

“High-Throughput phenotypic assay” para el descubrimiento de compuestos que previenen el cáncer gástrico asociado a la infección por *Helicobacter pylori*

Laura Casablanca^a, Laura Díez^b, Daniela Escobar^c, Elena Santano^d, Dean Ortiz^e

Universidad de Alcalá (DDELL Pharma).

a. lauracasablanca.lc@gmail.com; lauraacasablanca@gmail.com b. lauradiezsilgo@gmail.com c. daniela.escobar.ep@gmail.com d. elenasantano8@gmail.com e. deanwortizlopez@gmail.com

VIII Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2023.

21 a 24 de marzo, 2023. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España.

Palabras clave: Cáncer gástrico; *Helicobacter pylori*; CagA; runx3; ensayo fenotípico; HTS

Resumen

La infección por *Helicobacter pylori* ha sido descrita como el principal agente etiológico del cáncer gástrico. Su control es una prioridad para la salud pública debido a que infecta aproximadamente a la mitad de la población mundial y es responsable del 60 al 70% de todos los adenocarcinomas y linfomas gástricos. Con el aumento de la resistencia a antibióticos y la disminución en las tasas de erradicación, aumenta el tiempo de exposición a su principal factor de patogenicidad, la proteína CagA, que altera numerosas vías de señalización celular, aumentando el riesgo de carcinogénesis. Frenar sus efectos es importante en aquellos pacientes con *H. pylori* de difícil erradicación que pueden exponerse de manera crónica a la patogenicidad de dicha proteína. Por esta razón, nuestro objetivo es diseñar un “High-Throughput Screening” para identificar “hits” que eviten los efectos desencadenados por CagA. Se basaría en detectar la presencia o ausencia de señal lumínica en función de la expresión del gen de la luciferasa. Para ello se emplearía la línea celular GES-1 que expresaría este gen bajo el control del promotor del oncosupresor *runx3*, el cual está regulado a la baja por CagA. Así, si una molécula inhibiera en algún punto la señalización de CagA, se observaría un aumento de la señal lumínica. Con el fin de cribar y clasificar los compuestos obtenidos realizaríamos un segundo ensayo con una cepa de *H. pylori* modificada que produjera CagA acoplada a una porción de nanoluciferasa, y la línea celular AGS que expresaría la porción restante. Un aumento en la emisión de luz implicaría que se ha producido la translocación de CagA-nanoluciferasa al interior celular. Por último, a partir de los “leads” obtenidos se realizaría un estudio pormenorizado por métodos estándar *in vitro* e *in vivo* de los procesos desencadenados por la infección.

Cita: Casablanca, Laura; Díez, Laura; Escobar, Daniela; Santano, Elena; Ortiz, Dean (2023) “High-Throughput phenotypic assay” para el descubrimiento de compuestos que previenen el cáncer gástrico asociado a la infección por *Helicobacter pylori*. Actas del VIII Congreso de Señalización Celular, SECUAH 2023. 21 a 24 de marzo, 2023. Universidad de Alcalá. Alcalá de Henares, Madrid. España. *dianas* 12 (1): e202303fp02. ISSN 1886-8746 (electronic) journal.dianas.e202303fp02 <https://dianas.web.uah.es/journal/e202303fp02>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Casablanca L, Díez L, Escobar D, Santano E, Ortiz D. 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 (CG) es el cuarto tipo de tumor con mayor incidencia y mortalidad en el mundo. Se estima que en el año 2020 se diagnosticaron más de 1 millón de casos a nivel mundial, de los cuales fallecieron 768.793 (7,7% de todas las muertes por cáncer) [1]. El CG se puede clasificar en tumores del área del cardias y tumores no-cardias. Este último representa la mayoría de casos, ya que se asocia principalmente con factores ambientales como el consumo de sal, alcohol, condimentos, benzopirenos, alimentos ultraprocesados y tabaco, entre otros. Sin embargo, su factor etiológico más importante es la infección por *Helicobacter pylori* [2].

La colonización del epitelio estomacal por *H. pylori* es la infección crónica más común en el mundo y uno de los principales factores que conlleva al desarrollo de CG. Se estima que aproximadamente el 50% de toda la población mundial está colonizada por dicho microorganismo y del 60 al 70% de todos los adenocarcinomas y linfomas gástricos son producidos por la inflamación crónica causada por esta bacteria [1]. Aunque la gran mayoría de personas infectadas por *H. pylori* no llega a desarrollar sintomatología severa, en el 20% se produce una gastritis atrófica y metaplasia intestinal, lo cual favorece el desarrollo de úlceras gástricas y cambios en la estructura celular, que acaban produciendo CG [3]. Por esta razón, *H. pylori* es clasificado como un carcinógeno de tipo I según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), una división de la Organización Mundial de la Salud (OMS) [4].

Para el manejo de esta infección es prioritario el diagnóstico temprano y la erradicación de la bacteria. La identificación normalmente se basa en un método no invasivo como el test de antígeno en heces o el test de urea en el aliento. Una vez diagnosticada, el tratamiento consiste en la administración de una terapia triple y cuádruple con antibióticos, sales de bismuto y un inhibidor de la bomba de protones [5]. Sin embargo, el mal uso de los antibióticos y la capacidad adaptativa de esta bacteria le han conferido múltiples sistemas de resistencia que dificultan su erradicación [6]. Por este motivo, la OMS ha clasificado a *H. pylori* como un patógeno prioritario para la salud pública a nivel mundial [7].

Uno de los principales problemas de la ineffectividad de las terapias actuales es que se prolonga el tiempo de exposición a los efectos patológicos causados por *H. pylori* en el epitelio gástrico, aumentando el riesgo de desarrollar metaplasia intestinal y CG. Siguiendo la tendencia actual, en los próximos años podría darse un incremento de estas patologías, lo cual tendría repercusiones importantes en la salud humana y en la carga de los sistemas sanitarios. Por tanto, nuestro objetivo es identificar compuestos para prevenir el desarrollo de metaplasia intestinal y CG producido por la infección por *H. pylori* de difícil erradicación.

Helicobacter pylori: mecanismos de patogenicidad

H. pylori es una bacteria anaerobia, gram negativa, flagelada que se transmite principalmente por vía fecal-oral, la falta de salubridad y la interacción con huéspedes infectados. Una vez en el interior del organismo, el ciclo de vida de la bacteria se divide en cuatro etapas: 1) adaptación al ambiente ácido del estómago, 2) movimiento hacia el epitelio estomacal, 3) adhesión y colonización y 4) daño celular y tisular [8].

Cuando *H. pylori* llega al estómago sobrevive al ambiente ácido del mismo gracias a la enzima ureasa que reduce el pH de su entorno y constituye la base del test diagnóstico de urea en aliento. La bacteria usa el flagelo para posicionarse en el epitelio gástrico, con el que interacciona mediante múltiples proteínas de membrana de la familia Hop (“*Helicobacter* outer membrane proteins”), que incluye SabA, BabA, HopQ, OipA, HopB y HopC [9].

La adhesión de la bacteria al epitelio gástrico constituye un paso fundamental, puesto que da inicio a la llamada “cascada de la carcinogénesis” de *H. pylori*. Seguidamente se produce la translocación de la proteína CagA mediante el sistema de secreción tipo IV (T4SS) bacteriano. CagA es responsable de la activación y alteración de diferentes vías de señalización que acaban promoviendo el desarrollo de CG. Algunas de las más destacadas son la vía de MAPK, las vías que involucran a la β -catenina, NF- κ B [10] y la vía de PAR-1 [11], entre otras (Figura 1).

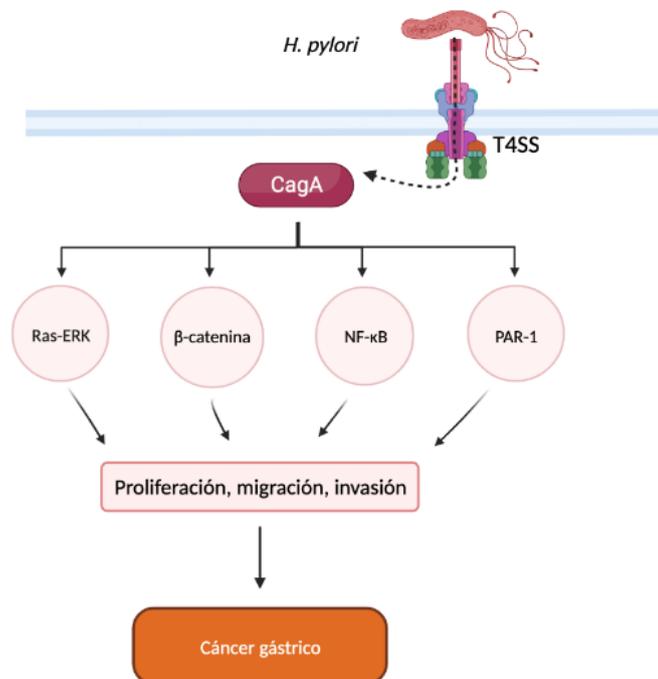


Figura 1.- Principales vías alteradas por CagA y su relación con el desarrollo de cáncer gástrico. Elaboración propia utilizando BioRender.

Una vez que CagA es translocada al interior celular mediante el T4SS, quinasas de la familia Src o c-Abl la fosforilan en residuos de tirosina de su motivo EPIYA. Esta fosforilación permite su interacción con el dominio SH₂ de la oncoproteína SHP₂, produciendo una estimulación aberrante de esta última y una activación prolongada de la vía de ERK. Esto promueve la progresión de fase G1 a S, aumentando así la proliferación celular, además de la migración y la invasión en las células epiteliales gástricas [12, 13].

Adicionalmente, varios mecanismos dependientes de CagA producen un incremento de la β -catenina citoplasmática y, por tanto, de la expresión de genes dependientes de ella. En concreto, CagA interacciona con las E-cadherinas, con el factor de transcripción RUNX3 y con las vías de WNT y PI3K, favoreciendo la translocación de β -catenina al núcleo para transcribir genes como c-Myc y TCF, implicados en proliferación, migración e invasión [14].

Metodología

“Target-based assay”

En una primera aproximación planteamos el desarrollo de un ensayo basado en diana (“target-based assay”). Las moléculas candidatas más prometedoras como blancos terapéuticos fueron la proteína de adhesión HopQ, el T4SS y la interacción EPIYA-SHP₂.

Proteína de adhesión HopQ

Se ha identificado que la proteína de la membrana externa HopQ favorece la adherencia y la translocación de CagA al actuar como un cofactor del T4SS. HopQ se une selectivamente a un conjunto de receptores de la familia de moléculas de adhesión celular CEACAM. Tanto el “knock-out” mediado por CRISPR/Cas9 de CEACAM como la inserción de una cepa mutante carente de HopQ mostraron una reducción de la translocación de CagA en estudios anteriores [15]. Esto supondría una disminución de los efectos carcinogénicos de dicha proteína, lo que convierte a HopQ en una interesante diana terapéutica.

Sistema de secreción tipo IV

El T4SS tiene una estructura altamente compleja formada por un mínimo de 12 proteínas codificadas en la isla de patogenicidad Cag-PAI [16]. Trabajos previos han demostrado que inhibidores que actúan a nivel de la ATPasa que forma parte de este sistema reducen la translocación de CagA al interior celular [17]. Al igual que en el caso anterior, esto conllevaría una disminución de los efectos oncogénicos de CagA.

Interacción EPIYA-SHP₂

Estudios anteriores han demostrado que SHP₂ tiene una elevada afinidad por los motivos EPIYA fosforilados de CagA y sugieren varias estrategias para diseñar posibles inhibidores [18]. La primera sería la utilización de un péptidomimético que contenga un motivo similar a EPIYA, de manera que imite a CagA para evitar la unión de esta con SHP₂. Otra alternativa podría ser la inhibición de la interacción entre SHP₂ y CagA (Figura 2) para impedir la activación de la vía de MAPK.

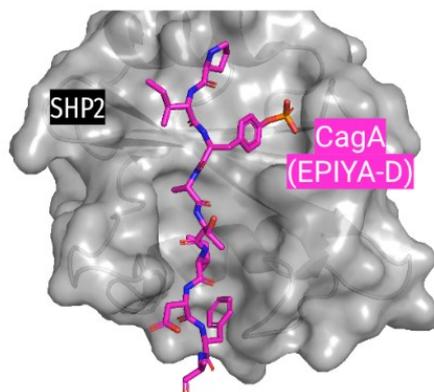


Figura 2.- Visualización tridimensional mediante PyMOL viewer de la estructura molecular de SHP₂ (“surface”) y su interacción con el motivo EPIYA de CagA (“sticks”).

A pesar de la existencia de dianas terapéuticas, uno de los principales inconvenientes a la hora de diseñar un ensayo “target-based” en patologías causadas por microorganismos es que son estructuras de alta complejidad y que utilizan numerosas vías de evasión para llegar a su objetivo. Debido a esto, como aproximación final planteamos la realización de un ensayo fenotípico.

Ensayo fenotípico: Diseño del “High-Throughput Screening” (HTS)

El diseño del HTS o cribado de alto rendimiento es un proceso de descubrimiento de fármacos que permite testar de forma rápida y automática una gran cantidad de compuestos. El HTS fenotípico propuesto en el presente trabajo teórico, comienza con la selección de un sensor celular localizado aguas abajo de la cascada de señalización inducida por CagA que reporte sobre la translocación de dicha proteína al interior celular.

Numerosos estudios han relacionado el gen supresor de tumores *runx3* con la inhibición del desarrollo de cáncer gástrico, en concreto, se ha observado que su expresión está disminuida en él y que su sobreexpresión inhibe la capacidad de invasión y migración de las células tumorales [19–21]. RUNX3 pertenece a una familia de factores de transcripción denominada RUNX, que consta de tres miembros, que comparten el dominio de unión al ADN 'Runt' altamente conservado [22].

En el contexto de la infección por *H. pylori*, CagA regula a la baja la expresión de este gen, fundamentalmente a través de la vía de MAPK, aunque también induce la metilación de su promotor o la degradación de la proteína por el proteasoma [21, 23, 24] (Figura 2). De este modo, un inhibidor de la vía a cualquier nivel supondría un aumento de la expresión de *runx3*, que podría ser detectado mediante algún método de screening.

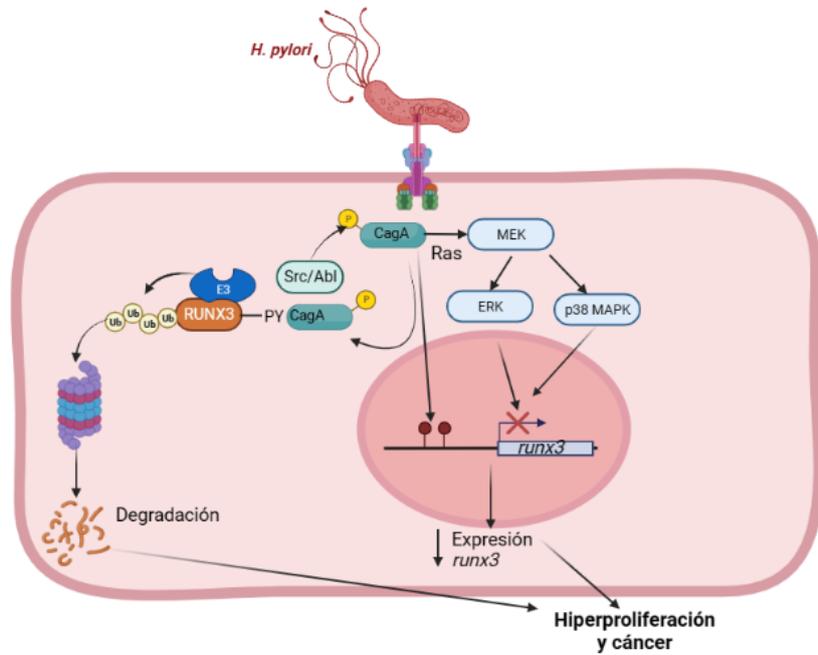


Figura 3.- Regulación de la expresión del gen *runx3* y de los niveles de proteína por CagA. Elaboración propia utilizando BioRender.

Una vez seleccionado el gen sensor y basándonos en trabajos anteriores [23], para el ensayo fenotípico *in vitro* se diseñaría un experimento en el que se sustituyera la secuencia codificante del gen *runx3* por la del gen de la luciferasa. En primer lugar, se amplificaría la secuencia promotora del gen de interés mediante PCR empleando unos primers específicos. En segundo lugar, dicha secuencia se clonaría en el vector básico pGL3 comprado de Promega (Figura 3) para construir el vector “reporter” que contendría así el gen de la luciferasa regulado por el promotor de *runx3*.

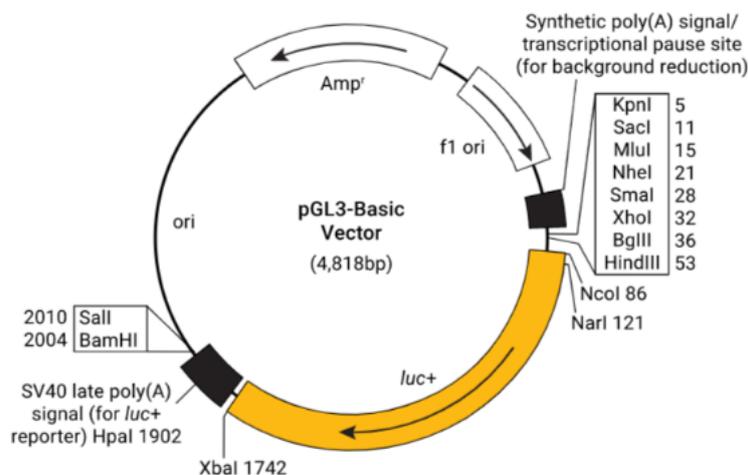


Figura 4.- Vector básico pGL3 que se emplearía para el clonaje de la secuencia promotora del gen *runx3* (Promega).

Un aspecto a tener en cuenta en el diseño es que debe ser realizado en células gástricas co-cultivadas con *H. pylori* para emular las condiciones fisiológicas en la que actúa CagA. Teniendo en cuenta esto, se cultivaría la línea de células epiteliales gástricas humanas GES-1 proporcionada por la American Type

Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA), en placas de 24 pocillos y se incubaría hasta alcanzar una confluencia del 90%. Posteriormente serían transfectadas con el vector construido anteriormente utilizando el reactivo de transfección FuGENE HD (Promega) (Figura 4). Los ensayos de luciferasa se realizarían utilizando el Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

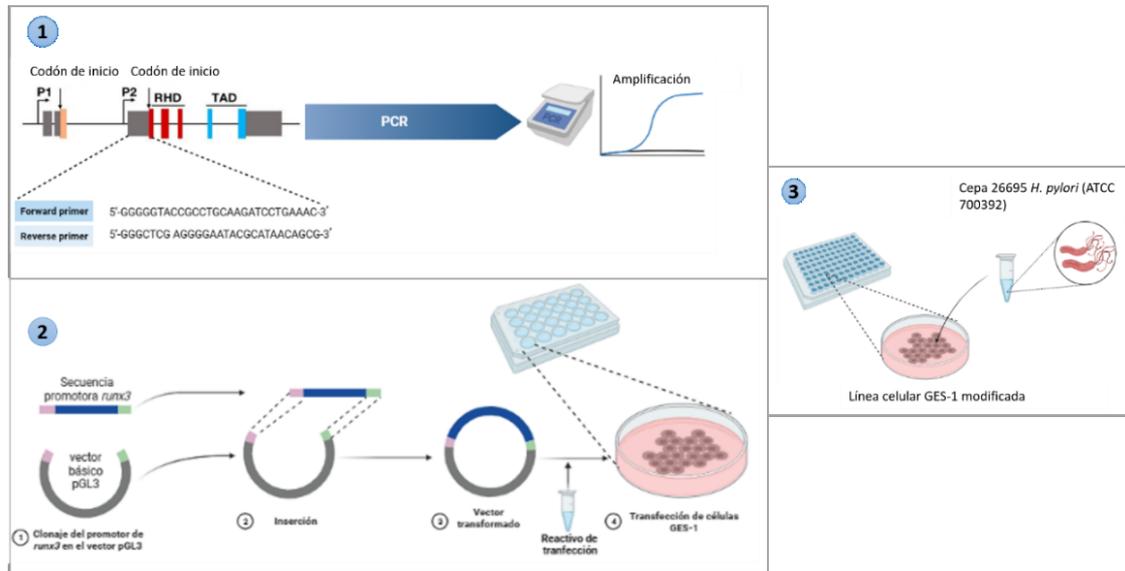


Figura 5.- Esquema de trabajo a seguir para el diseño del HTS. (1) Amplificación de la secuencia promotora del gen de *runx3*. Adaptado de [22]. (2) Clonaje de la secuencia amplificada en el vector básico pGL3 y transfección de células GES-1. (3) Co-cultivo de la línea celular modificada generada con la cepa de *H. pylori* 26695. Elaboración propia utilizando BioRender.

Por último, una vez generada una línea celular estable que contuviera el gen de la luciferasa bajo el control del promotor del gen de *runx3*, se realizaría un co-cultivo de dichas células con la cepa de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) en placas de 96 pocillos para seguidamente realizar el screening (HTS) de nuestra colección de compuestos. Cuando *H. pylori* infectara las células y CagA se translocara, disminuiría la emisión de luz por su efecto en la regulación de *runx3*, pero si una molécula (posible “hit”) inhibe en algún punto la señalización desencadenada por CagA, se incrementaría la expresión del gen regulado por el promotor de *runx3* y observaríamos un aumento de la señal lumínica (Figura 5).

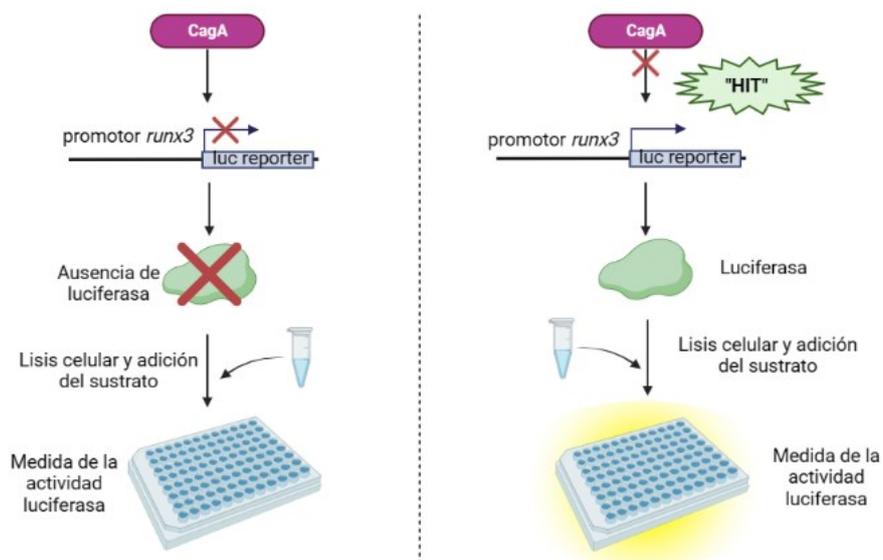


Figura 6.- Ensayo HTS basado en la emisión de luz. Aquellos compuestos que inhibieran la acción de CagA, no disminuirían la expresión del gen de la luciferasa, que se expresaría y provocaría una señal luminiscente. Elaboración propia utilizando BioRender.

Trabajos anteriores emplean un screening fenotípico de una quimioteca de peptidomiméticos que afectan a la función o ensamblaje del T4SS [25–27]. Estos compuestos que actuarían a nivel bacteriano son moléculas que poseen un esqueleto formado por un fragmento peptidomimético de 2-piridona fusionado con un anillo central. En el caso que nos ocupa, planteamos como posible alternativa realizar un screening de moléculas pequeñas que pudieran acceder tanto al interior de la bacteria como de la célula interfiriendo a cualquier nivel, provocando el mismo efecto fenotípico final.

Tras el HTS se obtendrían una serie de “hits” que producirían un aumento de la expresión de luciferasa visible en un incremento de la emisión de luz. El principal problema esperado es que debido a que el sensor estudiado está localizado aguas abajo de la vía de señalización de CagA podría haber multitud de dianas posibles y demasiados compuestos que tuvieran un efecto fenotípico final. Con el objetivo de hacer un cribado de dichas moléculas y facilitar el proceso de deconvolución de la diana posterior proponemos realizar un segundo ensayo que permitiera discriminar aquellos “hits” que actúan a nivel de la bacteria de los que lo hacen a nivel intracelular. Este se basaría en la utilización de una nanoluciferasa partida, técnica altamente sensible que varios estudios han empleado para la monitorización de la translocación de CagA [28, 29]. El ensayo requeriría emplear una cepa de *H. pylori* que produjera CagA con un tag de 11 residuos de la proteína luciferasa en el extremo N-terminal (CagA-HiBiT). También se precisaría de la línea celular AGS (ATCC CRL-1739), que se diseñaría para producir de forma estable el resto de la proteína luciferasa (NanoLuc-LgBiT). La luciferasa NanoLuc utilizada para estos ensayos es una forma pequeña altamente estable de la enzima que utiliza furimazina como sustrato y generaría una señal luminiscente. Tras el cultivo de *H. pylori* con las células gástricas, la translocación de CagA marcada con HiBiT permitiría la reconstitución de la actividad de la luciferasa y la emisión de luz (Figura 6).

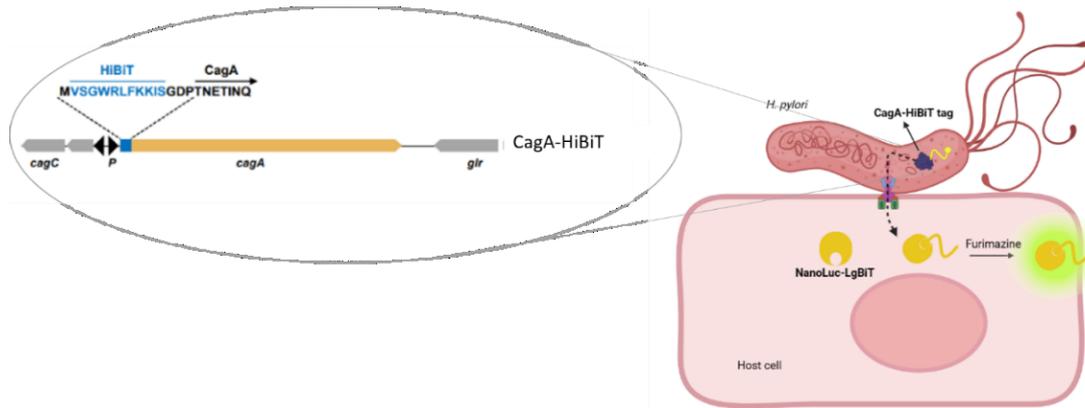


Figura 7.- Ensayo de nanoluciferasa partida para el cribado de los compuestos obtenidos en el HTS. La cepa de *H. pylori* empleada estaría diseñada para producir la proteína CagA fusionada con un péptido de 11 aminoácidos de la proteína luciferasa (CagA-HiBiT tag). Las células diana producirían el resto de la proteína luciferasa (NanoLuc-LgBiT). Tras la translocación de la proteína efectora en las células huésped, las dos proteínas interactuarían y, en presencia de un furimazina se generaría una señal luminiscente. Elaboración propia utilizando BioRender. Adaptado de [28, 29].

En el caso de aquellos compuestos que actuaran a nivel de la bacteria inhibiendo la translocación de CagA no se observaría señal, lo que permitiría diferenciarlos de aquellos que actuaran a nivel de las vías de señalización celulares alteradas por CagA (Figura 7). Además, CagA etiquetada con HiBiT translocada se ha comprobado que sufre fosforilación en tirosina dentro de las células gástricas y provoca cambios en la forma celular, similar a lo que se observa con CagA no modificada, por lo que la modificación no interfiere con los efectos ni fenotipos posteriores de la proteína [28].

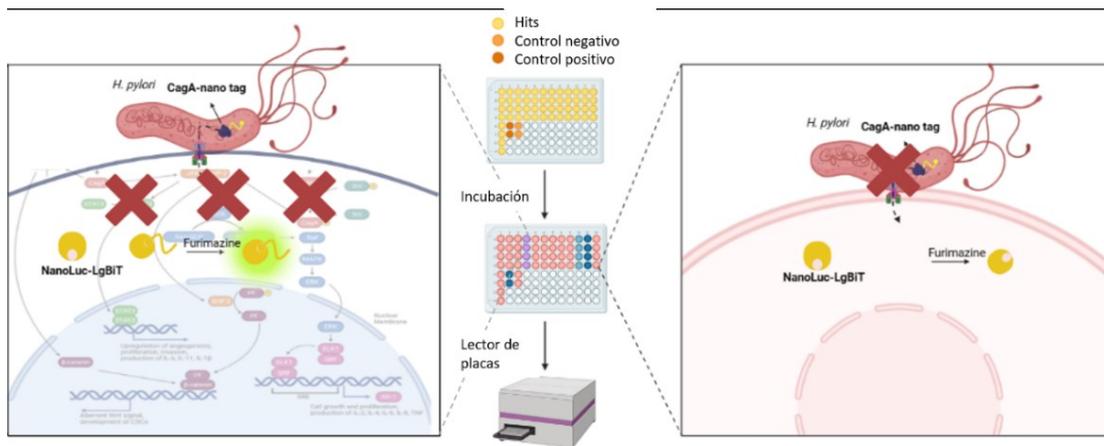


Figura 8.- Clasificación de los compuestos obtenidos tras el HTS en aquellos que actuaran inhibiendo la translocación de CagA a nivel bacteriano y en los que lo hacen a nivel intracelular. Los primeros no permitirían la reconstitución de la nanoluciferasa y, por tanto, no producirían emisión de luz, a diferencia de los segundos. Elaboración propia utilizando BioRender.

Después del cribado se obtendrían una serie de compuestos candidatos o “leads”, a partir de los cuales se realizaría un estudio pormenorizado de las rutas de señalización por métodos estándar.

Ensayos *in vitro*

Una vez realizado el HTS, se diseñarían diferentes ensayos *in vitro* para evaluar los “leads” previamente seleccionados. Para ello se emplearía la línea celular de adenocarcinoma gástrico AGS (ATCC CRL-1739), y la cepa de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392). En primer lugar se realizarían estudios de toxicidad mediante un ensayo MTT con el fin de evaluar la citotoxicidad de los compuestos y la viabilidad celular.

En segundo lugar, en aquellos compuestos que actuaran antes de la translocación de CagA (previamente clasificados gracias al cribado con CagA-nanoluciferasa) se estudiaría la formación de pili dependiente de T4SS, ya que en diversos estudios se ha observado que esta es fundamental para que CagA pase al interior celular [30]. Para ello, el cultivo de células infectadas con *H. pylori* se incubaría con los compuestos seleccionados durante 12 horas, tras las que se evidenciaría la presencia o ausencia de pili utilizando microscopía electrónica de barrido [25].

Seguidamente, se estudiaría la colonización de la superficie celular por *H. pylori* y su proliferación, puesto que trabajos anteriores han demostrado que CagA juega un papel principal en dicho proceso. Para ello, se cultivarían las células en un “transwell” con el fin de plasmar mejor el ambiente celular, se infectarían las células y, a continuación, se incubarían con los diferentes compuestos. Posteriormente se observarían por microscopía de fluorescencia confocal usando anticuerpos anti ZO-1 y anti-HP a diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) y se realizaría una cuantificación del volumen de fluorescencia [31].

Por último, para conocer a qué nivel actuarían aquellos compuestos que interfieren con la actividad celular de CagA, se estudiarían las diferentes vías de señalización desencadenadas por dicha proteína mediante Western Blot. Para ello se cultivarían las células previamente infectadas con la cepa de *H. pylori* con los compuestos de interés y se analizaría: la activación de CagA comparando la proteína fosforilada y sin fosforilar [25], y la activación de proteínas pertenecientes a las diferentes vías de señalización.

Ensayos *in vivo*

Los compuestos que mejores resultados arrojen pasarían a ser evaluados en modelos animales. Basándonos en otros estudios, diseñaríamos diferentes ensayos *in vivo* utilizando modelos de ratas Wistar, ratones Swiss-Webster o jerbos mongoles SPF. Éstos se mantendrían en jaulas individuales, con acceso restringido a los alimentos (9 a 10 a.m. y 5 a 6 p.m.), lo que permite un ayuno adecuado para las administraciones de *H. pylori* [32–34].

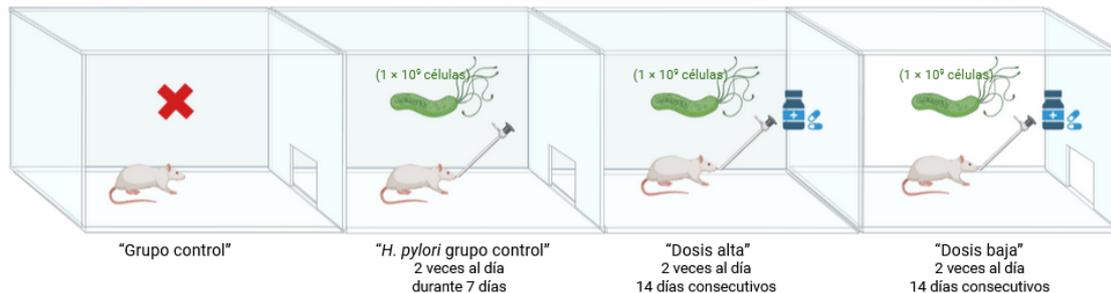


Figura 9.- Grupos de animales para estudios *in vivo*. “Grupo control” compuesto por animales no inoculados con *H. pylori*; “grupo control *H. pylori*” compuesto por animales inoculados por vía orogástrica con *H. pylori* (1×10^9 células) que no recibieron tratamiento; “dosis alta” y “dosis baja” administrados todos los días con el compuesto de interés durante doce semanas además de la inoculación de *H. pylori* (1×10^9 células). Elaboración propia utilizando BioRender.

La inoculación intragástrica se realizaría dos veces al día durante siete días con 1 mL de diferentes cepas de *H. pylori*: *H. pylori* ATCC 43504 (Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz/RJ, Brasil), *H. pylori* ATCC 49503 (American Type Culture Collection, Manassas, EE. UU). Estas se cultivarían previamente con suero bovino al 10% a 37°C 72h en atmósfera humidificada con 5% CO₂ y mantenidas en caldo Mueller-Hinton a -20°C.

Los animales serían sacrificados en diferentes tiempos post-administración (0, 6, 12 semanas) para análisis inmunohistoquímicos e histopatológicos del tejido estomacal. En el caso de existir infección por *H. pylori*, observaríamos una infiltración de células inflamatorias, reducción de estructuras glandulares, y aumento de tamaño nuclear de las células epiteliales, así como figuras mitóticas ocasionales, consecuencia del daño epitelial causado por la infección.

Como alternativa, para trasladar las principales características de la patogenia de CagA sin tener en cuenta el proceso de infección, utilizaríamos un modelo transgénico de zebrafish que sobreexpresa CagA regulado por un promotor de actina. Este no requeriría el empleo de una cepa de *H. Pylori* e induce patología intestinal dando lugar a un aumento de la proliferación epitelial (independiente de la fosforilación de CagA), acumulación de β -catenina e hiperplasia intestinal [35].

Por último, en lo que respecta a la posible vía de administración, la vía oral conduce a tiempos de vaciado gástrico impredecibles, además de a una liberación parcial del fármaco [36]. Por ello, otra alternativa a explorar sería la utilización de micropartículas porosas gastroretentivas. Este sistema se basa en micropartículas porosas fabricadas mediante electrospray cargadas de fármacos que actúan localmente en el estómago [37, 38]. Estas micropartículas presentan una menor densidad en comparación con el contenido gástrico, por lo que permanecen flotando en el estómago, aumentando la gastroretención y reduciendo las fluctuaciones de sus concentraciones plasmáticas. Así, el fármaco se libera lentamente y de manera continua, mejorando la biodisponibilidad y reduciendo los efectos adversos. Tras la administración, para medir la biodistribución de los compuestos *in vivo*, se realizaría un marcaje isotópico de estas micropartículas con ^{131}I seguido de escaneos por gamma-imaging.

Discusión y conclusiones

La infección por *H. pylori* es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en todo el mundo. Se ha demostrado que es uno de los agentes etiológicos más importantes del CG, que continúa siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Tanto es así, que la OMS ha clasificado a *H. pylori* como un carcinógeno de tipo I [3]. La erradicación de la infección es la principal estrategia para la prevención del CG. Sin embargo, se está viendo dificultada por el notable aumento de las resistencias a los tratamientos antibióticos actuales [6], lo que conlleva un mayor tiempo de exposición al factor de patogenicidad CagA, principal promotor de la carcinogénesis gástrica. Por este motivo, en este trabajo teórico proponemos la realización de un HTS fenotípico con el fin de encontrar compuestos que impidan la acción de la proteína CagA para prevenir así el desarrollo de CG en sujetos que estén expuestos de forma prolongada a la infección por *H. pylori*.

Numerosos estudios han realizado ensayos basados en diana con este propósito. M. Hilleringmann *et al.* identificaron inhibidores de la ATPasa del T4SS mediante HTS [17]. Del mismo modo, J. Sayer *et al.* diseñaron y sintetizaron compuestos que inhibían este componente bacteriano [26, 27]. A pesar de ser una prometedora diana terapéutica, el T4SS es una estructura de elevada complejidad, lo cual hace necesario más estudios acerca de su funcionamiento. Por ello creemos que un ensayo fenotípico basado en la selección de compuestos que tengan un determinado efecto final es una buena aproximación para abordar nuestro objetivo.

Una de las limitaciones del diseño del HTS fenotípico es la obtención de una gran cantidad de moléculas que pueden tener el mismo efecto biológico. Por ello, exponemos las ventajas de realizar un segundo ensayo de cribado, que no solo facilitaría la clasificación de los “hits” obtenidos en el HTS, sino también el proceso de deconvolución de la diana posterior.

En conclusión, consideramos que el presente trabajo teórico podría aportar numerosos beneficios teniendo en cuenta el notable incremento de las multirresistencias bacterianas, así como la elevada prevalencia de CG asociado a la infección por *H. pylori*, y los costes económicos, sociales y sanitarios que todo esto conlleva.

Referencias

1. H. Sung *et al.* 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.*, 71 (3): 209–249, doi: 10.3322/caac.21660.
2. Y. Lu, F. Xiao, Y. Wang, Z. Wang, D. Liu, and F. Hong. 2022. Prevalence of *Helicobacter pylori* in Non-Cardia Gastric Cancer in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Oncol.*, 12: 1–10, doi: 10.3389/fonc.2022.850389.
3. H. J. Ahn and D. S. Lee. 2015. *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis. *World J. Gastrointest. Oncol.*, 7 (12): 455–465, doi: 10.4251/wjgo.v7.i12.455.
4. J. Y. Park, D. Forman, L. A. Waskito, Y. Yamaoka, and J. E. Crabtree. 2018. Epidemiology of *Helicobacter pylori* and CagA-positive infections and global variations in gastric cancer. *Toxins (Basel)*, 10 (4), doi: 10.3390/toxins10040163.
5. P. Katelaris *et al.* 2023. *Helicobacter pylori* World Gastroenterology Organization Global Guideline. *J. Clin. Gastroenterol.*, 57 (2): 111–126, doi: 10.1097/MCG.0000000000001719.
6. E. Tshibangu-Kabamba and Y. Yamaoka. 2021. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance — from biology to clinical implications. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 18 (9): 613–629, doi: 10.1038/s41575-021-00449-x.
7. E. Tacconelli *et al.* 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 18: 318–27, doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.

8. Q. Luo, N. Liu, S. Pu, Z. Zhuang, H. Gong, and D. Zhang. 2023. A review on the research progress on non-pharmacological therapy of *Helicobacter pylori*. *Front. Microbiol.*, 14: 1–12, doi: 10.3389/fmicb.2023.1134254.
9. C. Xu, D. M. Soyfoo, Y. Wu, and S. Xu. 2020. Virulence of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins: an updated review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 39 (10): 1821–1830, doi: 10.1007/s10096-020-03948-y.
10. G. Maubach, M. Vieth, F. Boccellato, and M. Naumann. 2022. *Helicobacter pylori*-induced NF- κ B: trailblazer for gastric pathophysiology. *Trends Mol. Med.*, 28 (3): 210–222, doi: 10.1016/j.molmed.2021.12.005.
11. M. Hatakeyama. 2008. SagA of CagA in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11 (1): 30–37, doi: 10.1016/j.mib.2007.12.003.
12. M. Hatakeyama. 2009. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *J. Gastroenterol.*, 44 (4): 239–248, doi: 10.1007/s00535-009-0014-1.
13. L. Nagase, T. Hayashi, T. Senda, and M. Hatakeyama. 2015. Dramatic increase in SHP2 binding activity of *Helicobacter pylori* Western CagA by EPIYA-C duplication: Its implications in gastric carcinogenesis. *Sci. Rep.*, 5: 1–13, doi: 10.1038/srep15749.
14. O. Silva-García, J. J. Valdez-Alarcón, and V. M. Baizabal-Aguirre. 2019. Wnt/ β -catenin signaling as a molecular target by pathogenic bacteria. *Front. Immunol.*, 10: 1–14, doi: 10.3389/fimmu.2019.02135.
15. Q. Zhao *et al.* 2018. Integrin but not CEACAM receptors are dispensable for *Helicobacter pylori* CagA translocation. *PLoS Pathog.*, 14 (10), doi: 10.1371/journal.ppat.1007359.
16. J. M. Chung *et al.* 2019. Structure of the *Helicobacter pylori* cag type iv secretion system. *Elife*, 8: 1–15, doi: 10.7554/eLife.47644.
17. M. Hilleringmann *et al.* 2006. Inhibitors of *Helicobacter pylori* ATPase Cag α block CagA transport and cag virulence. *Microbiology*, 152 (10): 2919–2930, doi: 10.1099/mic.0.28984-0.
18. Z. Wang *et al.* 2022. Structural Insights into the Binding Propensity of Human SHIP2 SH2 to Oncogenic CagA Isoforms from *Helicobacter pylori*. *Int. J. Mol. Sci.*, 23 (19), doi: 10.3390/ijms231911299.
19. J. Yu, X. Tian, J. Chang, P. Liu, and R. Zhang. 2017. RUNX3 inhibits the proliferation and metastasis of gastric cancer through regulating miR-182/HOXA9. *Biomed. Pharmacother.*, 96 (110): 782–791, doi: 10.1016/j.biopha.2017.08.144.
20. J. Lotem *et al.* 2017. Runx3 in immunity, inflammation and cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 962: 369–393, doi: 10.1007/978-981-10-3233-2_23.
21. Y. Qu, S. Dang, and P. Hou. 2013. Gene methylation in gastric cancer. *Clin. Chim. Acta*, 424: 53–65, doi: 10.1016/j.cca.2013.05.002.
22. H. Yi, Y. He, Q. Zhu, and L. Fang. 2022. RUNX Proteins as Epigenetic Modulators in Cancer. *Cells*, 11 (22): 1–14, doi: 10.3390/cells11223687.
23. Z. Liu *et al.* 2012. *Helicobacter pylori* caga inhibits the expression of Runx3 Via Src/MEK/ERK and p38 MAPK pathways in gastric epithelial cell. *J. Cell. Biochem.*, 113 (3): 1080–1086, doi: 10.1002/jcb.23440.
24. Y. H. Tsang *et al.* 2010. *Helicobacter pylori* CagA targets gastric tumor suppressor RUNX3 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene*, 29 (41): 5643–5650, doi: 10.1038/onc.2010.304.
25. C. L. Shaffer *et al.* 2016. Peptidomimetic small molecules disrupt type IV secretion system activity in diverse bacterial pathogens. *MBio*, 7 (2): 1–10, doi: 10.1128/mBio.00221-16.
26. J. R. Sayer *et al.* 2014. 2- and 3-substituted imidazo[1,2-a]pyrazines as inhibitors of bacterial type IV secretion. *Bioorganic Med. Chem.*, 22 (22): 6459–6470, doi: 10.1016/j.bmc.2014.09.036.
27. J. R. Sayer *et al.* 2021. Design, synthesis, and evaluation of peptide-imidazo[1,2-a]pyrazine bioconjugates as potential bivalent inhibitors of the VirB11 ATPase HP0525. *J. Pept. Sci.*, 27 (10): 1–13, doi: 10.1002/psc.3353.
28. C. Lettl, R. Haas, and W. Fischer. 2021. Kinetics of CagA type IV secretion by *Helicobacter pylori* and the requirement for substrate unfolding. *Mol. Microbiol.*, 116 (3): 794–807, doi: 10.1111/mmi.14772.
29. T. L. Cover. 2021. Tracking bacterial effector protein delivery into host cells. *Mol. Microbiol.*, 116 (3): 724–728, doi: 10.1111/mmi.14784.

30. C. L. Shaffer *et al.* 2011. *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type iv secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog.*, 7 (9), doi: 10.1371/journal.ppat.1002237.
31. S. Tan, L. S. Tompkins, and M. R. Amieva. 2009. *Helicobacter pylori* usurps cell polarity to turn the cell surface into a replicative niche. *PLoS Pathog.*, 5 (5), doi: 10.1371/journal.ppat.1000407.
32. M. do C. Souza *et al.* 2009. In vitro and in vivo anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *J. Ethnopharmacol.*, 123 (3): 452–458, doi: 10.1016/j.jep.2009.03.030.
33. R. A. H. Ishak, G. A. S. Awad, N. D. Mortada, and S. A. K. Nour. 2007. Preparation, in vitro and in vivo evaluation of stomach-specific metronidazole-loaded alginate beads as local anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J. Control. Release*, 119 (2): 207–214, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.02.012.
34. H. J. Woo *et al.* 2020. Inhibitory effects of β -caryophyllene on *Helicobacter pylori* infection in vitro and in vivo. *Int. J. Mol. Sci.*, 21 (3): 1–14, doi: 10.3390/ijms21031008.
35. J. T. Neal, T. S. Peterson, M. L. Kent, and K. Guillemin. 2013. *H. pylori* virulence factor CagA increases intestinal cell proliferation by Wnt pathway activation in a transgenic zebrafish model. *DMM Dis. Model. Mech.*, 6 (3): 802–810, doi: 10.1242/dmm.011163.
36. J. C. Yang, C. W. Lu, and C. J. Lin. 2014. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. *World J. Gastroenterol.*, 20 (18): 5283–5293, doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5283.
37. S. Hao *et al.* 2014. A novel gastroretentive porous microparticle for anti-*Helicobacter pylori* therapy: Preparation, in vitro and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.*, 463 (1): 10–21, doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.12.052.
38. A. Adebisi and B. R. Conway. 2011. Gastroretentive microparticles for drug delivery applications. *J. Microencapsul.*, 28 (8): 689–708, doi: 10.3109/02652048.2011.590613.