriano con ayuda de un hisopo de algodón estéril y se resuspendió en caldo BHI + 4% de SFB. El crecimiento de dos placas de agar sangre se resuspendió completamente en 10 ml de medio BHI + Suero, se midió la absorbancia a 600 nm, empleando como blanco el propio medio BHI con suero y se ajustó la suspensión celular hasta obtener una absorbancia de 0,01 a 600 nm (lo que equivale aproximadamente a 10⁶ UFC/ml) [175]. La suspensión bacteriana así preparada constituye el inóculo estandarizado.

3.6.2. Inhibición del crecimiento

Para determinar la CMI de los compuestos de interés se emplearon placas de microtitulación estériles de fondo plano con tapa. A los pocillos de la primera columna se adicionaron 195 μ l de inóculo estandarizado y 100 μ l al resto de los pocillos de la placa. Los compuestos de interés, disueltos en DMSO 100% a una concentración de 10,24 mg/ml, se adicionaron a razón de 5 μ l a los pocillos de la primera columna para luego realizar diluciones dobles seriadas, abarcando para cada compuesto un rango de concentración final de 64 a 0,5 μ g/ml. Como controles se incluyeron DMSO en todos los ensayos, claritromicina en los ensayos con las cepas ATCC 700392 y ATCC 700684 y metronidazol en el ensayo con la cepa ATCC 43504. Las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones de microaerobiosis durante 48 °C.

3.6.3. Revelado y lectura de resultados

Una vez pasado ese tiempo se estimó visualmente el crecimiento bacteriano mediante colorimetría, adicionando a cada pocillo 30 ml de una solución estéril de resazurina a 0,1 mg/ml. Tras la adición de la resazurina, las placas se incubaron 6-8 h a 37 °C en microaerobiosis. La resazurina es un indicador del crecimiento bacteriano que cambia de color azul a rosado tras ser irreversiblemente reducido a resorufina. Se consideró como valor CMI la menor concentración de compuesto que inhibía completamente el crecimiento bacteriano, evidenciado visualmente por la ausencia en el cambio de color de la resazurina azul.

3.7. Concentración mínima bactericida (CMB)

Para determinar la CMB, se sembraron asépticamente 10 μ l del pocillo correspondiente al valor CMI, así como de los pocillos que contenían dos diluciones arriba y dos diluciones abajo del compuesto, en placas de Agar Sangre Base N°2 suplementado con un 8% (v/v) de sangre defibrinada de caballo. Una vez inoculadas las placas, se incubaron 72 horas a 37 °C en ambiente microaerobio, contabilizando las colonias obtenidas una vez pasado ese tiempo. Se consideró como CMB la concentración mínima de compuesto capaz de matar al 99,9% de las bacterias. Cada determinación se realizó por triplicado y al menos dos veces.

4. RESULTADOS

4.1. Capacidad inhibitoria de los ligandos de HsrA sobre la actividad biológica *in vitro* del regulador transcripcional

La proteína HsrA actúa como un regulador transcripcional, reconociendo y uniéndose a secuencias concretas en los promotores de sus genes diana para modular su expresión. Una de las formas de cuantificar la capacidad inhibitoria de los compuestos que se unen a la proteína es mediante la inhibición *in vitro* de la actividad biológica del regulador transcripcional en ensayos de retardo en gel (EMSA). En estos ensayos se enfrentan la proteína recombinante con un fragmento del promotor del gen diana, en un buffer específico y bajo unas condiciones optimizadas. Si la proteína es activa reconocerá la secuencia diana del promotor y formará un complejo DNA-proteína estable con un tamaño mayor que el de la secuencia de DNA libre. Si se somete la mezcla a una electroforesis nativa, el complejo DNA-proteína experimentará un retardo en la migración en comparación con el DNA libre. En tal sentido, si un compuesto inhibe la actividad *in vitro* del regulador transcripcional este ya no será capaz de interactuar con la secuencia diana y el complejo no se formará, observándose la migración correspondiente al DNA libre.

Previo a los estudios de inhibición, la proteína HsrA se expresó por vía recombinante y se purificó mediante cromatografía de unión a metales divalentes (IMAC), según los protocolos previamente descritos. Una vez escindida la cola de histidinas, se cuantificó la concentración de HsrA con ayuda del kit comercial BCA Protein Assay (ThermoFisher Scientific), determinándose así que la proteína recombinante se encontraba a 294 μM . La proteína fue conservada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un *Buffer* de conservación (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 8) hasta su empleo en los EMSAs.

Se evaluó la actividad *in vitro* de la proteína HsrA recombinante recién purificada para comprobar su actividad biológica y determinar la concentración de proteína que se debía emplear en los ensayos de inhibición. Para ello, se realizó un EMSA en el que se adicionaron concentraciones crecientes del regulador transcripcional, desde 0 hasta 7 μM , sobre una muestra con 130 ng del fragmento *PporG* (Figura 14). Se observó la aparición del complejo HsrA-*PporG* a partir de una concentración 4 μM de regulador transcripcional y la totalidad del promotor fue acomplejado a partir de 6 μM de proteína con las condiciones empleadas en el ensayo. Además, se incorporó el fragmento *pkn22*, el cual no contiene secuencias de reconocimiento específico para HsrA y por tanto no debe interactuar con él. Se comprobó que esta secuencia no era retardada a ninguna de las concentraciones de HsrA empleadas y por tanto no interactúan entre sí, lo que demuestra que

la unión con el promotor diana es completamente específica en todo el rango de concentraciones ensayadas.

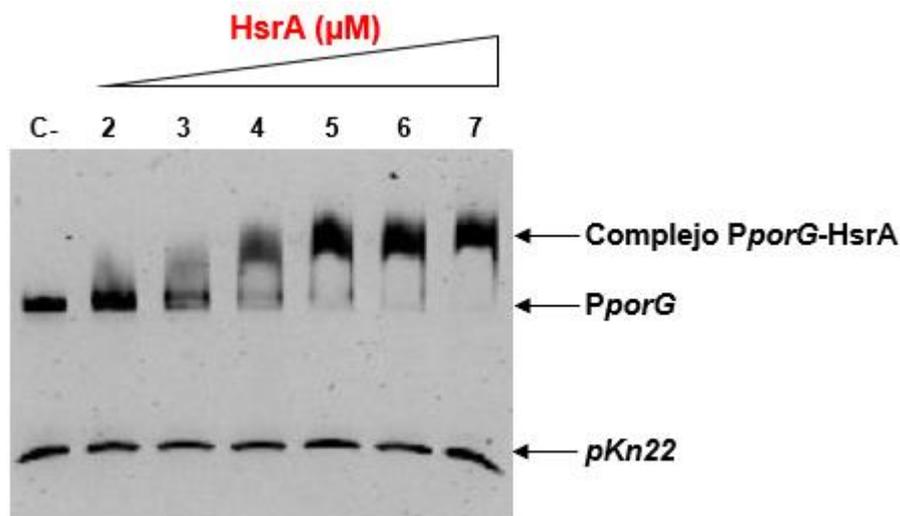


Figura 14. Estimación de la actividad biológica de la proteína HsrA recombinante mediante ensayo de retardo en gel frente al promotor específico *PporG*. En el primer carril se cargó DNA (120 ng) sin regulador como control negativo. En el resto de los pocillos se añadieron concentraciones crecientes de HsrA desde 2 hasta 7 μM . Además, se adicionaron 120 ng de un fragmento de 150 pb del gen *pKn22* de *Anabaena* sp. como DNA competidor en cada carril. En la imagen del gel teñido con SYBRSafe el color ha sido invertido para incrementar la sensibilidad de la detección.

Para los estudios posteriores de inhibición de la actividad biológica de HsrA en presencia de los compuestos de interés mediante EMSA, se seleccionó como concentración óptima de proteína la menor concentración que logró acomplejar totalmente el DNA diana, siendo en este caso 6 μM .

Se procedió a realizar los ensayos de inhibición de la actividad biológica *in vitro* de HsrA, enfrentando la proteína (6 μM) a dos concentraciones distintas (2 y 1 mM) de cada compuesto. De forma similar, se incluyeron como control negativo una muestra de DNA a la que no se adicionó proteína para determinar la migración del DNA libre y otro control positivo (se hizo interaccionar la proteína con su promotor diana en presencia de DMSO en lugar de compuesto) para determinar la migración del complejo DNA-proteína, además de comprobar que la proteína siguiese siendo activa en presencia de DMSO. Se demostró que los compuestos XVII, XVIII, XXVIII y XXXI lograban inhibir totalmente la actividad *in vitro* de HsrA a 1 mM de compuesto, mientras que los compuestos XXVI y XXX requerían 2 mM de concentración para una total inhibición.

De los 20 potenciales inhibidores de HsrA ensayados, solo 6 fueron considerados realmente inhibidores efectivos del regulador transcripcional, los compuestos XVII, XVIII, XXVI, XXVIII,

XXX y XXXI. Todas estas pequeñas moléculas inhibieron totalmente la actividad *in vitro* de HsrA en presencia de al menos 2 mM de compuesto (Figura 15).

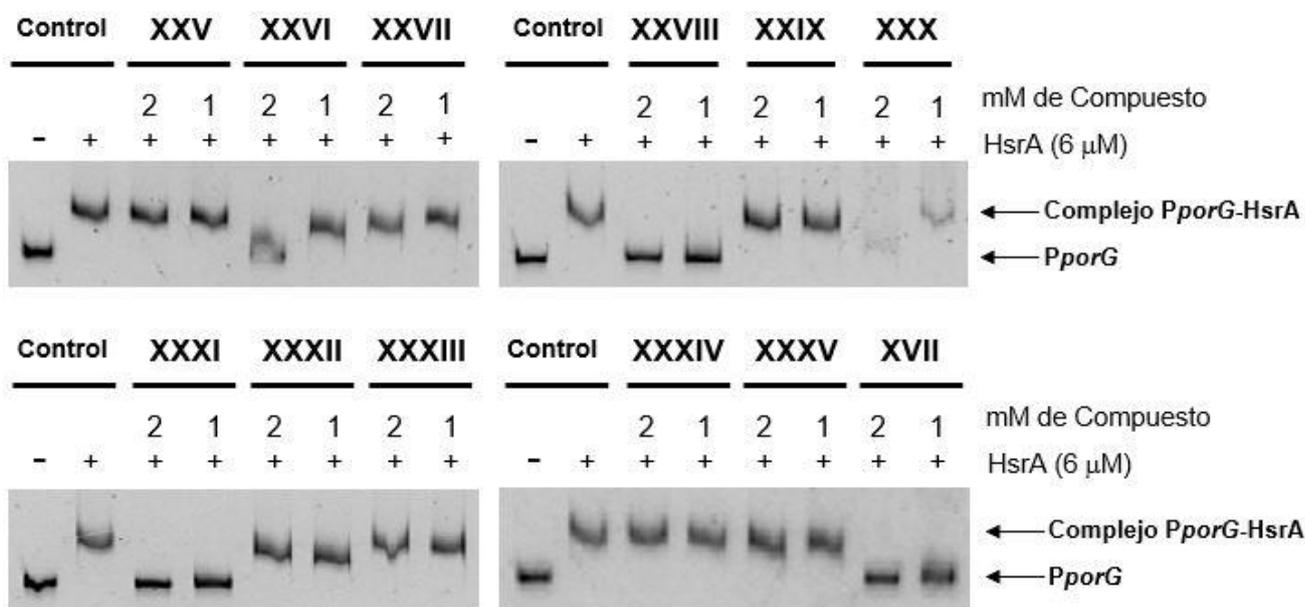


Figura 15. Ensayos de inhibición de la actividad biológica de HsrA mediante EMSA. Cada compuesto se enfrentó en una concentración de 2 y 1 mM con una mezcla de 6 μ M de HsrA recombinante y 120 ng de DNA diana (*PporG*). En todos los geles el primer carril corresponde al control negativo (DNA sin proteína) y el segundo carril al control positivo (DNA + HsrA en presencia de DMSO, el solvente de los compuestos). La posible inhibición de la interacción DNA-proteína por la acción de los compuestos se aprecia en los carriles 3-8. En las imágenes de los geles teñidos con SYBRSafe el color ha sido invertido con el objetivo de incrementar la sensibilidad de la detección. Solo se muestran las imágenes de los geles que incluían alguno de los compuestos con capacidad inhibitoria sobre la actividad *in vitro* de HsrA.

4.2. Predicción del sitio de interacción entre HsrA y sus inhibidores

Mediante el acoplamiento (*docking*) molecular se predijo la conformación de los complejos entre HsrA y sus inhibidores previamente identificados. La predicción bioinformática sugiere que todos los compuestos con capacidad inhibitoria sobre la actividad *in vitro* de HsrA forman un complejo con el regulador transcripcional uniéndose preferentemente con el dominio efector C-terminal. Como se observa en la Tabla 1, cuatro de los compuestos interaccionan directamente con residuos implicados en la estructura del motivo HTH de unión al DNA.

Los compuestos XXVIII y XXXI parecen unirse al regulador transcripcional preferiblemente en el pliegue formado entre el dominio de unión al DNA y el dominio regulador, pudiendo influir en la estabilidad del dominio efector (Figura 16); sin embargo, en ambos casos el tercer modelo de menor energía para estos compuestos también indica que la unión podría tener lugar en el motivo HTH, siendo la diferencia de energía con respecto al mejor modelo tan solo de 0,4 y 0,1 kcal/mol respectivamente

Tabla 1. Energía del sistema y residuos implicados en la interacción de los compuestos con su diana en los complejos HsrA-ligando, obtenidos mediante acoplamiento molecular.

Compuesto	ΔG (kcal/mol)	Residuos de interacción ^a
XVII	- 8,6	I123, I135, F149, L152, L155, M195, P198, L199 , T203
XVIII	- 6,8	P148, W173, V183, V186, A187 ,
XXVI	- 7,0	P148, W173, M178, V179, V183, A187, Q190, I191
XXVIII	- 7,6	N44, H66, S67, S68, E133, K145
XXX	- 8,5	L152, M195, P198, L199 , T203
XXXI	- 6,9	M40, H66, S68, E143, K145

^aLos residuos implicados en la estructura del motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión al DNA han sido resaltados en negra.

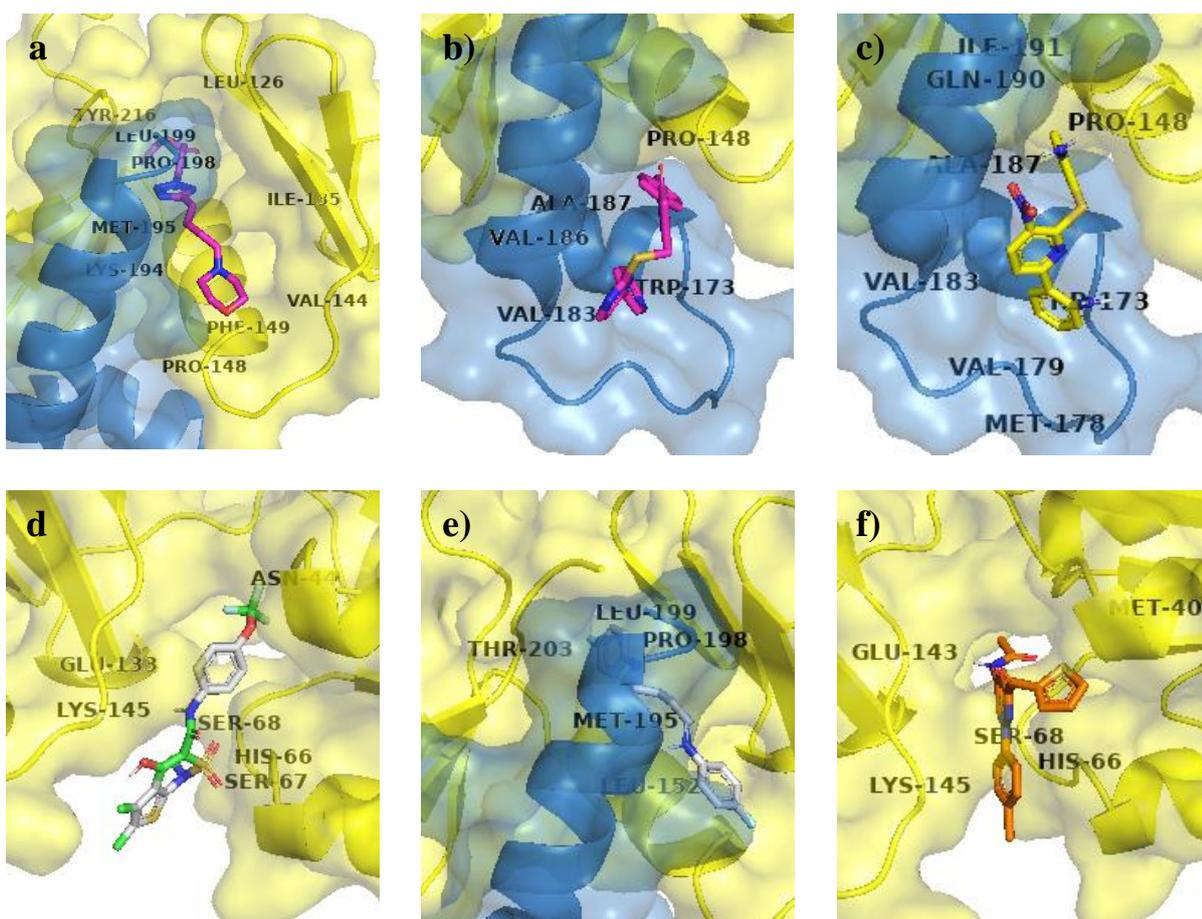


Figura 16. Modelos de interacción entre la proteína HsrA y sus inhibidores, obtenidos mediante acoplamiento molecular (*docking*). **a)** Compuesto XVII **b)** Compuesto XVIII **c)** Compuesto XXVI **d)** Compuesto XXVIII **e)** Compuesto XXX **f)** Compuesto XXXI. La estructura secundaria y la superficie de la proteína aparecen en amarillo, mientras que el motivo hélice-giro-hélice (HTH) está resaltado en azul. Se han destacado los residuos directamente implicados en la formación del complejo.

4.3. Los inhibidores de HsrA muestran una actividad bactericida variada frente a *H. pylori*

Se determinó la actividad antimicrobiana frente a *H. pylori* de los inhibidores de HsrA mediante el cálculo de la CMI y CMB. Teniendo en cuenta el valor de corte del antibiótico menos potente de los empleados contra *H. pylori* (metronidazol, resistencia a CMI > 8 mg/L), se consideraron compuestos altamente inhibitorios aquellos con un valor de CMI \leq 8 mg/L.

La CMI obtenida para los compuestos fue muy variada, pero en casi todos los casos su valor fue \geq 8 mg/L. De esta forma, en comparación con los antibióticos convencionales estos compuestos fueron en general menos efectivos, requiriendo concentraciones superiores a las de claritromicina y metronidazol para inhibir o matar al patógeno. Los compuestos XVIII, XXX y XXXI mostraron una baja actividad antimicrobiana frente a todas las cepas de *H. pylori* ensayadas, con un valor de CMI \geq 32 mg/L. La actividad antimicrobiana del compuesto XXVIII fue moderada, alcanzando valores de CMI \geq 16 mg/L. Solo 2 inhibidores de HsrA de los 6 evaluados, los compuestos XVII y XXVI, mostraron una alta actividad antimicrobiana frente a *H. pylori*, en especial el compuesto XVII, que evidenció valores de CMI \geq 1 mg/L en al menos una cepa de *H. pylori* (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de inhibidores de la proteína HsrA frente a diferentes cepas de *H. pylori*.

Compuesto	ATCC 700392		ATCC 700684 (Clr-R)		ATCC 43504 (Mtz-R)	
	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)	CMI (mg/L)	CMB (mg/L)
XVII	16	16	8	8	1	1
XVIII	>64	>64	32	32	32	32
XXVI	16	>64	8	8	8	8
XXVIII	32	64	32	16	16	16
XXX	32	64	32	32	32	32
XXXI	>64	>64	>64	>64	64	64
Claritromicina	<0,5	<0,5	4	4	-	-
Metronidazol	1	2	-	-	32	32

Clr-R: resistente a claritromicina, **Mtz-R:** resistente a metronidazol.

5. DISCUSIÓN

El aumento y acumulación de resistencias frente a todas las familias de antibióticos de uso actual por parte de la mayoría de los patógenos clínicamente relevantes supone un serio problema sanitario a nivel global. Con vistas a evadir los actuales mecanismos de resistencias, resulta imperativa la búsqueda y validación de nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de familias de antimicrobianos novedosas hacia las cuales no existan resistencias previas. Un grupo de biomoléculas bacterianas con gran potencialidad terapéutica lo constituyen los reguladores transcripcionales, no solo por su potencial carácter esencial para la fisiología de las bacterias sino además por los efectos pleiotrópicos letales que pueden derivar de su inhibición.

Nuestro grupo ha sido el primero en validar el uso del regulador de respuesta esencial HsrA de *H. pylori* como diana terapéutica para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos eficaces en el tratamiento de la infección por este patógeno. El presente trabajo parte de un estudio previo en el que se realizó el cribado masivo de la quimioteca comercial HitFinder (Maybridge, Reino Unido), compuesta por 10.000 moléculas de bajo peso molecular y naturaleza química diversa, a partir de la cual se identificaron 35 ligandos de la proteína HsrA. Todos los ligandos de HsrA identificados se unían preferiblemente a la estructura nativa de la proteína e incrementaban notablemente su estabilidad térmica, según el ensayo de desplazamiento de la T_m. En el presente trabajo se evaluó la capacidad inhibitoria sobre la actividad de unión al DNA del regulador HsrA para 20 de los 35 ligandos previamente identificados. Asimismo, se estudió el modelo de interacción de cada inhibidor con la proteína diana y se estimó la actividad antimicrobiana de estos potenciales nuevos fármacos sobre diferentes cepas de *H. pylori*, incluyendo cepas resistentes a los antibióticos de primera línea claritromicina y metronidazol.

Estudios de inhibición de la actividad de unión al DNA de la proteína HsrA mediante ensayos de retardo en gel (EMSA) permitieron demostrar que 6 de los 20 ligandos en estudio de HsrA inhibían totalmente la capacidad de interacción *in vitro* de la proteína con su DNA diana, a una concentración de al menos 2 mM. La capacidad inhibitoria sobre la actividad de HsrA de estos ligandos de la quimioteca HitFinder resulta similar a la observada en otras moléculas de bajo peso molecular provenientes de la quimioteca Prestwick, incluidos flavonoides y dihidropiridinas [174,175]. De los 6 nuevos inhibidores de HsrA, 4 compuestos (XVII, XVIII, XXVIII y XXXI) mostraron una total inhibición de la actividad *in vitro* de HsrA a una concentración de al menos 1 mM de inhibidor. No obstante, la mayoría de los ligandos de HsrA analizados (14 de 20) no mostraron una actividad inhibitoria relevante sobre la capacidad de unión al DNA de la proteína HsrA según los ensayos de EMSA. Este resultado podría esperarse si tenemos en cuenta que no todas las moléculas de bajo peso molecular que se unan de modo específico a la estructura nativa

de HsrA y actúen como ligandos tendrán la capacidad de inhibir su función biológica. Dada la aparente independencia en la actividad de los dos dominios estructurales de HsrA, el dominio N-terminal de dimerización (aminoácidos 1 al 119) y el dominio C-terminal de unión al DNA (aminoácidos 120 al 223) [173], cualquier ligando que se una a la estructura nativa de la proteína en su dominio N-terminal tendrá un efecto mínimo sobre la capacidad de unión al DNA de la proteína. De hecho, mutantes de delección del dominio N-terminal de HsrA son capaces de interactuar específicamente con el DNA diana [169].

Con el objetivo de predecir el posible mecanismo de acción por el cual los 6 nuevos inhibidores de HsrA identificados en este estudio son capaces de bloquear la actividad de unión al DNA del regulador transcripcional se realizó un análisis de acoplamiento (*docking*) molecular entre la proteína y cada uno de sus 6 inhibidores. Mediante estos estudios computacionales se considera como “modelo de interacción” aquella conformación u orientación (pose) del complejo proteína-ligando que muestre el menor valor de energía de interacción (ΔG , kcal/mol) y por tanto la mayor estabilidad del complejo. Los resultados obtenidos en las predicciones bioinformáticas sugieren que los 6 inhibidores de HsrA interactúan directamente con residuos aminoacídicos del dominio efector C-terminal. Cuatro de los 6 inhibidores interactúan con residuos directamente implicados en la estructura del motivo hélice-giro-hélice (HTH) de unión al DNA, el cual está conformado por los aminoácidos 165 al 199 de la proteína [173]. De esta forma, los inhibidores de HsrA analizados en el presente estudio parecen bloquear la actividad biológica de la proteína, ya sea por impedimento estérico entre el DNA y el motivo HTH o por desestabilización de la conformación biológicamente activa del dominio efector C-terminal. Otros modelos de interacción similares han sido propuestos para otros inhibidores de HsrA [174,175].

La actividad antimicrobiana de los 6 inhibidores de HsrA identificados en este estudio frente a tres cepas distintas de *H. pylori* fue variable. Solo dos de los compuestos inhibitorios de la actividad de HsrA (XVII y XXVI) demostraron una fuerte actividad antimicrobiana, incluso frente a cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina y metronidazol, con valores de CMI/CMB ≤ 8 mg/L. Esta actividad antimicrobiana está en el rango de lo evidenciado por antibióticos convencionales como el metronidazol sobre cepas consideradas sensibles [179]. Notablemente, el inhibidor con una mayor potencia bactericida frente a *H. pylori*, el compuesto XVII, fue capaz de inhibir totalmente la actividad biológica *in vitro* del regulador a la menor concentración ensayada en los estudios de EMSA, a 1 mM de inhibidor. Estudios posteriores deberán analizar la capacidad inhibitoria *in vitro* sobre la actividad de HsrA de menores concentraciones de cada uno de los inhibidores con actividad bactericida relevante.

Cabe destacar que los resultados de actividad antimicrobiana variables para los inhibidores de HsrA eran esperados si tenemos en cuenta que en los ensayos de CMI y CMB, la molécula de inhibidor debe penetrar la pared celular del microorganismo y mantener la suficiente estabilidad en el interior del citoplasma como para alcanzar a la diana, el regulador HsrA, unirse a ella de forma estable e inhibir su función biológica esencial. Tal y como se ha observado en otros inhibidores de reguladores transcripcionales [174], la hidrofobicidad de la molécula de inhibidor y su permeabilidad en la membrana plasmática de *H. pylori*, entre otros factores, influyen significativamente en la potencia antimicrobiana del inhibidor. De esta forma, no todos los inhibidores que logren bloquear de manera relevante la actividad biológica del regulador en los ensayos *in vitro* tendrán la capacidad de alcanzar la diana y ejercer una fuerte actividad antimicrobiana *in vivo*.

Debemos considerar además que aunque los inhibidores de HsrA identificados en el presente estudio logran bloquear efectivamente la actividad biológica esencial del regulador transcripcional *in vitro*, es posible que su efecto bactericida sobre el microorganismo no sea el resultado de un único mecanismo de acción, sino de un proceso multifactorial, donde el inhibidor no sólo ejerza su acción inhibiendo la actividad de HsrA sino que adicionalmente actúe sobre otras dianas esenciales de la bacteria, incluyendo enzimas, proteínas redox, transportadores de membrana, etc. Este efecto multifactorial sobre la viabilidad de *H. pylori* ha sido reconocido en otros inhibidores de HsrA como los flavonoides [175].

Como resultado del presente estudio se lograron identificar al menos 2 compuestos de bajo peso molecular pertenecientes a la quimioteca HitFinder, que actúan como ligandos del regulador transcripcional HsrA, inhiben notablemente su actividad biológica *in vitro* en ensayos de retardo en gel y exhiben una fuerte actividad antimicrobiana frente a cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos claritromicina y metronidazol. Estudios adicionales deberán llevarse a cabo con vistas a evaluar un potencial efecto sinérgico de estos nuevos inhibidores en combinación con antibióticos convencionales empleados en las terapias de primera línea frente a *H. pylori*. Los nuevos compuestos bactericidas identificados en este estudio aumentan la batería de potenciales nuevas herramientas terapéuticas a incorporar en terapias combinatorias personalizadas frente a infecciones refractarias causadas por cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos convencionales.

6. CONCLUSIONES

1. De los 20 compuestos con capacidad de unión al regulador transcripcional HsrA de *H. pylori* evaluados, se identificaron mediante ensayos de retardo en gel 6 ligandos que actuaban como inhibidores de la actividad biológica *in vitro* del regulador transcripcional a concentraciones iguales o inferiores a 2 mM.
2. De acuerdo con los resultados obtenidos por acoplamiento molecular, todos los inhibidores de HsrA identificados en este estudio se unen preferentemente al dominio efector de la proteína. La interacción de los inhibidores con la proteína ocurre en residuos aminoacídicos directamente implicados en la estructura del motivo HTH de unión al DNA o a otros residuos aparentemente esenciales para la estabilidad del dominio.
3. Al menos dos de los inhibidores de HsrA identificados mostraron una fuerte actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas de *H. pylori*, con valores de CMI y CMB ≤ 8 mg/L.

CONCLUSIONS

1. Out of the 20 compounds with binding capacity for the HsrA transcriptional regulator from *H. pylori*, 6 ligands were identified through electrophoretic mobility shift assays acting as inhibitors of the *in vitro* activity of this protein at concentrations equal to or lower than 2 mM.
2. According to the results obtained by molecular docking, all HsrA inhibitors identified in this study bound preferably to the effector domain of the protein. The interaction between the protein and its inhibitors occurs at aminoacidic residues directly involved in the HTH DNA-binding motif or at other residues apparently essential for the domain stability.
3. At least two HsrA inhibitors showed a high antimicrobial activity against different *H. pylori* strains, with MIC and MBC values ≤ 8 mg/L.

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

1. Determinar la cinética de muerte obtenida con diferentes dosis de los compuestos con fuerte actividad antimicrobiana sobre *H. pylori*.
2. Estudiar el posible efecto sinérgico *in vitro* entre los nuevos antimicrobianos y antibióticos convencionales frente a cepas resistentes de *H. pylori*.
3. Determinar la capacidad antimicrobiana cruzada de los compuestos anti-*H. pylori* de interés sobre microorganismos representativos de la microbiota normal humana, así como sobre otros miembros de importancia clínica de la clase ϵ -Proteobacteria (Ej: *Campylobacter jejuni*).
4. Evaluar la toxicidad *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (*Caenorhabditis elegans*, ratones) de los nuevos antimicrobianos. Determinar el Índice Terapéutico de estos compuestos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kusters JG, Van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Vol. 19, Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology (ASM); 2006. p. 449–90.
2. Solnick J V., Schauer DB. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Vol. 14, Clinical Microbiology Reviews. 2001. p. 59–97.
3. Solnick J V., Vandamme P. Taxonomy of the *Helicobacter* Genus. In: *Helicobacter pylori*. American Society of Microbiology; 2014. p. 39–51.
4. Zunke U, Eisenback JD. Morphology and ultrastructure. In: *The Cyst Nematodes*. Springer Netherlands; 1998. p. 31–56.
5. Costa K, Bacher G, Allmaier G, Dominguez-Bello MG, Engstrand L, Falk P, et al. The morphological transition of *Helicobacter pylori* cells from spiral to coccoid is preceded by a substantial modification of the cell wall. *Journal of Bacteriology*. 1999;181(12):3710–5.
6. Gu H. Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. Vol. 74, *Current Microbiology*. Springer New York LLC; 2017. p. 863–9.
7. Sarem M, Corti R. Role of *Helicobacter pylori* coccoid forms in infection and recrudescence. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*. 2016 Jan 1;39(1):28–35.
8. Sisto F, Brenciaglia MI, Scaltrito MM, Dubini F. *Helicobacter pylori*: ureA, cagA and vacA expression during conversion to the coccoid form. *International journal of antimicrobial agents*. 2000 Aug;15(4):277–82.
9. She FF, Su DH, Lin JY, Zhou LY. Virulence and potential pathogenicity of coccoid *Helicobacter pylori* induced by antibiotics. *World Journal of Gastroenterology*. 2001 Apr;7(2):254–8.
10. Cellini L. *Helicobacter pylori*: A chameleon-like approach to life. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(19):5575.
11. Cellini L, Grande R, Di Campli E, Traini T, Giulio M Di, Lannutti SN, et al. Dynamic colonization of *Helicobacter pylori* in human gastric mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2008;43(2):178–85.
12. Alonso M. Microbiological conditions for culturing *Helicobacter Pylori*. *Revista Colombiana de Gastroenterología*. 2013;28(2):94–9.
13. Blanchard TG, Nedrud JG. Laboratory Maintenance of *Helicobacter Species* . In: *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2006.
14. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Vol. 20, Clinical Microbiology Reviews. American Society for Microbiology Journals; 2007. p. 280–322.
15. Ndip RN, MacKay WG, Farthing MJG, Weaver LT. Culturing *Helicobacter pylori* from clinical specimens: Review of microbiologic methods. Vol. 36, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2003. p. 616–22.
16. Grove DI, McLeay RA, Byron KE, Koutsouridis G. Isolation of *Helicobacter pylori* after transport from a regional laboratory of gastric biopsy specimens in saline, Portagerm pylori or cultured on chocolate agar. *Pathology*. 2001 Aug;33(3):362–4.
17. Bessa LJ, Correia DM, Cellini L, Azevedo NF, Rocha I. Optimization of culture conditions

- to improve helicobacter pylori growth in ham's F-12 medium by response surface methodology. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*. 2012;25(4):901–9.
18. Tominaga K, Hamasaki N, Watanabe T, Uchida T, Fujiwara Y, Takaishi O, et al. Effect of culture conditions on morphological changes of *Helicobacter pylori*. *Journal of gastroenterology*. 1999;34 Suppl 11:28–31.
 19. Valenzuela-Valderrama M, Cerda-Opazo P, Backert S, González MF, Carrasco-Véliz N, Jorquera-Cordero C, et al. The *Helicobacter pylori* urease virulence factor is required for the induction of hypoxia-induced factor-1 α in gastric cells. *Cancers*. 2019;11(6).
 20. Bury-Moné S, Skouloubris S, Labigne A, De Reuse H. The *Helicobacter pylori* Urel protein: Role in adaptation to acidity and identification of residues essential for its activity and for acid activation. *Molecular Microbiology*. 2001 Nov;42(4):1021–34.
 21. Pflock M, Kennard S, Delany I, Scarlato V, Beier D. Acid-induced activation of the urease promoters is mediated directly by the ArsRS two-component system of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*. 2005;73(10):6437–45.
 22. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Lee A, Melchers K, Sachs G. Expression of the *Helicobacter pylori* ureI gene is required for acidic pH activation of cytoplasmic urease. *Infection and immunity*. 2000 Feb;68(2):470–7.
 23. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2002;123(1):187–95.
 24. Sachs G, Scott DR, Weeks DL, Rektorscheck M, Melchers K. Regulation of Urease for Acid Habitation. *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press; 2001.
 25. Sachs G, Scott D, Weeks D, Melchers K, Stingl K, Altendorf K, et al. The compartment buffered by the urease of *Helicobacter pylori*: Cytoplasm or periplasm? [1] (multiple letters). Vol. 10, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2002. p. 217–8.
 26. Stingl K, Altendorf K, Bakker EP. Acid survival of *Helicobacter pylori*: How does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? Vol. 10, *Trends in Microbiology*. Elsevier Current Trends; 2002. p. 70–4.
 27. Marcus EA, Moshfegh AP, Sachs G, Scott DR. The periplasmic α -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. *Journal of Bacteriology*. 2005 Jan;187(2):729–38.
 28. Ha NC, Oh ST, Sung JY, Cha KA, Lee MH, Oh BH. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural Biology*. 2001 Jun 1;8(6):505–9.
 29. Burne RA, Chen YYM. Bacterial ureases in infectious diseases. Vol. 2, *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS; 2000. p. 533–42.
 30. Nasrat AM, Nasrat SA. The Definitive Eradication of *Helicobacter pylori* from the Colon. *General Medicine: Open Access*. 2015;s1.
 31. Bruggink A, Roy PD. Industrial Synthesis of Semisynthetic Antibiotics. In: *Synthesis of β -Lactam Antibiotics*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2001. p. 12–54.
 32. Kuwahara H, Miyamoto Y, Akaike T, Kubota T, Sawa T, Okamoto S, et al. *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxyxynitrite via carbon dioxide production. *Infection and immunity*. 2000 Aug;68(8):4378–83.
 33. Noto JM, Peek RM. The *Helicobacter pylori* cag Pathogenicity Island. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). NIH Public Access; 2012. p. 41–50.

34. Odenbreit S, Püls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1497–500.
35. Naito M, Yamazaki T, Tsutsumi R, Higashi H, Onoe K, Yamazaki S, et al. Influence of EPIYA-Repeat Polymorphism on the Phosphorylation-Dependent Biological Activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Gastroenterology*. 2006 Apr;130(4):1181–90.
36. Tammer I, Brandt S, Hartig R, König W, Backert S. Activation of Abl by *Helicobacter pylori*: A Novel Kinase for CagA and Crucial Mediator of Host Cell Scattering. *Gastroenterology*. 2007 Apr 1;132(4):1309–19.
37. Selbach M, Moese S, Hurwitz R, Hauck CR, Meyer TF, Backert S. The *Helicobacter pylori* CagA protein induces cortactin dephosphorylation and actin rearrangement by c-Src inactivation. *The EMBO journal*. 2003 Feb 3;22(3):515–28.
38. Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Karlas A, Haimovich B, Backert S, et al. The *Helicobacter pylori* CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin. *Cellular Microbiology*. 2007 May;9(5):1148–61.
39. Poppe M, Feller SM, Römer G, Wessler S. Phosphorylation of *Helicobacter pylori* CagA by c-Abl leads to cell motility. *Oncogene*. 2007 May 24;26(24):3462–72.
40. Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity. *Nature*. 2007 May 17;447(7142):330–3.
41. Lu H, Murata-Kamiya N, Saito Y, Hatakeyama M. Role of partitioning-defective 1/microtubule affinity-regulating kinases in the morphogenetic activity of *Helicobacter pylori* CagA. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Aug 21;284(34):23024–36.
42. Churin Y, Al-Ghoul L, Kepp O, Meyer TF, Birchmeier W, Naumann M. *Helicobacter pylori* CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response. *Journal of Cell Biology*. 2003 Apr 28;161(2):249–55.
43. Lamb A, Yang XD, Tsang YHN, Li JD, Higashi H, Hatakeyama M, et al. *Helicobacter pylori* CagA activates NF- κ B by targeting TAK1 for TRAF6-mediated Lys 63 ubiquitination. *EMBO Reports*. 2009;10(11):1242–9.
44. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature Immunology*. 2004 Nov;5(11):1166–74.
45. Watanabe T, Asano N, Fichtner-Feigl S, Gorelick PL, Tsuji Y, Matsumoto Y, et al. NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling pathway. *Journal of Clinical Investigation*. 2010 May 3;120(5):1645–62.
46. Li Q, Liu J, Gong Y, Yuan Y. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks. Vol. 96, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2017.
47. Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. *Helicobacter*. 2006 Dec;11(6):574–80.
48. Day AS, Jones NL, Lynett JT, Jennings HA, Fallone CA, Beech R, et al. cagE Is a Virulence Factor Associated with *Helicobacter pylori* –Induced Duodenal Ulceration in Children . *The*

Journal of Infectious Diseases. 2000 Apr;181(4):1370–5.

49. Ramis IB, Vianna JS, da Silva LV, Von Groll A, da Silva PEA. CagE as a biomarker of the pathogenicity of *Helicobacter pylori*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2013 Mar;46(2):185–9.
50. Xu, Q, Morgan, RD, Roberts, JR, Xu, SY, van Doorn, LJ, Donahue, JO, Miller, GG, Blaser M. Functional analysis of iceA1, a CATG-recognizing restriction endonuclease gene in *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*. 2002;30(17):3839–47.
51. Huang X, Deng Z, Zhang Q, Li W, Wang B, Li M. Relationship between the iceA gene of *Helicobacter pylori* and clinical outcomes. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2016 Jul 6;12:1085–92.
52. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. Vol. 3, *Nature Reviews Microbiology*. 2005. p. 320–32.
53. Adrian M, Cover TL, Dubochet J, Heuser JE. Multiple oligomeric states of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin demonstrated by cryo-electron microscopy. *Journal of Molecular Biology*. 2002;318(1):121–33.
54. Nguyen VQ, Caprioli RM, Cover TL. Carboxy-terminal proteolytic processing of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Infection and Immunity*. 2001 Jan;69(1):543–6.
55. McClain MS, Beckett AC, Cover TL. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin and gastric cancer. Vol. 9, *Toxins*. MDPI AG; 2017.
56. McClain MS, Schraw W, Ricci V, Boquet P, Cover TL. Acid activation of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin (VacA) results in toxin internalization by eukaryotic cells. *Molecular Microbiology*. 2000 Jul;37(2):433–42.
57. Willhite DC, Blanke SR. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin enters cells, localizes to the mitochondria, and induces mitochondrial membrane permeability changes correlated to toxin channel activity. Vol. 6, *Cellular Microbiology*. 2004. p. 143–54.
58. Nakayama M, Kimura M, Wada A, Yahiro K, Ogushi KI, Niidome T, et al. *Helicobacter pylori* VacA Activates the p38/Activating Transcription Factor 2-mediated Signal Pathway in AZ-521 Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Feb 20;279(8):7024–8.
59. Papini E, Satin B, Norais N, De Bernard M, Telford JL, Rappuoli R, et al. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *Journal of Clinical Investigation*. 1998 Aug 15;102(4):813–20.
60. Wang F, Xia P, Wu F, Wang D, Wang W, Ward T, et al. *Helicobacter pylori* VacA disrupts apical membrane-cytoskeletal interactions in gastric parietal cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008 Sep 26;283(39):26714–25.
61. Boncristiano M, Paccani SR, Barone S, Ulivieri C, Patrussi L, Ilver D, et al. The *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin Inhibits T Cell Activation by Two Independent Mechanisms. *Journal of Experimental Medicine*. 2003 Dec 15;198(12):1887–97.
62. Molinari M, Salio M, Galli C, Norais N, Rappuoli R, Lanzavecchia A, et al. Selective inhibition of Ii-dependent antigen presentation by *Helicobacter pylori* toxin VacA. *Journal of Experimental Medicine*. 1998 Jan 5;187(1):135–40.
63. Torres VJ, VanCompernelle SE, Sundrud MS, Unutmaz D, Cover TL. *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin Inhibits Activation-Induced Proliferation of Human T and B Lymphocyte Subsets. *The Journal of Immunology*. 2007 Oct 15;179(8):5433–40.
64. Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. Vol. 7, *Nature*

Reviews Gastroenterology and Hepatology. NIH Public Access; 2010. p. 629–41.

65. Sheu BS, Sheu SM, Yang HB, Huang AH, Wu JJ. Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in babA2 genopositive infection. *Gut*. 2003 Jul 1;52(7):927–32.
66. Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. Vol. 14, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc; 2008. p. 4265–72.
67. Ansari S, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* BabA in adaptation for gastric colonization. Vol. 23, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited; 2017. p. 4158–69.
68. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y, Saito I, et al. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jul 15;286(28):25256–64.
69. Azevedo M, Eriksson S, Mendes N, Serpa J, Figueiredo C, Resende LP, et al. Infection by *Helicobacter pylori* expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype. *Journal of Pathology*. 2008 Jul;215(3):308–16.
70. Lu H, Hsu P-I, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2005 Apr;128(4):833–48.
71. Hussein NR, Argent RH, Marx CK, Patel SR, Robinson K, Atherton JC. *Helicobacter pylori* dupA Is Polymorphic, and Its Active Form Induces Proinflammatory Cytokine Secretion by Mononuclear Cells . *The Journal of Infectious Diseases*. 2010 Jul 15;202(2):261–9.
72. Lu H, Hsu PI, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2005;128(4):833–48.
73. Douraghi M, Mohammadi M, Oghalaie A, Abdirad A, Mohagheghi MA, Hosseini ME, et al. dupA as a risk determinant in *Helicobacter pylori* infection. *Journal of Medical Microbiology*. 2008 May;57(5):554–62.
74. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, dupA in China. *BMC Gastroenterology*. 2008 Oct 25;8.
75. Oleastro M, Ménard A. The role of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins in adherence and pathogenesis. Vol. 2, *Biology*. MDPI AG; 2013. p. 1110–34.
76. Posselt G, Backert S, Wessler S. The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. Vol. 11, *Cell Communication and Signaling*. Cell Communication and Signaling; 2013. p. 77.
77. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. OipA plays a role in *Helicobacter pylori*-induced focal adhesion kinase activation and cytoskeletal re-organization. *Cellular Microbiology*. 2008 Apr;10(4):1008–20.
78. Tabassam FH, Graham DY, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* activate epidermal growth factor receptor- and phosphatidylinositol 3-OH kinase-dependent Akt and glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. *Cellular Microbiology*. 2009 Jan;11(1):70–82.
79. Teymournejad O, Mobarez AM, Hassan ZM, Talebi Bezmin Abadi A. Binding of the *Helicobacter pylori* OipA causes apoptosis of host cells via modulation of Bax/Bcl-2 levels. *Scientific Reports*. 2017 Dec 1;7(1).
80. Yamaoka Y, Kudo T, Lu H, Casola A, Brasier AR, Graham DY. Role of Interferon-Stimulated Responsive Element-like Element in Interleukin-8 Promoter in *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*. 2004 Apr;126(4):1030–43.

81. Horridge DN, Begley AA, Kim J, Aravindan N, Fan K, Forsyth MH. Outer inflammatory protein a (OipA) of *Helicobacter pylori* is regulated by host cell contact and mediates CagA translocation and interleukin-8 response only in the presence of a functional cag pathogenicity island type IV secretion system. *Pathogens and Disease*. 2017 Nov 30;75(8).
82. Liu J, He C, Chen M, Wang Z, Xing C, Yuan Y. Association of presence/absence and on/off patterns of *Helicobacter pylori* oipA gene with peptic ulcer disease and gastric cancer risks: A meta-analysis. *BMC Infectious Diseases*. 2013 Nov 20;13(1).
83. Ben Mansour K, Fendri C, Zribi M, Masmoudi A, Labbene M, Fillali A, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, iceA and oipA genotypes in Tunisian patients. Vol. 9, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. BioMed Central; 2010. p. 10.
84. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. Vol. 39, *Biomedical Journal*. Elsevier B.V.; 2016. p. 14–23.
85. Wang G, Hong Y, Olczak A, Maier SE, Maier RJ. Dual roles of *Helicobacter pylori* NapA in inducing and combating oxidative stress. *Infection and Immunity*. 2006 Dec;74(12):6839–46.
86. Cooksley C, Jenks PJ, Green A, Cockayne A, Logan RPH, Hardie KR. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *Journal of Medical Microbiology*. 2003 Jun 1;52(6):461–9.
87. Liu J, Liu H, Zhang T, Ren X, Nadolny C, Dong X, et al. Serum *Helicobacter pylori* NapA antibody as a potential biomarker for gastric cancer. *Scientific Reports*. 2014 Feb;4(1):1–5.
88. Ricci V, Chiozzi V, Necchi V, Oldani A, Romano M, Solcia E, et al. Free-soluble and outer membrane vesicle-associated VacA from *Helicobacter pylori*: Two forms of release, a different activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005 Nov 11;337(1):173–8.
89. Parker H, Keenan JI. Composition and function of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles. Vol. 14, *Microbes and Infection*. Elsevier Masson; 2012. p. 9–16.
90. Lekmeechai S, Su YC, Brant M, Alvarado-Kristensson M, Vallström A, Obi I, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles protect the pathogen from reactive oxygen species of the respiratory burst. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Sep 7;9(SEP).
91. Chmiela M, Walczak N, Rudnicka K. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles involvement in the infection development and *Helicobacter pylori*-related diseases. Vol. 25, *Journal of Biomedical Science*. BioMed Central Ltd.; 2018.
92. Haurat MF, Aduse-Opoku J, Rangarajan M, Dorobantu L, Gray MR, Curtis MA, et al. Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Jan 14;286(2):1269–76.
93. McBroom AJ, Kuehn MJ. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*. 2007 Jan;63(2):545–58.
94. Mashburn LM, Whiteley M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*. 2005 Sep 15;437(7057):422–5.
95. Ismail S, Hampton MB, Keenan JI. *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles modulate proliferation and interleukin-8 production by gastric epithelial cells. *Infection and Immunity*. 2003 Oct 1;71(10):5670–5.
96. Mullaney E, Brown PA, Smith SM, Botting CH, Yamaoka YY, Terres AM, et al. Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen

- Helicobacter pylori*. Proteomics - Clinical Applications. 2009 Jul;3(7):785–96.
97. Olofsson A, Vallström A, Petzold K, Tegtmeyer N, Schleucher J, Carlsson S, et al. Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Molecular Microbiology*. 2010 Sep;77(6):1539–55.
 98. Heczko U, Smith VC, Mark Meloche R, Buchan AMJ, Finlay BB. Characteristics of *Helicobacter pylori* attachment to human primary antral epithelial cells. *Microbes and Infection*. 2000 Nov 1;2(14):1669–76.
 99. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, Suen MMY, Underwood FE, Tanyingoh D, et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017 Aug 1;153(2):420–9.
 100. Salih B. *Helicobacter pylori* infection in developing countries: The burden for how long? Vol. 15, *Saudi Journal of Gastroenterology*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2009. p. 201–7.
 101. Kienesberger S, Perez-Perez GI, Olivares AZ, Bardhan P, Sarker SA, Hasan KZ, et al. When is *Helicobacter pylori* acquired in populations in developing countries? A birth-cohort study in Bangladeshi children. *Gut Microbes*. 2018 May 4;9(3):252–63.
 102. Bui D, Brown HE, Harris RB, Oren E. Serologic evidence for fecal-oral transmission of *Helicobacter pylori*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016 Jan 1;94(1):82–8.
 103. Allaker RP, Young KA, Hardie JM, Domizio P, Meadows NJ. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: Evidence for possible oral-to-oral transmission. *Journal of Medical Microbiology*. 2002;51(4):312–7.
 104. Ahn HJ, Lee DS. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. 2015;7(12):455.
 105. Bornschein J, Malfertheiner P. Gastric carcinogenesis. Vol. 396, *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2011. p. 729–42.
 106. Mungazi SG, Chihaka OB, Muguti GI. Prevalence of *Helicobacter pylori* in asymptomatic patients at surgical outpatient department: Harare hospitals. *Annals of Medicine and Surgery*. 2018 Nov 1;35:153–7.
 107. Selgrad M, Kandulski A, Malfertheiner P. Dyspepsia and *Helicobacter pylori*. Vol. 26, *Digestive Diseases*. 2008. p. 210–4.
 108. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. Vol. 20, *World Journal of Gastroenterology*. WJG Press; 2014. p. 12781–808.
 109. Musumba C, Jorgensen A, Sutton L, Van Eker D, Moorcroft J, Hopkins M, et al. The relative contribution of NSAIDs and *Helicobacter pylori* to the aetiology of endoscopically-diagnosed peptic ulcer disease: Observations from a tertiary referral hospital in the UK between 2005 and 2010. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2012;36(1):48–56.
 110. Vaira D, Holton J, Miglioli M, Menegatti M, Mule P, Barbara L. Peptic ulcer disease and *Helicobacter pylori* infection. Vol. 10, *Current Opinion in Gastroenterology*. Lippincott Williams and Wilkins; 1994. p. 98–104.
 111. Xu S, Wan X, Zheng X, Zhou Y, Song Z, Cheng M, et al. Symptom improvement after *Helicobacter pylori* eradication in patients with functional dyspepsia-A multicenter, randomized, prospective cohort study. *International Journal of Clinical and Experimental*

- Medicine. 2013 Sep 30;6(9):747–56.
112. Shi J, Qu YP, Hou P. Pathogenetic mechanisms in gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology*. 2014 Oct 14;20(38):13804–19.
 113. Hu Q, Zhang Y, Zhang X, Fu K. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori* infection: A review of current diagnosis and management. Vol. 4, *Biomarker Research*. BioMed Central Ltd.; 2016. p. 15.
 114. Maeshima AM, Taniguchi H, Toyoda K, Yamauchi N, Makita S, Fukuhara S, et al. Clinicopathological features of histological transformation from extranodal marginal zone B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue to diffuse large B-cell lymphoma: an analysis of 467 patients. *British Journal of Haematology*. 2016 Sep 1;174(6):923–31.
 115. Salar A. Gastric MALT lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2019 Jan 18;152(2):65–71.
 116. Kuo SH, Yeh KH, Wu MS, Lin CW, Wei MF, Liou JM, et al. First-line antibiotic therapy in *Helicobacter pylori*-negative low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Scientific Reports*. 2017 Dec 1;7(1).
 117. Gasbarrini A, Carloni E, Gasbarrini G, Chisholm SA. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases - Other Helicobacters. Vol. 9, *Helicobacter*. 2004. p. 57–66.
 118. Chey WD, Leontiadis GI, Howden CW, Moss SF. ACG Clinical Guideline: Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *American Journal of Gastroenterology*. 2017 Feb 1;112(2):212–39.
 119. Fallone CA, Chiba N, van Zanten SV, Fischbach L, Gisbert JP, Hunt RH, et al. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults. *Gastroenterology*. 2016 Jul 1;151(1):51–69.e14.
 120. Graham DY, Shiotani A. New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. Vol. 5, *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*. NIH Public Access; 2008. p. 321–31.
 121. Gisbert JP, Molina-Infante J, Amador J, Bermejo F, Bujanda L, Calvet X, et al. IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Vol. 39, *Gastroenterología y Hepatología*. Ediciones Doyma, S.L.; 2016. p. 697–721.
 122. Ierardi E, Losurdo G, Fortezza RF La, Principi M, Barone M, Leo A Di. Optimizing proton pump inhibitors in *Helicobacter pylori* treatment: Old and new tricks to improve effectiveness. Vol. 25, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited; 2019. p. 5097–104.
 123. Scott DR, Sachs G, Marcus EA. The role of acid inhibition in *Helicobacter pylori* eradication. Vol. 5, *F1000Research*. Faculty of 1000 Ltd; 2016.
 124. Alkim H, Koksar AR, Boga S, Sen I, Alkim C. Role of bismuth in the eradication of *Helicobacter pylori*. *American Journal of Therapeutics*. 2016 Jan 21;24(6):E751–7.
 125. Ge R, Chen Z, Zhou Q. The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infections: An update. Vol. 4, *Metallomics*. 2012. p. 239–43.
 126. Pérez-Arellano E, Rodríguez-García MI, Galera Rodenas AB, de la Morena-Madrigal E. Eradication of *Helicobacter pylori* infection with a new bismuth-based quadruple therapy in clinical practice. *Gastroenterología y Hepatología (English Edition)*. 2018;41(3):145–52.
 127. Gaynor M, Mankin A. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2005 Mar 25;3(9):949–60.

128. Alarcón-Millán J, Fernández-Tilapa G, Cortés-Malagón EM, Castañón-Sánchez CA, De Sampedro-Reyes J, Cruz-del Carmen I, et al. Clarithromycin resistance and prevalence of *Helicobacter pylori* virulent genotypes in patients from Southern México with chronic gastritis. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016 Oct 1;44:190–8.
129. Marques AT, Vítor JMB, Santos A, Oleastro M, Vale FF. Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin : from phenotypic to genomic approaches. *Microbial Genomics*. 2020 Mar 2;6(3):e000344.
130. Hirata K, Suzuki H, Nishizawa T, Tsugawa H, Muraoka H, Saito Y, et al. Contribution of efflux pumps to clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2010 May;25(SUPPL. 1):S75–9.
131. Chua KYL. Metronidazole. In: Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition. CRC Press; 2017. p. 1807–49.
132. Francesco V De. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal . *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2011 Jun 15;2(3):35.
133. Dingsdag SA, Hunter N. Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(2):265–79.
134. Kwon DH, El-Zaatari FA, Kato M, Osato MS, Reddy R, Yamaoka Y, et al. Analysis of rdxA and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (FrxA) and ferredoxin-like protein (FdxB) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000 Aug;44(8):2133–42.
135. Tsugawa H, Suzuki H, Satoh K, Hirata K, Matsuzaki J, Saito Y, et al. Two Amino Acids Mutation of Ferric Uptake Regulator Determines *Helicobacter pylori* Resistance to Metronidazole. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011 Jan 1;14(1):15–23.
136. Van Amsterdam K, Bart A, Van Der Ende A. A *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005 Apr;49(4):1477–82.
137. Podder V, Sadiq NM. Levofloxacin. StatPearls. StatPearls Publishing; 2020.
138. Bogaerts P, Berhin C, Nizet H, Glupczynski Y. Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Helicobacter pylori* strains from patients living in Belgium. *Helicobacter*. 2006 Oct;11(5):441–5.
139. Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, et al. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007 Apr;29(4):389–96.
140. Kwon YH. Amoxicillin. In: *Helicobacter pylori*. Springer Singapore; 2016. p. 387–96.
141. Gerrits MM, Godoy APO, Kuipers EJ, Ribeiro ML, Stoof J, Mendonça S, et al. Multiple mutations in or adjacent to the conserved penicillin-binding protein motifs of the penicillin-binding protein 1A confer amoxicillin resistance to *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2006 Jun;11(3):181–7.
142. Tseng YS, Wu DC, Chang CY, Kuo CH, Yang YC, Jan CM, et al. Amoxicillin resistance with β -lactamase production in *Helicobacter pylori*. *European Journal of Clinical Investigation*. 2009 Sep;39(9):807–12.

143. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2001 Jun 1;65(2):232–60.
144. Lawson AJ, Elviss NC, Owen RJ. Real-time PCR detection and frequency of 16S rDNA mutations associated with resistance and reduced susceptibility to tetracycline in *Helicobacter pylori* from England and Wales. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005 Aug;56(2):282–6.
145. Zhang Z. Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*. 2010;16(10):1279.
146. Trieber CA, Burkhardt N, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent. *Biological Chemistry*. 1998;379(7):847–55.
147. Boyanova L, Hadzhiyski P, Kandilarov N, Markovska R, Mitov I. Multidrug resistance in *Helicobacter pylori*: current state and future directions. Vol. 12, *Expert Review of Clinical Pharmacology*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 909–15.
148. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(3):268–81.
149. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: causes and threats. *P & T journal*. 2015;40(4):277–83.
150. Norrby SR, Nord CE, Finch R, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *The Lancet Infectious diseases*. 2005 Feb;5(2):115–9.
151. González A, Fillat MF, Lanás Á. Transcriptional regulators: Valuable targets for novel antibacterial strategies. Vol. 10, *Future Medicinal Chemistry*. Future Medicine Ltd.; 2018. p. 541–60.
152. Hoffman SB. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 2001 May;23(5):464–72.
153. C Reygaert W. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*. 2018;4(3):482–501.
154. Vila J, Sánchez-Céspedes J, Giralt E. Old and new strategies for the discovery of antibacterial agents. Vol. 4, *Current Medicinal Chemistry: Anti-Infective Agents*. 2005. p. 337–53.
155. Alksne LE, Dunman PM. Target-based antimicrobial drug discovery. *Methods in Molecular Biology*. 2007 Aug 31;431:271–83.
156. Salillas S, Sancho J. Flavodoxins as novel therapeutic targets against *Helicobacter pylori* and other gastric pathogens. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020.
157. Pflock M, Finsterer N, Joseph B, Mollenkopf H, Meyer TF, Beier D. Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *Journal of Bacteriology*. 2006 May;188(10):3449–62.
158. Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. Vol. 428, *Journal of Molecular Biology*. Academic Press; 2016. p. 3752–75.

159. Müller S, Götz M, Beier D. Histidine Residue 94 Is Involved in pH Sensing by Histidine Kinase ArsS of *Helicobacter pylori*. Ahmed N, editor. PLoS ONE. 2009 Sep 7;4(9):e6930.
160. Marcus EA, Sachs G, Wen Y, Scott DR. Phosphorylation-dependent and Phosphorylation-independent Regulation of *Helicobacter pylori* Acid Acclimation by the ArsRS Two-component System. *Helicobacter*. 2016 Feb 1;21(1):69–81.
161. Beier D, Frank R. Molecular characterization of two-component systems of *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 2000;182(8):2068–76.
162. Wen Y, Feng J, Scott DR, Marcus EA, Sachs G. The HP0165-HP0166 two-component system (ArsRS) regulates acid-induced expression of HP1186 α -carbonic anhydrase in *Helicobacter pylori* by activating the pH-dependent promoter. *Journal of Bacteriology*. 2007 Mar;189(6):2426–34.
163. Acio-Pizzarello CR, Acio AA, Choi EJ, Bond K, Kim J, Kenan AC, et al. Determinants of the regulation of *Helicobacter pylori* adhesins include repeat sequences in both promoter and coding regions as well as the two-component system ArsRS. *Journal of Medical Microbiology*. 2017 Jun 1;66(6):798–807.
164. Servetas SL, Doster RS, Kim A, Windham IH, Cha JH, Gaddy JA, et al. ArsRS-dependent regulation of homB contributes to *Helicobacter pylori* biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*. 2018 Aug 2;9(AUG):1497.
165. Servetas SL, Carpenter BM, Haley KP, Gilbreath JJ, Gaddy JA, Scott Merrell D. Characterization of key *Helicobacter pylori* regulators identifies a role for arsrs in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 2016;198(18):2536–48.
166. Goodwin AC, Weinberger DM, Ford CB, Nelson JC, Snider JD, Hall JD, et al. Expression of the *Helicobacter pylori* adhesin SabA is controlled via phase variation and the ArsRS signal transduction system. *Microbiology (Reading, England)*. 2008;154(Pt 8):2231–40.
167. González A, Casado J, Chueca E, Salillas S, Velázquez-Campoy A, Sancho J, et al. Small Molecule Inhibitors of the Response Regulator ArsR Exhibit Bactericidal Activity against *Helicobacter pylori*. *Microorganisms*. 2020 Apr 1;8(4):503.
168. Müller S, Pflock M, Schär J, Kennard S, Beier D. Regulation of expression of atypical orphan response regulators of *Helicobacter pylori*. *Microbiological Research*. 2007 Jan 29;162(1):1–14.
169. Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. Growth phase-dependent regulation of target gene promoters for binding of the essential orphan response regulator HP1043 of *Helicobacter pylori*. *Journal of bacteriology*. 2002 Sep;184(17):4800–10.
170. Olekhnovich IN, Vitko S, Valliere M, Hoffmana PS. Response to metronidazole and oxidative stress is mediated through homeostatic regulator hsra (hp1043) in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 2014 Feb;196(4):729–39.
171. Pellicciari S, Pinatel E, Vannini A, Peano C, Puccio S, De Bellis G, et al. Insight into the essential role of the *Helicobacter pylori* HP1043 orphan response regulator: Genome-wide identification and characterization of the DNA-binding sites. *Scientific Reports*. 2017;7.
172. Olekhnovich IN, Vitko S, Chertihin O, Hontecillas R, Viladomiu M, Bassaganya-Riera J, et al. Mutations to Essential Orphan Response Regulator HP1043 of *Helicobacter pylori* Result in Growth-Stage Regulatory Defects Pathogenesis. *Infection and Immunity*. 2013 May;81(5):1439–49.
173. Hong E, Hyang ML, Ko H, Kim DU, Jeon BY, Jung J, et al. Structure of an atypical orphan

- response regulator protein supports a new phosphorylation-independent regulatory mechanism. *Journal of Biological Chemistry*. 2007 Jul 13;282(28):20667–75.
174. González A, Casado J, Chueca E, Salillas S, Velázquez-Campoy A, Angarica VE, et al. Repurposing dihydropyridines for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Pharmaceutics*. 2019 Dec 1;11(12).
 175. González A, Salillas S, Velázquez-Campoy A, Espinosa Angarica V, Fillat MF, Sancho J, et al. Identifying potential novel drugs against *Helicobacter pylori* by targeting the essential response regulator HsrA. *Scientific Reports*. 2019 Dec 1;9(1):1–13.
 176. González A, Casado J, Chueca E, Salillas S, Velázquez-Campoy A, Sancho J, et al. Small Molecule Inhibitors of the Response Regulator ArsR Exhibit Bactericidal Activity against *Helicobacter pylori*. *Microorganisms*. 2020 Apr 1;8(4):503.
 177. Olekhnovich IN, Vitko S, Valliere M, Hoffmana PS. Response to metronidazole and oxidative stress is mediated through homeostatic regulator HsrA (hp1043) in *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology*. 2014 Feb;196(4):729–39.
 178. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2009;31(2):NA-NA.
 179. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 10.0. 2020. Disponible online: <http://www.eucast.org>
 180. Bie M, Wen J, Wang H, Zhou L, Yang L, Pan Y, et al. Phylogenetic analysis of clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastric diseases in Tibet. *Annals of Translational Medicine*. 2019 Jul;7(14):320–320.
 181. Olbermann P, Josenhans C, Moodley Y, Uhr M, Stamer C, Vauterin M, et al. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *PLoS Genetics*. 2010 Aug;6(8).
 182. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018 Mar 1;18(3):318–27.
 183. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. Vol. 362, *New England Journal of Medicine*; 2010. p. 1804–13.
 184. Connan C, Popoff MR. Two-component systems and toxinogenesis regulation in *Clostridium botulinum*. *Research in Microbiology*. 2015 May 1;166(4):332–43.
 185. Gupta SS, Borin BN, Cover TL, Krezel AM. Structural analysis of the DNA-binding domain of the *Helicobacter pylori* response regulator ArsR. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 Mar 6;284(10):6536–45.
 186. Bruce D, Cardew E, Freitag-Pohl S, Pohl E. How to Stabilize Protein: Stability Screens for Thermal Shift Assays and Nano Differential Scanning Fluorimetry in the Virus-X Project. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2019 Feb 11;(144):e58666.

9. ANEXOS

9.1. Anexo I: Cebadores

Hpylori.hsra_up

5'- GGAATTCCATATGCGCGTTCTACTGATTG-3'

Hpylori.hsra_down

5'-CCCAAGCTTTTACTCTTCACACGCCGG-3'

Hpylori.PporG_up

5'-CCCCACACTTACAGAC-3'

Hpylori.PporG_down

5'-GCATGCCATCACATGG-3'

Anabaenasp.pKn22_up

5'-GATGAATTACTGATGG-3'

Anabaenasp.pKn22_down

5'-CTGCAACTGTTTGTG-3'

9.2. Anexo II: Figuras

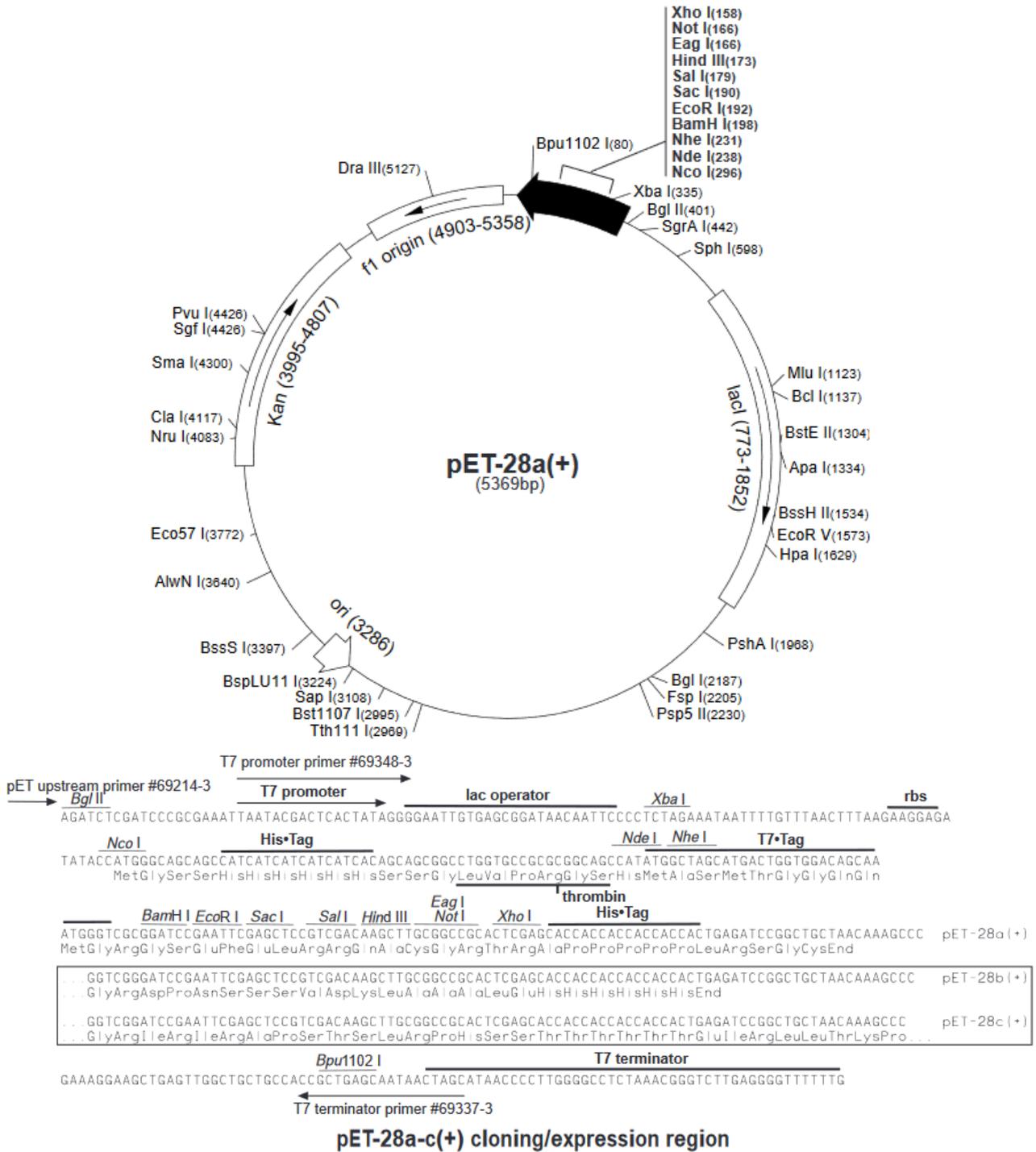


Figura II.1: Mapa del vector pET-28(a) de Novagen. Este vector contiene una región de clonaje regulada por la T7-RNA polimerasa, con una secuencia His-tag en C-terminal, una estructura His-Tag/trombina/His-tag en N-terminal y varios sitios de corte para diversas enzimas de restricción. El vector cuenta además con dos orígenes de replicación y un gen de resistencia a kanamicina para la selección de las células transformadas.

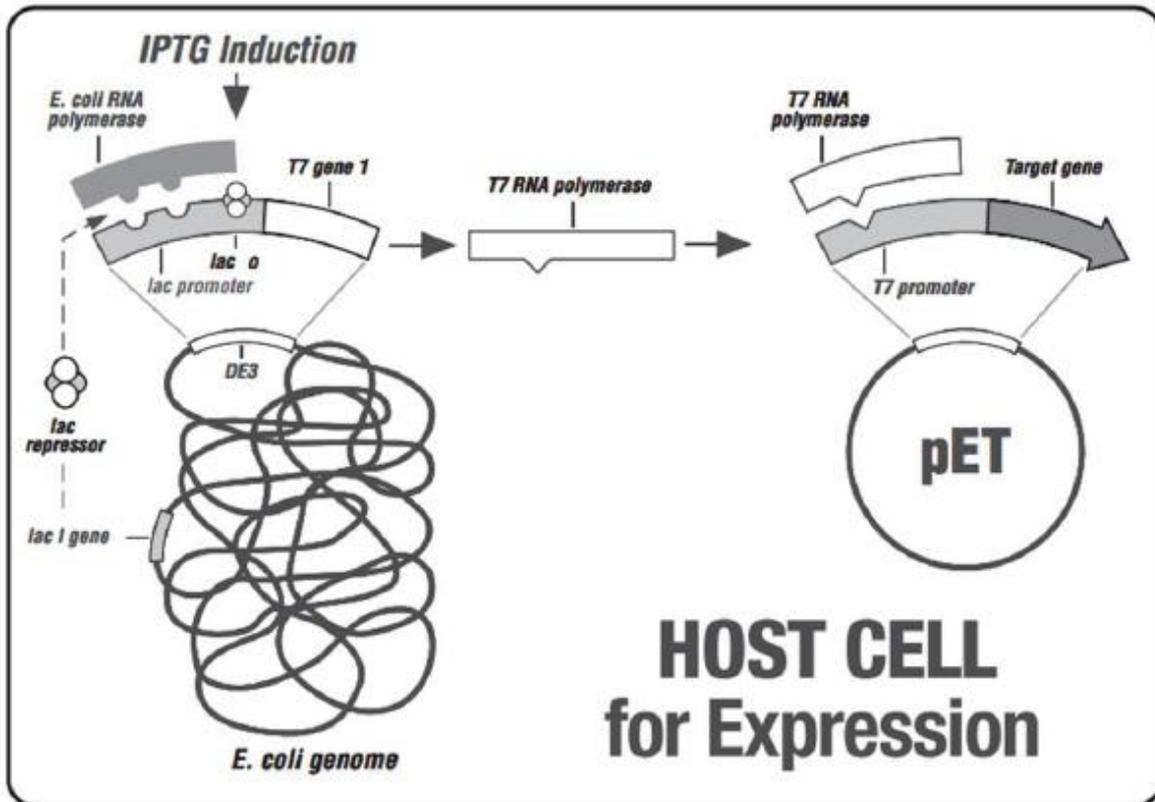


Figura II.2 Sistema de expresión de proteínas recombinantes a partir del vector pET-28(a) de Novagen, que contiene en un promotor híbrido *T7* y el operador *LacO*. Para la transcripción del inserto el vector debe ser introducido en una cepa de *E. coli* que contenga en su genoma el gen *LacI* y una secuencia DE3 con la *T7*-RNA polimerasa y *LacO* controlados por el promotor *lac*, de forma que la adición de IPTG permita la expresión de la proteína recombinante.