

Estudio teórico sobre el empleo de la proteína CagA de *Helicobacter pylori* como diana terapéutica para la prevención del cáncer gástrico

Josep Calafell Segura^a, Manuel Collado Valero^b, Íñigo Marquet de Solís^c,
Javier Vicente Gutiérrez^d

Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá (UAH). Alcalá de Henares (Madrid).

a. pepcalafell98@gmail.com b. manualmansa98@gmail.com c. imarquetdesolis@gmail.com
d. javiervicentegutierrez@gmail.com

VI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2021.

29 de marzo a 30 de abril, 2021. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España.

Palabras clave: Cáncer gástrico; *Helicobacter pylori*; CagA; dominio CM; HTS

Resumen

El cáncer gástrico (GC) es la cuarta neoplasia más diagnosticada en el mundo, siendo la segunda causa de muerte por tumor. Hay diversos factores de riesgo que favorecen el desarrollo de la enfermedad como alcohol, tabaco o dieta, entre otros, pero el principal es *Helicobacter pylori*. *H. pylori* infecta la mucosa gástrica en un 50% de la población global. Esta bacteria es resistente al ácido del estómago promueve una inflamación crónica y prolongada a la cual se le asocia un 90% de los GC *non-cardia*. El tratamiento actual frente a esta infección consiste en la administración de antibióticos de amplio espectro, pero su uso prolongado desemboca en problemas de multirresistencia. Por ello este proyecto teórico propone una futura estrategia terapéutica para la prevención del GC. *H. pylori* inyecta a las células epiteliales del estómago una proteína denominada CagA. CagA desregula diferentes vías de señalización aumentando la proliferación y migración celular, desarrollando un fenotipo tumoral. Esta es una proteína multidominio, entre los cuales destaca el dominio de multimerización CM. El dominio CM aumenta la estabilidad de la proteína permitiendo una señalización más duradera, es decir, manteniendo las vías exacerbadas. Entre sus funciones destaca su interacción con la quinasa PAR-1 inhibiéndola, lo cual auspicia la proliferación y migración. Tras observar la importancia de este dominio, hemos desarrollado de forma teórica un proyecto para conseguir compuestos que inhiban el CM cuyas propiedades permitan su uso como fármaco. Para este proyecto asumimos que disponemos de una librería con sus numerosos compuestos químicos a partir de la cual diseñaremos un proceso de “*drug discovery*”. Inicialmente, se realiza un cribado de alto rendimiento (HTS) de los compuestos, mediante un kit comercial sensible a la actividad quinasa de PAR-1 en microplacas. A partir de los resultados (HITs) se realizarán ensayos *in vitro* e *in vivo* para testar la eficacia, selectividad y toxicidad de los mismos. Tras la obtención de los candidatos más prometedores se realizarán modificaciones sucesivas con el fin de obtener la mejor versión de los inhibidores, con la esperanza de ser utilizados en clínica para la prevención del cáncer gástrico.

Cita: Calafell Segura, Josep; Collado Valero, Manuel; Marquet de Solís, Íñigo; Vicente Gutiérrez, Javier (2021) Estudio teórico sobre el empleo de la proteína CagA de *Helicobacter pylori* como diana terapéutica para la prevención del cáncer gástrico. Actas del VI Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2021. 29 de marzo a 30 de abril, 2021. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. *dianas* 10 (1): e202103fa02. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202103fa02](http://www3.uah.es/dianas?e202103fa02) <http://www3.uah.es/dianas?e202103fa02>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Calafell-Segura J, Collado-Valero M, Marquet-de-Solís, Vicente-Gutiérrez J. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

El cáncer gástrico (GC) es una de las neoplasias más comunes del mundo y es una enfermedad multifactorial, donde diversos factores influyen en su desarrollo, tanto ambientales como genéticos. Las estadísticas actuales muestran al GC como la cuarta causa de mortalidad producida por cáncer del mundo, donde el ratio medio de supervivencia es menor a 12 meses para el estadio avanzado de la enfermedad (Machlowska et al., 2020). De hecho, el GC representa el 7% de los nuevos casos de cáncer y el 9% de las muertes causadas por cáncer globalmente, y la incidencia es 2-3 veces mayor en hombres que en mujeres (Park et al., 2018).

Los adenocarcinomas gástricos se clasifican principalmente en *cardia* y *non-cardia* en función de su localización anatómica. Los cánceres del *cardia* gástrico surgen en la región adyacente a la unión esófago-gástrica y, por tanto, comparten características epidemiológicas con el adenocarcinoma de esófago (CAE). El cáncer *non-cardia*, también conocido como cáncer de estómago distal, es más frecuente y surge en la parte inferior del estómago (Rawla et al., 2019).

Hay diferentes factores de riesgo que determinan el desarrollo del cáncer gástrico, tanto genéticos como ambientales. Respecto los factores genéticos, se ha identificado que la poliposis adenomatosa familiar (FAP) es la forma más común de GC o intestinal familiar, pero sin embargo el riesgo de desarrollar cáncer gástrico entre pacientes que padecen FAP es menor del 1%, indicando así la menor relevancia de los factores genéticos en el desarrollo de este tipo de neoplasias (Boland et al., 2017). Por otra parte, existen una serie de factores ambientales altamente relacionados con el desarrollo de esta enfermedad. El tabaco, alcohol, exposición química a metales, dieta, obesidad y el virus de Epstein Barr son algunas causas, pero dentro de ellas la que proporciona una mayor incidencia en el GC es *Helicobacter pylori*. Hasta el 90% de los casos de cáncer gástrico non-cardia son atribuibles a esta bacteria, siendo así el principal factor de riesgo en la asociación entre la úlcera gástrica y el cáncer gástrico. Estos resultados fueron analizados en una gran cohorte de 57.936 pacientes suecos, donde se descubrió que el riesgo de cáncer gástrico era casi el doble del esperado entre los pacientes con úlcera gástrica (Rawla et al., 2019).

Helicobacter pylori

H. pylori es una bacteria gram negativa, con forma de hélice, microaerófila y flagelada que es capaz de convertir su forma de espiral a cocoide, lo que se cree que está implicado en la mejora de la supervivencia bacteriana en el microambiente gástrico del huésped. La forma espiral de *H. pylori* permite la motilidad exitosa de la bacteria, mientras que la forma cocoide proporciona la capacidad de colonizar la capa de moco del epitelio gástrico, aumentando la capacidad de invasión de la bacteria. Además, *H. pylori* es capaz de formar biopelículas para disminuir su susceptibilidad a diversos antibióticos, lo que conduce a mutaciones de resistencia a antibióticos y a mayores dificultades para la erradicación de la bacteria (Baj et al., 2020). La infección de *H. pylori* presenta una prevalencia del 50% a nivel mundial, aunque depende de la población de cada país. De hecho, una review sistemática reciente de 37 estudios con cobertura de 22 países demostró una prevalencia aproximada del 70% o superior a partir de los 60 años de edad, siendo 2 veces superior en países con doble incidencia de cáncer gástrico (Park et al., 2018).

Respecto al diagnóstico, existen técnicas invasivas y no invasivas. Las invasivas incluyen endoscopia, técnicas histológicas y cultivo bacteriano a partir de biopsia gástrica. Entre las técnicas no invasivas, se encuentra la prueba del aliento y la prueba del antígeno fecal, que a su vez incluye inmunoensayo enzimático (EIA) y ensayo inmunocromatográfico (ICA), basados en el empleo de anticuerpos monoclonales o policlonales en muestras fecales. La PCR también es comúnmente empleada para detectar genes característicos de *H. pylori* (Wang et al., 2015).

El tratamiento actual de la infección por *H. pylori* incluye diferentes líneas. La primera consiste en una terapia estándar triple basada en un inhibidor de la bomba de protones (PPI) como el omeprazol junto con dos antibióticos, claritromicina y amoxicilina/metronidazol. Sin embargo, la creciente resistencia de *H. pylori* a estos antibióticos ha obligado a proponer tratamientos de segunda línea, ya sea mediante levofloxacina o pylera, una combinación de antibióticos con subcitrate de bismuto para proteger la mucosa gástrica. De hecho, ya se están generando resistencias a estos tratamientos de segunda línea, con lo que una alternativa podría ser de impacto para evitar problemas de multiresistencia a antibióticos (Yang et al., 2014).

H. pylori promueve la carcinogénesis gástrica a través de múltiples mecanismos, provocando una inflamación gástrica crónica que puede progresar hacia los cambios precancerosos de la gastritis atrófica y la metaplasia intestinal. El riesgo de cáncer gástrico aumenta en relación con la gravedad y la extensión de esos cambios precancerosos. La infección crónica por *H. pylori* también puede contribuir a la inestabilidad genética de la mucosa gástrica al reducir la secreción de ácido gástrico (hipoclorhidria), lo que puede promover el crecimiento del microbioma gástrico que procesa los componentes de la dieta en carcinógenos. La erradicación de *H. pylori* puede dar lugar a la resolución de la inflamación gástrica, detener la progresión del daño en la mucosa gástrica, prevenir más daños en el ADN inducidos por *H. pylori*, mejorar la secreción de ácido gástrico y restaurar el microbioma hacia la normalidad (Lee et al., 2016).

La adhesión a la mucosa gástrica es el primer paso para establecer la colonización bacteriana, y las proteínas de la membrana externa (OMP) desempeñan un papel fundamental en la unión a las células humanas. Se conocen algunas moléculas de interacción de las OMP en *H. pylori*, y se han ido aclarando sus respuestas asociadas en las células del huésped. Muchos estudios han demostrado que las OMP son esenciales para la translocación del producto del gen A asociado a la citotoxina (CagA) en las células gástricas a través del sistema de secreción de tipo IV (T4SS) de *H. pylori*. Entre los factores de virulencia de *H. pylori*, se identificaron como secretados la proteína CagA, ureasa, γ -glutamina transferasa, requisito de alta temperatura A (HtrA, una serín proteasa) y el gen A asociado a la vacuolación (VacA). En concreto, CagA es inyectada en las células gástricas a través del T4SS de *H. pylori* para inducir la producción de citoquinas inflamatorias en las células epiteliales gástricas (Matsuo et al., 2017).

CagA

Las cepas de *H. pylori* pueden clasificarse generalmente en dos subtipos: CagA positivo y CagA negativo, siendo las primeras responsables del 60% de las infecciones por esta bacteria. La proteína CagA (128-145 kDa), junto con el T4SS, está codificada por la isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), que desempeña un papel clave en la carcinogénesis. CagA es inyectada en la célula a través de los pili formados por T4SS e induce alteraciones celulares que afectan a la motilidad, proliferación y apoptosis, además de alterar la disposición del citoesqueleto. La adherencia de *H. pylori* a las células epiteliales gástricas induce la expresión de CagA y el proceso parece estar controlado por la proteína reguladora del transporte de hierro (Fur), entre otras. La presencia de CagA suele asociarse a una mayor prevalencia de respuestas inflamatorias y a un mayor daño inducido dentro de la mucosa gástrica; sin embargo, el estado de CagA por sí solo no es el único factor decisivo en lo que respecta a las posteriores alteraciones gastrointestinales inducidas por *H. pylori* (Baj et al., 2020).

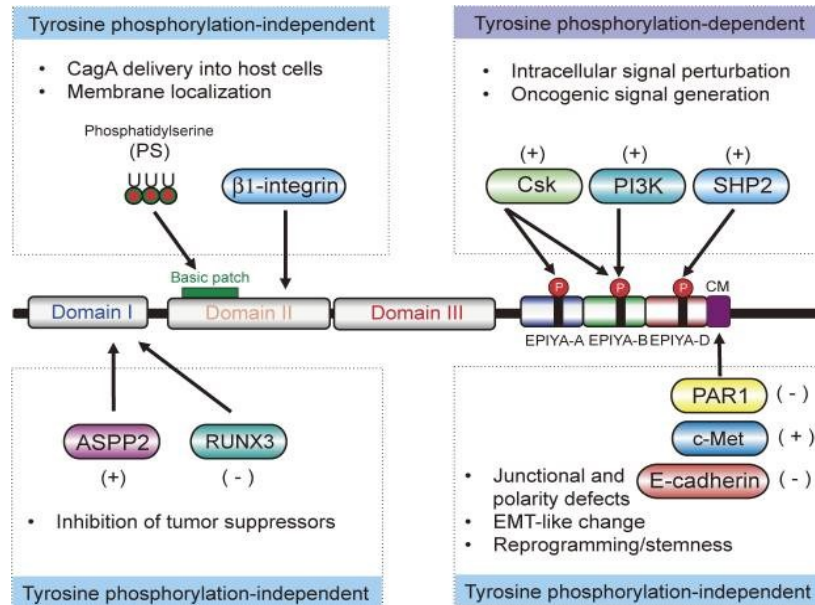


Figura 1. Estructura e interacciones de CagA con proteínas de la célula huésped. CagA interactúa con una serie de moléculas transductoras de señales del huésped a través de motivos EPIYA fosforilados en tirosina en su cola C-terminal. CagA también se une a moléculas reguladoras de la polaridad celular a través de los motivos CM C-terminales, causando defectos de unión y polaridad. Los dominios I, II y III se encuentran en el extremo N-terminal de forma estructurada, mientras que la región C-terminal presenta una disposición desordenada. El dominio I de CagA interactúa con genes supresores de tumores, como la proteína TP53-2 estimuladora de la apoptosis (ASPP2) y el factor de transcripción 1 de la familia RUNX (RUNX1), dando como resultado la inactivación de las funciones supresoras de tumores. El dominio II y/o el dominio III de CagA están implicados en la introducción de CagA en las células huésped y en su posterior localización en la membrana. A través de la interacción, CagA activa [indicado por (+)] o inactiva [indicado por (-)] las proteínas diana (Hatakeyama, 2017).

La región C-terminal de CagA varía entre las cepas de *H. pylori* y es la región diana para la fosforilación de tirosina por parte de las quinasas de la célula huésped. En esta región se localizan cuatro motivos de fosforilación de tirosina denominados regiones EPIYA (glutámico-prolina-isoleucina-tirosina-alanina) y se han caracterizado con respecto a las secuencias de aminoácidos que flanquean estos sitios. Estos cuatro sitios, denominados EPIYA-A, -B, -C y -D, varían en número y organización en diferentes cepas de *H. pylori* (Sicinschi et al., 2010) (Figura 1).

Una vez dentro de la célula epitelial gástrica, CagA se asocia a la membrana mediante su dominio II por interacción electrostática entre aminoácidos presentes en este dominio y fosfatidil serina presente en la cara interna de la membrana plasmática. A partir de aquí, CagA puede tomar dos vías en función de si se dimeriza o no, las cuales dependen de su estatus de fosforilación por proteínas de la familia Src (SFK) de la célula huésped. Si dimeriza, CagA actúa como una proteína de andamiaje gracias a sus motivos SH2, presentes en el dominio III y en la cola C-terminal (Figura 1). Con las regiones EPIYA del extremo C-terminal recluta proteínas como SHP2 (fosfatasa-2 que contiene la región 2 del dominio de homología de Src) y con el motivo de multimerización CM a PAR1 (receptor activado por proteasas 1), activando e inhibiendo respectivamente. La fosfatasa SHP2 activa mediante defosforilación proteínas que inhiben la vía de las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK-ERK), favoreciendo la activación de esta vía (Figura 2).

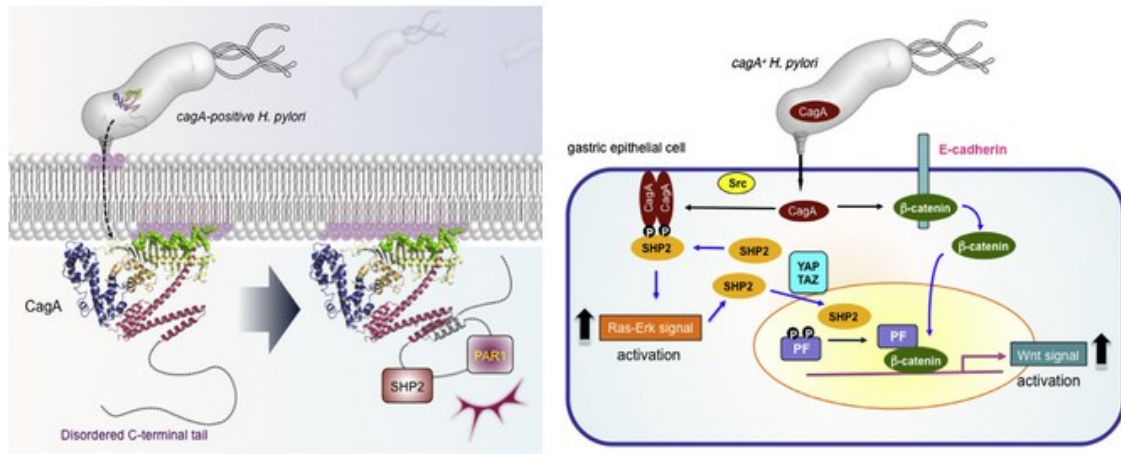


Figura 2. Mecanismo molecular patógeno de CagA. A la izquierda, entrada de CagA en la célula epitelial gástrica, unión a la membrana plasmática por su cara interna e interacción con SHP2 y PAR1 con su cola C-terminal desordenada. A la derecha, esquema de las principales acciones de SHP2 activada por CagA en la vía de MAPK-ERK y Wnt/β-catenina (Hatakeyama, 2017).

Motivo CM, nuestra diana terapéutica

Dentro de la región variable del gen CagA hay otro motivo llamado región de multimerización (CM) de CagA, una secuencia de 16 aminoácidos implicada en dimerización. A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre los dominios EPIYA, aún no se sabe la relevancia clínica que podría tener el dominio CM. Un estudio anterior realizado por Straus *et al.* (2002) se examinó la infección por *H. pylori* en una población minoritaria de pacientes de la ciudad de Nueva York y observó que esta población tenía una tasa de infección más alta que la población general (Straus *et al.*, 2002). Además, esta población está supuestamente infectada con cepas de *H. pylori* CagA-positivas más virulentas que se asocian con un mayor riesgo de cambios precancerosos en la mucosa gástrica (Schneller *et al.*, 2006).

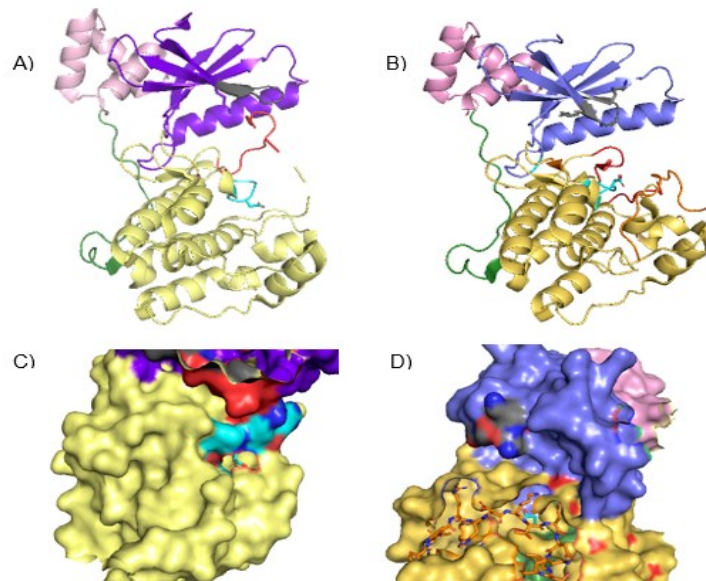


Figura 3. Visualización tridimensional mediante PyMOL viewer de la estructura molecular de PAR1 y su interacción con el motivo CM de CagA. A) PAR1 en su estructura molecular en hélices α y láminas β (“cartoon”). En el centro de la figura destaca el aspártico catalítico de color azul cian, representado en forma “sticks”. B) Interacción de PAR1 con el motivo CM de CagA (representado de color naranja en el centro de la figura). Observamos un cambio conformacional de PAR1, que impide su función ocultando el aspártico catalítico. C) Representación de la superficie de PAR1 (“spheres”). Al igual que en A), observamos el aspártico catalítico localizado en la parte central de la proteína y representado en “sticks” (color azul cian). D) Representación de la superficie de PAR1 (“spheres”) y el aspártico catalítico (“sticks”). En este caso se observa la interacción del motivo CM (“sticks” de color naranja) con la región del aspártico catalítico, impidiendo la entrada del sustrato.

Tal y como se ha indicado anteriormente, el motivo CM de CagA interacciona con PAR1, una serín-treonín quinasa de la familia de las MARK (quinasas reguladoras de la afinidad por microtúbulos), las cuales se caracterizan principalmente por interactuar con los microtúbulos que componen el citoesqueleto de la célula. Esta interacción impide las funciones fisiológicas de PAR1. Por un lado,

debilita las uniones estrechas de las células gástricas provocando una pérdida de adhesión al epitelio y promoviendo el fenotipo migratorio. Por otro lado, recluta a la E-cadherina, lo que favorece su disociación de la β -catenina, que en su forma libre se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción. Por tanto, la acción sinérgica de la activación de las vías de MAPK-ERK y Wnt/ β -catenina mediante las regiones EPIYA y CM respectivamente, favorece la supervivencia, proliferación y el fenotipo migratorio de la célula epitelial (Hatakeyama, 2014) (Figura 2).

Además de tener acción directa pro-oncogénica por activación de las vías mencionadas, CagA por interacción con SHP2, PAR1 y otras proteínas puede originar inestabilidad genética y epigenética. Esta acción última es clave para dar lugar a mutaciones que inducen un proceso neoplásico. Por ejemplo, mediante SHP2 se activan DNMT y MLH1 (metiltransferasas de ADN) que ocasionan hipermetilación del DNA en genes supresores de tumores e inestabilidad de microsatélites, respectivamente (Hatakeyama, 2014).

Objetivo

La infección por *H. pylori* permanece siendo muy prevalente a nivel mundial, estando presente en el 50% de la población (Park et al., 2018). Tal y como se ha comentado previamente, el tratamiento actual contra la infección por *H. pylori* consiste en una combinación de antibióticos de primera o segunda línea junto a un inhibidor de la bomba de protones. El problema surge debido a que los antibióticos se administran a unas altas dosis pudiendo generar problemas de toxicidad, además de que en muchos casos no se siguen correctamente las pautas del tratamiento. Esto contribuye al desarrollo de bacterias multirresistentes a antibióticos, que en un futuro será un hecho de impacto para la salud mundial. De hecho, la resistencia a antibióticos está siendo un problema emergente y cada vez es más complicado ajustar un tratamiento antimicrobiano contra diversas infecciones bacterianas. Así, se estima que para el año 2050, la resistencia a antibióticos será la principal causa de muerte a nivel global (Testerman & Morris, 2014).

Nuestro objetivo consiste en incidir en la interacción de CagA con PAR1 mediante el dominio de dimerización CM, lo que evitaría la pérdida de adhesión celular del epitelio gástrico y el fenotipo migratorio. Un estudio realizado por Ishikawa *et al.*, (2009) demostró que la proteína CagA carente del dominio CM presenta una degradación acelerada por vías independientes al proteosoma 26S, siendo una proteína de vida media corta. Esto indica que la formación del complejo CagA-PAR1 estabiliza dicha proteína y aumenta su función. Es decir, este estudio ya vislumbró la posibilidad de incidir sobre la interacción de CagA-PAR1 como una posible diana terapéutica efectiva, con lo que este hecho podría ser de gran impacto para la salud de la población, permitiendo erradicar la infección de *H. pylori* y, en definitiva, en línea con nuestro objetivo principal, prevenir el desarrollo de cáncer gástrico.

Por ello, nuestra actual propuesta representa una alternativa al actual tratamiento contra la infección por *H. pylori*, de forma que podría suponer un doble beneficio para la salud mundial: por un lado, eliminar la infección de esta bacteria con la consecuente prevención del cáncer gástrico; por otro, evitar en cierta parte el desarrollo de bacterias de multirresistencia, además de permitir la reducción de las dosis de antimicrobianos, reduciendo a su vez los problemas de toxicidad asociados y reduciendo el coste sanitario.

Cribado de alto rendimiento (HTS)

Dilucidando el diseño sobre el ensayo que utilizaríamos para cribar el efecto de nuestra batería de compuestos, tuvimos en cuenta una serie de factores como el rendimiento, el escalado, la miniaturización o el gasto económico. De una gran lista, elegimos un ensayo de colorimetría sensible a la actividad quinasa de PAR1, condicionada por la interacción con CagA. Este ensayo consta de varias partes: clonaje, purificación, el ensayo en sí, análisis visual y lectura de placa (Figura 4).

Clonaje: consiste en la inserción de los fragmentos que codifican la región CM de CagA y la quinasa PAR-1 en dos plásmidos, *lentiGuide-Puro* (Zhang et al., 2014) de *Zhang Lab*. Para obtener múltiples copias de estos vectores clonados, se transformaría con los mismos a bacterias *DH5-alfa* de *ThermoFisher* (ThermoFisher, 18265017), las cuales son una colonia modificada genéticamente de *Escherichia coli*. Posteriormente, se transfectan las células HEK-293T (ATCC, CRL-3216) con los plásmidos clonados y se obtendrán lentivirus con el plásmido en su interior. Finalmente, se infecta con los virus a células pertenecientes a una línea celular de cáncer gástrico (ATCC, CRL-1739) para que en ellas se codifiquen las proteínas de interés.

Purificación: en esta fase se extraen las proteínas de interés usando un tampón de lisis y de extracción, además de ultracentrifugación. Mediante un sistema de HPLC de *ThermoFisher* (ThermoFisher, UHPLC) se obtendrán las proteínas aisladas y purificadas.

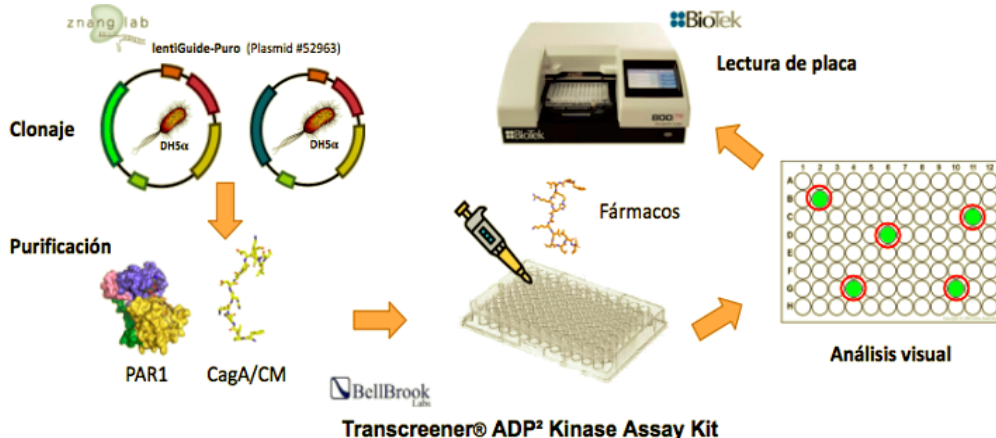


Figura 4. Esquema de las distintas partes del cribado de alto rendimiento HTS: clonaje, purificación, ensayo sensible a la actividad fosforilasa de PAR1, análisis visual y lectura de placa.

Ensayo sensible a la actividad quinasa de PAR-1: para esta fase se empleará el kit comercial *Transcreener® ADP² Kinase Assay Kit* de BellBrook (Sigma-Aldrich, 3013). El fundamento del kit se basa en la detección colorimétrica de ADP marcado con un fluorocromo (ADP*) que solo es detectado cuando se encuentra libre y no secuestrado por un anticuerpo específico. La presencia de los niveles de actividad quinasa aumentan proporcionalmente los niveles de ADP no marcado que compiten con el ADP*, emitiendo este último fluorescencia (Figura 5A). Por tanto, CagA provocará un descenso de la actividad quinasa de PAR-1 y consecuentemente de la fluorescencia emitida (Figura 5B). En presencia de un *hit* que evite la interacción de CagA con PAR-1, consecuentemente se observará un aumento de los niveles de actividad quinasa y fluorescencia (Figura 5C). Todo este ensayo es miniaturizable y por ello se realizará en placas P96.

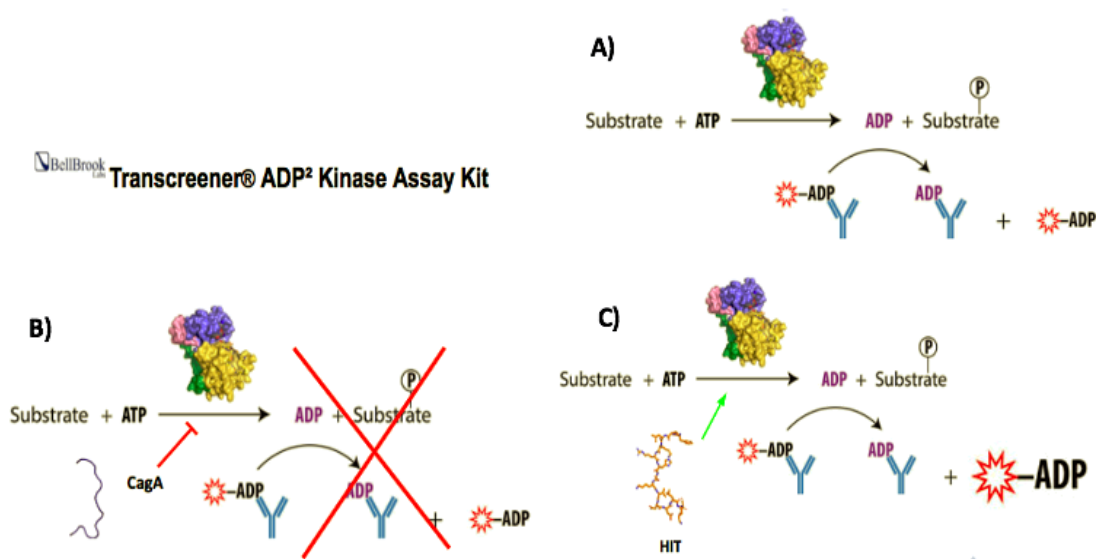


Figura 5. Esquema del funcionamiento del kit comercial sensible a la actividad quinasa de PAR1.

Análisis visual: según el fundamento teórico explicado anteriormente, se hará un primer análisis visual que permitirá determinar cuáles son los posibles HITS que han resultado eficaces en inhibir la interacción de CagA y PAR-1.

Lectura de placa: para comprobar que el cambio de color observado es significativo, se hará un análisis en el lector para microplacas de BioTek (BioTek, ELx808), que permitirá determinar con exactitud los niveles de fluorescencia en cada pocillo. Con el posterior análisis estadístico de los valores obtenidos para cada triplicado de *hit*, se determinará las moléculas que ejercen el efecto deseado.

Una vez obtenidos los HITS, se procederá a elegir los mejores *lead* o cabezas de serie. Algunos de los criterios de selección más importante son si la molécula es novedosa y los resultados obtenidos en estudios de estructura/actividad, con previas modificaciones químicas.

Ensayos *in vitro*

Una vez llevado a cabo el estudio HTS, el siguiente paso consistiría en la comprobación *in vitro* del efecto terapéutico de los candidatos a fármaco. Estos ensayos serían llevados a cabo en una línea celular

de adenocarcinoma gástrico adquirida de una casa comercial (<https://www.lgsstandards-atcc.org/products/all/CRL-1739.aspx#characteristics>). Antes de comenzar los procedimientos, estas células habrían sido transfectadas mediante un virus del género lentivirus para inducir la sobreexpresión de CagA, nuestra proteína de interés. Los procesos celulares más importantes a estudiar serían la migración, la proliferación y la apoptosis, factores claves en la carcinogénesis. Los resultados obtenidos en cada uno de estos apartados clasificarían a los *hits* como *leads* o cabezas de serie, o provocarían su descarte.

La capacidad de CagA de favorecer los procesos migratorios en las células infectadas es ya bien conocida (Mégraud et al., 2015). Para examinar la efectividad del fármaco en este aspecto, se realizan dos pruebas diferentes. La principal sería el análisis del fenotipo celular, debiendo mostrar el clásico fenotipo colibrí en las células transfectadas, y un fenotipo normal en aquellas en las que ha sido inhibida la vía de señalización (Figura 6). Adicionalmente, se llevaría a cabo un Western Blot para observar los resultados de la inhibición en las distintas proteínas implicadas en la migración.

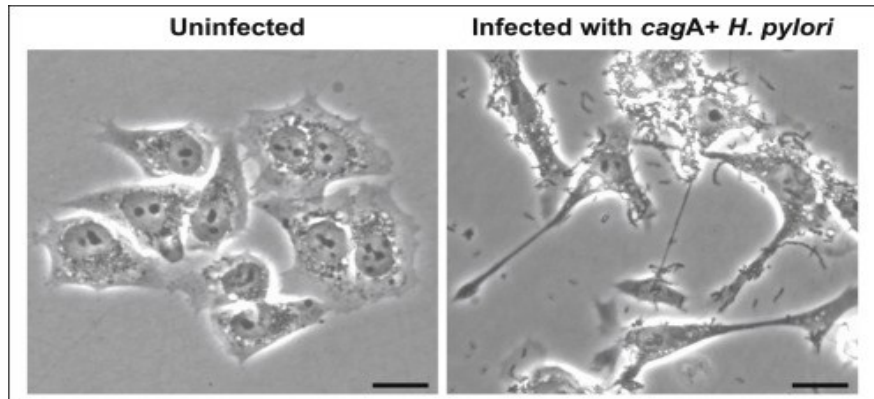


Figura 6. Las células sin infectar mantienen un fenotipo normal, mientras que las células infectadas con CagA adaptan el fenotipo colibrí propio de la carcinogénesis (Mégraud et al., 2015).

Por otra parte, en la literatura se describe la existencia de una proliferación exacerbada tras una infección por *Helicobacter Pylori*. Mediante el conteo del número de células, Western Blots y ensayos del ciclo celular se verificaría la eficacia del tratamiento, determinada por la magnitud de la reducción del número de células.

Por último, se sabe que en etapas tempranas de la infección con CagA se promueve un fenotipo apoptótico. Para valorar la presencia de este fenotipo, se desarrollarían experimentos MTT, Anexina V y de actividad de distintas proteínas. Especialmente clarificadora es la caspasa 3, que es sintetizada en forma de procaspasa y se torna activa cuando es hidrolizada en dos fragmentos, evidenciando la apoptosis al aparecer ambos fragmentos separados en el Western Blot.

Ensayos *in vivo*

Los HITs que tengan resultados prometedores *in vitro* avanzarán de fase para ser analizados en ensayos *in vivo*. Estos estudios aportarán nueva información relevante sobre el funcionamiento del candidato en organismos superiores. El modelo utilizado sería el modelo murino BALB/c. Es el modelo predilecto en experimentación, es inmunocompetente y ya ha sido demostrada previamente la posibilidad de ser infectado por *Helicobacter Pylori* (Taylor & Fox, 2012). En este caso, la infección sería producida por la inyección intragástrica de la cepa Sydney de la bacteria, siendo ésta la mayoritaria en Europa y con una alta patogenicidad.

Como primer paso se realizarán los mismos ensayos elaborados *in vitro*, es decir, los procesos de migración, proliferación y apoptosis mencionados anteriormente. A su vez, se establecerá el desarrollo tumoral mediante técnicas de PET-Scan (tomografía por emisión de positrones). Esta técnica es un examen de imagen que mide la emisión de positrones a través de radiosondas. La radiosonda principal a tener en cuenta en el proceso es la 18F-FDG ($[^{18}\text{F}]$ -fluorodesoxiglucosa), compuesta por una glucosa con un isótopo de flúor. Esta 18F-FDG es captada por las células tumorales, con una mayor necesidad de glucosa. La fluorescencia resultante es captada en la tomografía, señalando la localización del tumor y su tamaño (Figura 7).

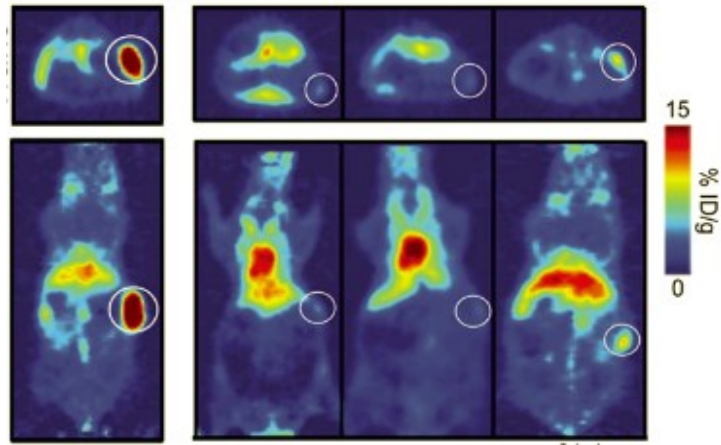


Figura 7. Imagen de PET-Scan en modelo murino. En las imágenes las zonas con mayor demanda de glucosa (células tumorales) están coloreadas de color rojo, mientras que las que presentan una menor dependencia son de color azul (Janjigian et al., 2013). La intensidad se mide en porcentaje de dosis inyectada por gramo de peso (%ID/g).

Conclusiones

Para finalizar, tras el análisis realizado por el grupo de las conclusiones y de los objetivos marcados al principio del proyecto, a continuación se abordará las que consideramos las principales fortalezas directas e indirectas del mismo (Tabla 1). Tras el abordaje de las bases de conocimientos conocidas de esta patología, uno de los objetivos que nos marcamos fue encontrar una diana terapéutica exógena al ser humano, pero al mismo tiempo estar presente en sus células. Este objetivo se ha cumplido con creces al seleccionar a CagA como nuestra diana, ya que permite prevenir los posibles efectos “*off-target*” del tratamiento, lo que evitaría problemas de toxicidad asociados.

✔		👍
Diana terapéutica exógena	→	Prevenir efectos off-target
Eliminar <i>H. pylori</i>	→	Mejorar la calidad de vida
Reducir dosis de antibióticos	→	Impedir multirresistencias
Prevenir cáncer gástrico	→	Evitar muertes
	→	Reducir coste económico

Tabla 1. Resumen de las principales ventajas directas e indirectas del proyecto teórico.

Del mismo modo que nos propusimos prevenir el cáncer gástrico, pretendíamos eliminar uno de sus principales factores de riesgo, *H. pylori*. A pesar de que nuestro fármaco no se trata de un antibiótico, sí que podría llegar a tener un efecto perjudicial sobre *H. pylori*. Esto es posible gracias a que el futuro medicamento reestablecería los niveles de secreción de mucosa del epitelio gástrico afectados por la acción de CagA y también de los niveles de pH ácido del estómago, lo cual dificultará la colonización del epitelio gástrico por *H. pylori*, suponiendo un menor daño del epitelio y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Por otra parte, en esas mismas condiciones de pH ácido, *H. pylori* sería más sensible a los antibióticos, permitiendo reducir la dosis de los mismos, lo cual es importante, entre otros motivos, por las multirresistencias que derivan de su tratamiento, tal y como se ha indicado en el objetivo del presente proyecto. Esto además tiene un valor añadido a nivel social y económico, ya que las bacterias multirresistentes supondrán la “pandemia del futuro” (Testerman & Morris, 2014).

Por último, el propio objetivo de conseguir prevenir el cáncer gástrico supone dos efectos muy positivos derivados de dicho objetivo. Por un lado, se consigue reducir la mortalidad por cáncer gástrico. Esta enfermedad supone una gran pérdida humana anual en todo el mundo por su diagnóstico tardío y su rápida evolución (Machlowska et al., 2020). Es crucial para salvar vidas prevenir esta enfermedad, que en un porcentaje muy elevado surge en presencia de determinadas cepas de *H. pylori*. Además de ello, se

conseguiría reducir el gasto económico-sanitario derivado del tratamiento, tanto de la infección de *H. pylori* como del propio cáncer gástrico.

En conclusión, podemos decir que nuestro proyecto teórico resulta novedoso y de impacto porque se presenta como una solución interesante para solventar muchos de los problemas sanitarios, económicos y sociales relacionados con el cáncer gástrico.

Bibliografía

1. ATCC.293T. *Homo sapiens*, embryonic kidney. N° de catálogo: CRL-3216, página web [última visita el 22 de Marzo de 2021]: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/crl-3216.aspx?geo_country=bg.
2. ATCC.AGS. *Homo sapiens*, gastric cancer. N° de catálogo: CRL-1739, página web [última visita el 22 de Marzo de 2021]: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-1739.aspx?geo_country=bg.
3. Baj, J., Forma, A., Sitarz, M., Portincasa, P., Garruti, G., Krasowska, D., & Maciejewski, R. (2020). *Helicobacter pylori* Virulence Factors-Mechanisms of Bacterial Pathogenicity in the Gastric Microenvironment. *Cells*, 10(1), 27. <https://doi.org/10.3390/cells10010027>.
4. BioTek. Lector de Absorbancia para microplacas. Modelo: ELx808, página web [última visita el 22 de Marzo de 2021]: <https://www.biotek.es/es/products/detection-microplate-readers/elx808-absorbance-reader/>.
5. Boland, C. R., & Yurgelun, M. B. (2017). Historical Perspective on Familial Gastric Cancer. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 3(2), 192–200. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2016.12.003>.
6. Hatakeyama, M. (2014). *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell host & microbe*, 15(3), 306–316. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.008>.
7. Hatakeyama, M. (2017). Structure and function of *Helicobacter pylori* CagA, the first-identified bacterial protein involved in human cancer. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 93(4), 196–219. <https://doi.org/10.2183/pjab.93.013>.
8. Ishikawa, S., Ohta, T., & Hatakeyama, M. (2009). Stability of *Helicobacter pylori* CagA oncoprotein in human gastric epithelial cells. *FEBS letters*, 583(14), 2414–2418. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.043>.
9. Janjigian, Y. Y., Viola-Villegas, N., Holland, J. P., Divilov, V., Carlin, S. D., Gomes-DaGama, E. M., Chiosis, G., Carbonetti, G., de Stanchina, E., & Lewis, J. S. (2013). Monitoring afatinib treatment in HER2-positive gastric cancer with 18F-FDG and 89Zr-trastuzumab PET. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 54(6), 936–943. <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.110239>
10. Lee, Y. C., Chiang, T. H., Chou, C. K., Tu, Y. K., Liao, W. C., Wu, M. S., & Graham, D. Y. (2016). Association Between *Helicobacter pylori* Eradication and Gastric Cancer Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology*, 150(5), 1113–1124.e5. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.01.028>.
11. Machlowska, J., Baj, J., Sitarz, M., Maciejewski, R., & Sitarz, R. (2020). Gastric Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Classification, Genomic Characteristics and Treatment Strategies. *International journal of molecular sciences*, 21(11), 4012. <https://doi.org/10.3390/ijms21114012>.
12. Matsuo, Y., Kido, Y., & Yamaoka, Y. (2017). *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis. *Toxins*, 9(3), 101. <https://doi.org/10.3390/toxins903010>.
13. Mégraud, F., Bessède, E., & Varon, C. (2015). *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(11), 984–990. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.06.004>.
14. Park, J. Y., Forman, D., Waskito, L. A., Yamaoka, Y., & Crabtree, J. E. (2018). Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-Positive Infections and Global Variations in Gastric Cancer. *Toxins*, 10(4), 163. <https://doi.org/10.3390/toxins10040163>.
15. Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Przegląd gastroenterologiczny*, 14(1), 26–38. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.80001>.

16. Sanjana, N.E., Shalem, O., & Zhang F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature*, 11(8), 783-784. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3047>.
17. Schneller, J., Gupta, R., Mustafa, J., Villanueva, R., Straus, E. W., & Raffaniello, R. D. (2006). *Helicobacter pylori* infection is associated with a high incidence of intestinal metaplasia in the gastric mucosa of patients at inner-city hospitals in New York. *Digestive diseases and sciences*, 51(10), 1801–1809. <https://doi.org/10.1007/s10620-006-9167-4>.
18. Sicinschi, L. A., Correa, P., Peek, R. M., Camargo, M. C., Piazzuelo, M. B., Romero-Gallo, J., Hobbs, S. S., Krishna, U., Delgado, A., Mera, R., Bravo, L. E., & Schneider, B. G. (2010). CagA C-terminal variations in *Helicobacter pylori* strains from Colombian patients with gastric precancerous lesions. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16(4), 369–378. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02811.x>.
19. Sigma-Aldrich. Transreener® ADP² FI Assay. N° de catálogo: 3013, página web [última visita el 22 de Marzo de 2021]: https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/3013?lang=es®ion=ES&gclid=Cj0KCQjw3duCBhCAARIsAJeFyPUCMu4ItpHNmqe-94Z_oMiHqMPZD0aseLBdqR_IY-k13LbwbgzAoaAvIEEALw_wcB.
20. Straus, E. W., Patel, H., Chang, J., Gupta, R. M., Sottile, V., Scirica, J., Tarabay, G., Iyer, S., Samuel, S., & Raffaniello, R. D. (2002). *H. pylori* infection and genotyping in patients undergoing upper endoscopy at inner city hospitals. *Digestive diseases and sciences*, 47(7), 1575–1581. <https://doi.org/10.1023/a:101582740490>.
21. Taylor, N. S., & Fox, J. G. (2012). Animal models of *Helicobacter*-induced disease: methods to successfully infect the mouse. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 921, 131–142. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-005-2_18.
22. Testerman, T. L., & Morris, J. (2014). Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World journal of gastroenterology*, 20(36), 12781–12808. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12781>.
23. ThermoFisher. Células competentes Subcloning Efficiency™ DH5α. *Escherichia coli*. N° de catálogo: 18265017, página web [última visita el 22 de Marzo de 2021]: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/18265017#/18265017>.
24. ThermoFisher. Sistema de UHPLC Vanquish Horizon. Página web [última visita el 22 de Marzo de 2021]: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/industrial/chromatography/liquid-chromatography-lc/hplc-uhplc-systems/vanquish-horizon-uhplc-system.html>.
25. Wang, J., Yadav, V., Smart, A. L., Tajiri, S., & Basit, A. W. (2015). Toward oral delivery of biopharmaceuticals: an assessment of the gastrointestinal stability of 17 peptide drugs. *Mol Pharm*, 12 (3), 966-973. <https://doi.org/10.1021/mp500809f>.
26. Wang, Y. K., Kuo, F. C., Liu, C. J., Wu, M. C., Shih, H. Y., Wang, S. S., Wu, J. Y., Kuo, C. H., Huang, Y. K., & Wu, D. C. (2015). Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection: Current options and developments. *World journal of gastroenterology*, 21(40), 11221–11235. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i40.11221>.
27. Yang, J. C., Lu, C. W., & Lin, C. J. (2014). Treatment of *Helicobacter pylori* infection: current status and future concepts. *World journal of gastroenterology*, 20(18), 5283–5293. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5283>.