



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA
“Diseño *in silico* de antibióticos piperidínicos
para *Helicobacter pylori* causal del cáncer
estomacal”

Tesis para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Miguel Alejandro Davalos Navarro

Director de tesis:

Dr. Alan Carrasco Carballo

Codirector de tesis:

Dra. María Laura Asunción Orea Flores

Fecha:

Agosto 2023





El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica del Centro de Química del Instituto de Ciencias, bajo la dirección del Dr. Alan Carrasco Carballo y la Dra. María Laura Asunción Orea Flores.

DEDICATORIA

A mi madre, quien nunca ha dejado de darme su incondicional amor, apoyo y comprensión, doy gracias a la vida por haber sido premiado con una madre tan ejemplar como ella.

A mi padre, la persona que se encargó de inculcarme este amor y fascinación por la ciencia. No estaría aquí si no fuera por todo lo que aprendí de al escucharte desde que era pequeño.

A mis hermanos, con quienes me enorgullece de haber crecido y por haber tenido la oportunidad poder aprender tantas cosas de ellos. Jamás dejaron de creer en mí y me han dado todo el apoyo que un hermano podría esperar recibir.

A todos mis amigos, que me han brindado su amistad a lo largo de todos estos años y con quienes compartí tantas cosas y a su vez pude aprender también demasiadas cosas de ellos.

A todos, gracias. Este trabajo jamás se habría hecho sin ustedes y es tan mío como también lo es suyo.

Agradecimientos

En esta sección van los agradecimientos normalmente a sinodales, comisión revisora, asesores, instituciones, etc.

Al Dr. Alan Carrasco Carballo y a la Dra. María Asunción Laura Orea Flores, por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo bajo su dirección, este trabajo no se podría haber realizado sin su apoyo, sus enseñanzas y todo su conocimiento.

Al Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica (LESQO), por dame su apoyo y a su vez permitirme formar parte de un laboratorio lleno de personas sumamente competentes y hacerme sentir parte de ellos.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), por acogerme durante toda mi vida universitaria, donde aprendí a formarme académica y personalmente, y a la cual me llena de orgullo saber que pertenezco.

A los sinodales y a la comisión revisora, por tomarse el tiempo de leer este trabajo de investigación.

Índice

Símbolos y abreviaturas	VII
Índice de esquemas.....	VIII
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas	IX
RESUMEN	X
1.0 Antecedentes.....	1
1.1 Prevalencia de la infección por <i>H. pylori</i>	3
1.2 Tratamientos actuales	6
1.2.1 Tratamientos de rescate	7
1.2.2 Segunda línea de tratamiento.....	7
1.2.3 Tercera línea de tratamiento	7
1.2.4 Cuarta línea de tratamiento.....	7
1.2.5 Uso de probióticos	8
1.2.6 Alérgicos a la penicilina	8
1.2.7 Tratamientos del <i>H. pylori</i> en niños	8
1.2.8 Úlcera duodenal.....	9
1.2.9 Úlcera gástrica	9
1.2.10 Hemorragia digestiva alta por úlcera péptica	9
1.3 Posibles dianas de <i>H. pylori</i>	9
1.3.1 PBP	9
1.3.2 Subunidad 30S.....	10
1.4 Cáncer de estómago.....	11
1.4.1 Síntomas y diagnóstico.....	13
1.5 Diseño in silico de antimicrobianos	13
1.5.1 Diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD).....	14
1.5.2 Acoplamiento molecular	15
2.0 Objetivos.....	16
Objetivo general	16
Objetivos particulares.....	16
3.0 Metodología.....	17

3.1 Preparación de Ligandos y Proteínas.....	17
3.2 Docking Molecular	17
3.3 Análisis estadístico	17
4.0 Discusión de resultados	18
4.1 PBP3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
4.1.1 Análisis de O vs H.....	20
4.1.2 Análisis en R1 y R2.....	21
4.1.3 Análisis de SR1 y SR2	21
4.1.4 Análisis energético e interaccional	22
4.2 PBP3 de <i>Chlamydia trachomatis</i>	23
4.2.1 Análisis de O vs H.....	24
4.2.2 Análisis en R ¹ y R ²	25
4.2.3 Análisis de SR1 y SR2	25
4.2.4 Análisis energético e interaccional	26
4.3 Subunidad 30S.....	27
4.3.1 Análisis de O vs H.....	28
4.3.2 Análisis en R1 y R2.....	28
4.3.3 Análisis de SR1 y SR2	29
4.3.4 Análisis energético e interaccional	30
4.4 Integración de las proteínas	31
Conclusiones.....	33
Bibliografía.....	34

Símbolos y abreviaturas

H. pylori: Helicobacter pylori.

P. aeruginosa: Pseudomonas aeruginosa

C. trachomatis: Chlamydia trachomatis

TET: Tetraciclina.

LEV: Levofloxacino.

MTZ: Metronidazol.

IBP: Inhibidor de la bomba de protones.

VON: Vonoprazán.

BIS: Subcitrato de Bismuto Coloidal.

AMO: Amoxicilina.

CLA: Claritromicina.

AINEs: Antiinflamatorio no esteroideo.

MALT: Tejido linfoide asociado a la mucosa.

PBP: Proteínas fijadoras de penicilina

UGE: Unión gastroesofágica

SG: Supervivencia global.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SBDD: Diseño de fármacos basado en la estructura.

Índice de esquemas

Esquema 1. Diagrama de flujo de trabajo de diseño de piperidonas y piperidinas antibióticas.	18
Esquema 2. Diagrama de Venn de los resultados obtenidos.	31

Índice de figuras

Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión. <i>H. pylori</i> aislado a partir de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica	1
Figura 2. Colonización por <i>H. pylori</i> . <i>H. pylori</i> ingresa al estómago y la actividad de la ureasa reduce la acidez del ambiente local. La motilidad mediada por flagelos de <i>H. pylori</i> facilita su movimiento hacia la mucosa inferior y entra en el epitelio con la ayuda de varias adhesinas, incluidas babA y sabA. Una vez que el epitelio se coloniza con éxito, <i>H. pylori</i> libera toxinas que incluyen cagA y vacA.....	2
Figura 3. Inhibición de la síntesis proteínica bacteriana por las tetraciclinas	10
Figura 4. Resumen de prueba de normalidad de estudios con PBP3 de <i>P. aeruginosa</i>	19
Figura 5. Piperidona antibiótica X para <i>P. aeruginosa</i>	22
Figura 6. Piperidona antibiótica Z para <i>P. aeruginosa</i>	23
Figura 7. Resumen de prueba de normalidad de estudios con PBP3 de <i>Chlamydia trachomatis</i>	24
Figura 8. Piperidina antibiótica X para <i>C. trachomatis</i>	26
Figura 9. Piperidona antibiótica Z para <i>C. trachomatis</i>	27
Figura 10. Resumen de prueba de normalidad de estudios con la subunidad 30S	28
Figura 11. Piperidina antibiótica X para la subunidad 30S	30
Figura 12. Piperidona antibiótica Z para la subunidad 30S.....	31

Índice de tablas

Tabla 1. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis del estado de oxidación.	20
Tabla 2. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R1.	21
Tabla 3. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R2.	21
Tabla 4. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR1.	21
Tabla 5. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR2.	22
Tabla 6. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis del estado de oxidación.	24
Tabla 7. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R1.	25
Tabla 8. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R2.	25
Tabla 9. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR1.	25
Tabla 10. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR2.	26
Tabla 11. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis del estado de oxidación.	28
Tabla 12. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R1.	29
Tabla 13. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R2.	29
Tabla 14. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR1.	29
Tabla 15. Informe de Medianas de Kruskall-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR2.	29

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue el diseño *in silico* de antibióticos piperidónicos contra *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), la cual es la principal causante para el desarrollo del cáncer estomacal alrededor del mundo. Actualmente no existe ningún medicamento que sea utilizado exclusivamente para tratar a *H. pylori*, ya que la línea de tratamiento se basa primordialmente en cuan resistente es la cepa de la bacteria a los fármacos prescritos, por lo que según sea el caso se tendrá un manejo distinto para tratar la enfermedad. Por lo anterior mencionado es que se propuso el diseño de nuevos candidatos para tratar a esta bacteria mediante el uso de herramientas bioinformáticas, a su vez se realizó una comparación de su actividad antimicrobiana con respecto a los antibióticos que se ofrecen en el mercado. Para realizar lo anterior se realizó una preparación de los ligandos, así como de las proteínas asociadas al acoplamiento de penicilinas 3 (PBP3, por sus siglas en inglés) de las bacterias *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) y de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), adicionalmente, se realizó la preparación de un fragmento ribosomal de la subunidad 30S. Una vez terminada la preparación de los ligandos y las proteínas se corrió el docking molecular en la plataforma Glide. Finalmente, al obtener los resultados se les realizó un análisis estadístico el cual consistió en un estudio de normalidad. Los resultados de los candidatos fueron comparados con los fármacos comerciales, observándose un valor antimicrobiano superior en una considerable cantidad de los candidatos. Asimismo, se realizó una triple comparación para conocer que candidatos mantenían su capacidad antimicrobiana sin importar en que proteína fuera empleada, obteniendo de la misma solo a 3 moléculas, a las cuales se les podría considerar como las versátiles. Si bien los resultados obtenidos resultan prometedores para el desarrollo de futuros antibióticos es necesario seguir investigando y transferirlo a un estudio *in vitro*, con el cual se pueda conocer más acerca de los efectos y el mecanismo que presentan los candidatos al someterlos a pruebas con bacterias.

1.0 Antecedentes

En 1983, Barry Marshall y Robin Warren identificaron en un cultivo de mucosa gástrica un microorganismo que, debido a su semejanza con el género *Campylobacter*, lo nombraron como *Campylobacter pylordis*, posteriormente se le llamó *Campylobacter pylori* [1,2]. En 1989, Godwin y colaboradores observaron que este microorganismo presentaba características diferentes al género *Campylobacter*, por lo que consideraron que constituía un nuevo género nombrándolo con el término de *Helicobacter*, denominando a la nueva bacteria con el nombre de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) [3]. *H. pylori* es un bacilo gramnegativo, espirilado o con forma de S, es microaerofílico, mide aproximadamente de 2.5 a 4 micras de largo por 0.5 a 1.0 micras de ancho y presenta de 2 a 6 flagelos lofótricos (Fig.1) [4].

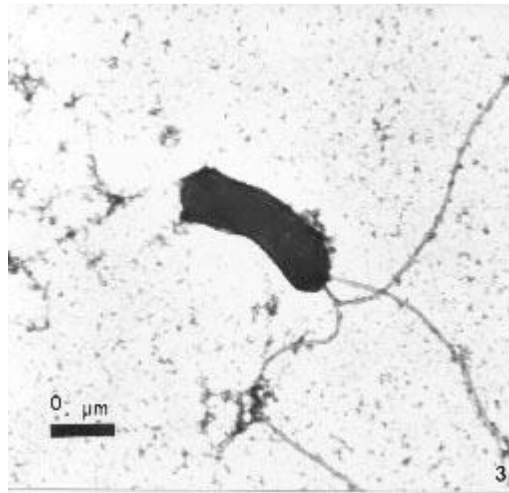


Figura 1. Micrografía electrónica de transmisión. *H. pylori* aislado a partir de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica

Crece a temperaturas de 37 °C y con atmosferas parciales de CO₂, su incubación requiere 72-96 h en primoaislamiento y de 48-72 en subcultivos [5]. Una característica específica de *H. pylori* es su capacidad para resistir las condiciones ácidas extremas del estómago. Para iniciar la colonización del estómago, *H. pylori* neutraliza las condiciones ácidas, se mueve hacia el epitelio gástrico del huésped y se une a los receptores de la célula huésped (Fig. 2) [6]. Se ha demostrado que el regulador de absorción férrico Fur, que regula la homeostasis del hierro, la aclimatación ácida y la respuesta oxidativa, son importantes para la colonización de *H. pylori* [7].

Una vez que *H. pylori* se une a los receptores de la célula huésped, libera proteínas efectoras y toxinas, incluido el gen A asociado a la citotoxina (*cagA*) y la citotoxina A vacuolante (*vacA*) [6]. El gen *cagA* prevalece en áreas de alta incidencia de cáncer gástrico y la presencia de *cagA* se asocia con un mayor riesgo de cáncer gástrico [8,9]. Una vez que la proteína CagA translocada se inyecta en el citoplasma de la célula huésped, puede alterar la

señalización de la célula huésped tanto de manera dependiente de la fosforilación como independiente de la fosforilación. VacA puede alterar el equilibrio de la proliferación y muerte celular al afectar los genes del ciclo celular, puede inducir respuestas inflamatorias agudas a través de la liberación de IL-8 de la célula huésped y puede inducir la liberación de citocromo C, estrés del retículo endoplásmico y apoptosis [6].

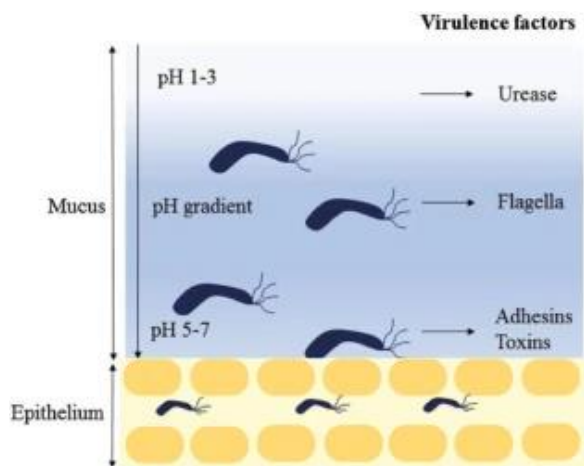


Figura 2. Colonización por *H. pylori*. La bacteria ingresa al estómago y la actividad de la ureasa reduce la acidez del ambiente local. La motilidad mediada por flagelos de *H. pylori* facilita su movimiento hacia la mucosa inferior y entra en el epitelio con la ayuda de varias adhesinas, incluidas babA y sabA. Una vez que el epitelio se coloniza con éxito, *H. pylori* libera toxinas que incluyen cagA y vacA.

La colonización del epitelio gástrico por *H. pylori* depende de su capacidad para nadar en el moco y su preferencia por los sitios de lesión del estómago, un tropismo que depende de la quimiotaxis [10]. Utilizando un modelo de organoides gástricos murinos (gastroides) en el que el daño unicelular podía introducirse por fotodaño y la reparación posterior ser monitoreada, se demostró que *H. pylori* se acumula rápidamente en el sitio del daño por medio de un mecanismo dependiente de la polimerización de actina y que limita localmente la reparación [11]. La adhesina de unión al antígeno del grupo sanguíneo (BabA) se une al antígeno del grupo sanguíneo Lewis b (Leb) o la adhesión de unión al ácido siálico (SabA) como el modo principal de adhesión de *H. pylori* al epitelio gástrico humano [12]. El genoma de *H. pylori* es altamente plástico, por lo cual se cree que la plasticidad y las altas tasas de recombinación intraespecífica mejoran la capacidad de *H. pylori* para colonizar el estómago [13].

H. pylori generalmente se adquiere en la infancia por transmisión fecal-oral u oral-oral [14]. Existe evidencia considerable de que *H. pylori* es una bacteria antigua que colonizó a los humanos hace al menos 100.000 años [15,16]. Por lo tanto, se puede utilizar para rastrear la

migración humana como una bacteria comensal y, al igual que los agentes infecciosos como *Mycobacterium tuberculosis* y el virus del papiloma humano, *H. pylori* presumiblemente ha coevolucionado con los humanos [17,18]. *H. pylori* se considera un miembro dominante de la microbiota gástrica humana [19].

1.1 Prevalencia de la infección por *H. pylori*

En muchos países, la incidencia de la infección por *H. pylori* ha ido disminuyendo en asociación con mejores niveles de vida [20,21]. Sin embargo, la prevalencia de esta bacteria sigue siendo ubicua, especialmente en el Extremo Oriente [20]. En la mayoría de las regiones, el principal mecanismo de propagación es la transmisión intrafamiliar [22]. La prevalencia sigue siendo alta en la mayoría de los países en desarrollo y generalmente está relacionada con el nivel socioeconómico y los niveles de higiene [23]. Según uno de los metaanálisis más recientes, la prevalencia más alta de *H. pylori* se encontró en África (79,1%), América Latina y el Caribe (63,4%) y Asia (54,7%), y la prevalencia más baja en América del Norte (37,1%) y Oceanía (24,4%) [23]. El segundo metaanálisis sugirió una prevalencia más baja, que informó una prevalencia global general de *H. pylori* del 44,3%, que oscila entre el 50,8% en los países en desarrollo y el 34,7% en los países desarrollados; la prevalencia de *H. pylori* fue similar entre hombres (46,3%) y mujeres (42,7%) [24].

Se realizó otra revisión sistemática abordando la prevalencia de *H. pylori* en países europeos. Se incluyeron un total de 52 estudios de 19 países publicados hasta octubre de 2015. La prevalencia más baja de *H. pylori* se informó en el norte de Europa, mientras que la más alta se registró en el este y el sur de Europa con hasta un 84% en Portugal y Polonia. Con el tiempo, se encontró una disminución en la prevalencia de la infección por *H. pylori* en un 19-28% durante el período de 10 a 21 años [25].

Haciendo un enfoque por regiones, un amplio estudio multicéntrico en la República Checa [26] demostró la disminución de la prevalencia de *H. pylori* del 41,7 % en 2001 al 23,5 % en 2011, sin cambios significativos en la prevalencia de dispepsia no investigada; los autores consideraron que esto era un argumento indirecto en contra de cualquier papel causal de *H. pylori* en la dispepsia no investigada. Se encontró una prevalencia de *H. pylori* del 49,8% entre los pacientes dispépticos en España [27].

Se informó seropositividad para *Helicobacter pylori* en el 28,9 % de los donantes de sangre alemanes de Magdeburg (44,4 % de positividad para CagA entre los positivos para *H. pylori*) [28] y en el 35,8 % de los pacientes dispépticos en Polonia, lo que marca una disminución sustancial con respecto al ~75 % existente 10 años antes [29].

En Dinamarca, un estudio de cohorte basado en la población inscribió a 3365 sujetos sanos en 1982-1983 para evaluar los posibles factores de riesgo de úlceras pépticas incidentales. En general, el 42,9 % estaban en el límite o eran positivos para anticuerpos IgG contra *H. pylori* [30].

Salehi et al. [31] informaron los resultados de un estudio transversal en el noreste de Irán realizado entre 2010 y 2015, en el que participaron 11 596 participantes. La positividad de anticuerpos IgG contra *H. pylori* fue del 72,8 %; no se observó ningún cambio en la seroprevalencia durante el período de estudio. En el mismo país, Dabiri et al [32] estudiaron la prevalencia del genotipo *H. pylori* en 160 pacientes dispépticos *H. pylori* positivos; Los genes *vacA*, *cagA*, *cagE*, *oipA*, *iceA1*, *babA2* y *babB* fueron positivos en el 100 %, 69 %, 51 %, 55 %, 26 %, 78 % y 28 % de 160 cepas, respectivamente. La presencia de *babB* y *iceA1* se correlacionó significativamente con un mayor riesgo de desarrollo de cáncer gástrico (CG). Un informe de Afganistán indicó una positividad de *H. pylori* del 75,7 % en una población de pacientes dispépticos [33].

Varios estudios se originaron en África. La prevalencia de *H. pylori* en pacientes dispépticos en el noroeste de Etiopía fue del 43 % en hombres y del 32 % en mujeres, [34] y mayor en Ghana: 71,1 % [35]. En esta última población de estudio, *vacAs1* estuvo presente en 69,2 %, *vacAm1* en 44,7 %, *vacAm2* en 22,0 % y *cagA* en 74,8 %; pero se encontró *vacAs1/cagA+* en el 72,6 % de los individuos positivos para *H. pylori* [35].

Se notificó una prevalencia potencialmente decreciente entre los pacientes argelinos; el informe reciente indicó una prevalencia del 57%, mientras que en la década de 1980 era > 80 %. Entre las 42 cepas bacterianas aisladas de 38 pacientes, la proporción de haplotipos fue: 33 hpEuropa y nueve hpNEAfrica [36].

Finalmente, Smith et al. [37] publicaron una revisión extensa de la epidemiología, los haplotipos, el manejo y la resistencia de *H. pylori* en África publicados entre 1965 y 2017. En muchos países africanos, la prevalencia entre individuos sanos supera el 50 %, mientras que en pacientes dispépticos la prevalencia es del 90%. Los estudios de varios países identificaron la correlación entre el nivel socioeconómico bajo y la prevalencia de *H. pylori*; sin embargo, tal correlación no se ha encontrado en Zambia. La pobreza devastadora en muchas partes del continente no permitió eliminar los factores de riesgo para la infección por *H. pylori*, que también incluye prácticas conductuales, como la premasticación de los alimentos. Los autores concluyeron que, aunque la incidencia de cáncer gástrico no es alta en África, la infección por *H. pylori* es un desafío importante para la salud pública. No se dispone de datos de prevalencia de todos los países del continente.

Respecto a Asia, un metaanálisis que involucró a 170 752 habitantes japoneses mostró que la prevalencia de *H. pylori* disminuyó constantemente en los nacidos entre 1948 y 2003, con una prevalencia prevista de infección del 60,9 % en los nacidos en 1910 y del 6,6 % en los nacidos en 2000. En personas nacidas después de 1998, la prevalencia de *H. pylori* fue inferior al 10% [38]. Un estudio realizado en un hospital en el suroeste de China que investigó la infección por *H. pylori* en 10 912 sujetos mediante la prueba del aliento con urea (UBT) informó una prevalencia del 34,4%, [39] mientras que un estudio prospectivo multicéntrico a nivel nacional que inscribió a 4734 adultos coreanos asintomáticos en siete áreas geográficas [40] mostró una seropositividad en el 51,0 % de los casos. Se encontró una

prevalencia más alta de *H. pylori* (80,0 %) entre los pacientes dispépticos de Mongolia [41]. Se encontraron tasas de positividad de *babA* más altas en países con alto riesgo de CG, Bután y Myanmar (91,8 % y 90,7 %, respectivamente), en comparación con Nepal y Bangladesh [42]. Otros estudios abordaron la prevalencia de genotipos de *H. pylori* en Nepal[43], Tailandia[44], India [45] y Vietnam[46]. En Tailandia, el tipo *cagA* de Asia oriental fue el genotipo predominante entre las cepas de Hmong, Chinos-tailandeses y Tailandeses (96,0 %, 85,7% y 62,7%, respectivamente), mientras que los Kayin tenían *cagA* mayoritariamente de tipo occidental (73,3%). En Vietnam, la positividad de *cagA* fue del 99,4 %, y de ellos, el 57,1 % eran del tipo de Asia oriental [46].

Huerta-Franco et al. [47] realizaron un estudio transversal, basado en la base de datos Center Health Facts en los Estados Unidos y con el objetivo de abordar las diferencias raciales/étnicas en los síntomas gastrointestinales y las enfermedades asociadas con la infección por *H. pylori*. El análisis abarcó el período de tiempo de 2000 a 2015, incluidos 11 130 663 pacientes, entre los cuales 152 086 fueron positivos para *H. pylori*. La prevalencia más alta de la infección se encontró en las poblaciones hispanas y nativas americanas/de Alaska. Los negros y los asiáticos del Pacífico/isleños presentaron el mayor riesgo relativo de dispepsia, úlcera péptica y gastritis atrófica asociada con la bacteria. Entre los coreano-estadounidenses, se encontró que la prevalencia de *H. pylori* era del 25,3 % [48].

Otro estudio de prevalencia de *H. pylori* se informó en Alaska[49]. En total, 710 participantes de seis comunidades y una ciudad urbana para representar cuatro regiones geográficas en Alaska fueron reclutados a partir de 1996 a 1997. La prevalencia de la infección fue de 68%-69% (dependiendo de la prueba utilizada). Los factores asociados con la positividad de *H. pylori* fueron: estatus racial nativo de Alaska, edad ≥ 20 años, región rural de residencia, vivir en una casa abarrotada y beber agua que no estaba entubada ni entregada [49].

Un par de estudios abordaron la epidemiología de *H. pylori* en poblaciones hispanas. En Texas, se informó una seropositividad general del 20 % en los hombres según las muestras del biorrepositorio recolectadas para estudiar el cáncer de próstata. Los participantes de origen hispano tuvieron una prevalencia significativamente mayor [50].

En el estado de Guerrero de México (suroeste del país), la prevalencia de *H. pylori* entre las referencias de endoscopia fue de 30.5% [51]. Un total del 80% de las cepas fueron *vacA* s1m1, y los genes *cagA* y *babA2* se detectaron en el 74% y el 32% de las cepas, respectivamente. Los genotipos más frecuentes fueron *vacA* s1m1/*cagA*(+)/ *babA2*(-) y *vacA* s1m1/*cagA*(+)/*babA2*(+), con una prevalencia del 40 % (20/50) y 28 % (14/50), respectivamente.

Un estudio poblacional transversal basado en un biorrepositorio (528 muestras) de Puerto Rico informó una prevalencia del 33% de *H. pylori* en esta población [52]; curiosamente, la infección fue menos común entre los sujetos que nunca se casaron. Otro estudio transversal

en Bolivia (263 voluntarios asintomáticos) encontró un 59% de sujetos infectados por *H. pylori* [53].

Se descubrió que los refugiados recién llegados a Australia tenían una prevalencia de *H. pylori* casi 1,5 veces mayor que la población australiana [54]. Sin embargo, en cifras absolutas, la prevalencia de la infección (21,5%) es generalmente más baja que en la mayoría de los casos informados sobre poblaciones migratorias en otras partes del mundo [55].

1.2 Tratamientos actuales

No hay medicamentos exclusivos para erradicar *H. pylori* [56]. Como tratamiento de primera línea de la infección se recomienda, según la IV Conferencia española de consenso sobre el tratamiento de la infección por *H. pylori*, una pauta cuádruple concomitante sin bismuto (IBP, claritromicina, amoxicilina y metronidazol). La elección del tratamiento de primera línea para la infección por *H. pylori* dependerá primordialmente de la tasa de resistencia de esta bacteria a los antibióticos prescritos. No se recomienda la terapia triple clásica (IBP, claritromicina y amoxicilina) cuando la tasa de resistencia a la erradicación es inaceptablemente baja [57].

Otros factores que influyen sobre la eficacia del tratamiento son el cumplimiento por parte del paciente y su historial previo de consumo de antibióticos, que podría condicionar la elección de la primera opción terapéutica [58].

La terapia cuádruple con bismuto (IBP, bismuto, tetraciclina y metronidazol) podría ser una alternativa válida al tratamiento cuádruple sin bismuto, dado que está constituida por fármacos, como el bismuto y tetraciclina frente a los que el *H.pylori* por sí solo, es resistente [59].

Un ensayo multicéntrico europeo demostró buenos resultados con Pylera® (una cápsula que contiene bismuto, tetraciclina y metronidazol) administrado durante 10 días, alcanzando una eficacia (confirmada mediante una única prueba del aliento) del 90% (significativamente superior a la de la terapia triple) [60].

Existen no obstante algunas limitaciones e incógnitas con relación a esta nueva formulación galénica (Pylera ®) como son:

- Está disponible en un formato único de 10 días, cuando podría ser que la duración de 14 días incrementara su eficacia frente a cepas de *H. pylori* resistentes a metronidazol.
- Incluye dosis relativamente bajas de tetraciclina (1.5 g/día cuando en el esquema clásico es de 2 g/día).
- Escasa experiencia y evidencia científica de esta nueva formulación terapéutica en el tratamiento de la infección.

- Aunque Pylera® mejorará probablemente el cumplimiento terapéutico, se desconoce si influirá en la aparición de efectos adversos [61].

1.2.1 Tratamientos de rescate

Aproximadamente un 20% del tratamiento inicial falla, incluyendo como causas: bajo cumplimiento por parte del paciente y resistencias de las cepas de *H. pylori* a los antibióticos prescritos [57].

1.2.2 Segunda línea de tratamiento

Los consensos internacionales recomiendan, tras el fracaso de un primer tratamiento que incluya CLA (triple o cuádruple concomitante (IBP, CLA, AMO, MTZ), evitar utilizar de nuevo este antibiótico e indicar la terapia triple o preferiblemente cuádruple con LEV, (IBP, LEV, AMO, BIS). Otra alternativa es una terapia cuádruple con Bismuto (IBP, BIS, MTZ, TET) [57,62,63].

1.2.3 Tercera línea de tratamiento

Se recomienda:

- No utilizar ni LEV, ni CLA, si se han utilizado en tratamientos previos, las cepas que sobreviven habrán adquirido resistencia a estos antibióticos y el tratamiento de rescate no sería eficaz. En cambio, se puede utilizar MTZ, ya que se ha observado que un porcentaje alto de pacientes con resistencia *in vitro* curan la infección, siempre que se administren tratamientos de más de 10 días y a altas dosis.
- En caso de que la terapia inicial fuera la cuádruple concomitante (IBP, CLA, AMO, MTZ) y la segunda terapia cuádruple con LEV y BIS (IBP, LEV, AMO, BIS), utilizar un tratamiento cuádruple con bismuto (IBP, BIS, MET, TET) de rescate.
- Otra opción es volver a utilizar el BIS con AMO y TET, pero combinado con otros antibióticos, no empleados previamente, como furazolidona [57,62].

1.2.4 Cuarta línea de tratamiento

Se recomienda persistir en el tratamiento de la infección sólo en pacientes con indicación muy clara como: úlceras, especialmente con hemorragia o linfoma MALT. Se debe evaluar cuidadosamente tanto la adherencia a tratamientos previos como la adherencia esperada a un nuevo tratamiento. La pauta recomendada incluye rifabutina (IBP, AMO y rifabutina) con un estricto control y seguimiento del paciente por mielotoxicidad que puede producir este medicamento, expresada por una leucopenia transitoria [64].

1.2.5 Uso de probióticos

No se ha evaluado la utilidad de los probióticos como coadyuvantes de las terapias cuádruple. La adición de un quinto fármaco, al tratamiento complica la posología, favorece a la adherencia bacteriana además de un aumento en el costo del tratamiento. Por tanto, no se recomienda su utilización rutinaria en la práctica clínica [57].

1.2.6 Alérgicos a la penicilina

En estas situaciones es preferible utilizar como primera línea la terapia cuádruple con bismuto (IBP, BIS, MTZ, TET). La triple terapia IBP, claritromicina y metronidazol debe restringirse a zonas en las que se evidencien tasas de erradicación superiores al 85%.

La terapia cuádruple con bismuto alcanza mejores resultados que la terapia triple con CLA (IBP, CLA, MTZ), con valores similares en la adherencia al tratamiento y en la incidencia de efectos adversos. Tras el fracaso de un tratamiento cuádruple con bismuto, se propone la terapia triple con LEV (IBP, LEV y CLA). Tras dos fracasos terapéuticos, se recomienda remitir a otro nivel asistencial para realizar cultivo con antibiograma y establecer un tratamiento guiado [63].

1.2.7 Tratamientos del *H. pylori* en niños

La erradicación de *H. pylori* se recomienda en presencia de úlcera péptica o anemia ferropénica inexplicada que no responde al tratamiento. Se puede considerar en niños con síntomas dispépticos cuando la infección por *H.pylori* se detecta a partir de una biopsia y en niños infectados con algún familiar de primer grado con cáncer gástrico [65,66].

No se debe utilizar tetraciclina en menores de 8 años pues puede provocar decoloración de la dentición. Si no hay resistencia a la claritromicina, se puede utilizar la pauta triple clásica (IBP, CLA, AMO). En caso de resistencia a claritromicina, se han propuesto los siguientes esquemas:

- IBP+amoxicilina+metronidazol durante 10-14 días.
- Sales de bismuto + amoxicilina + metronidazol durante 10-14 días.

La terapia cuádruple concomitante con IBP, claritromicina, amoxicilina y metronidazol durante 14 días no está validada en pediatría por el momento. En los casos de fracaso terapéutico, las alternativas son modificar los antibióticos, realizar antibiograma, si no se ha hecho previamente, intensificar las dosis o usar bismuto si no se ha usado previamente [66].

1.2.8 Úlcera duodenal

En los pacientes con úlcera duodenal no complicada que no requieren antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y/o aspirina no se recomienda mantener el tratamiento antisecretor tras haber finalizado el tratamiento erradicador de *H. pylori*. No obstante, en el caso de la úlcera duodenal complicada (hemorragia digestiva, perforación) es prudente administrar antisecretores hasta confirmar la erradicación del *H. pylori* [57].

1.2.9 Úlcera gástrica

En los pacientes con úlcera gástrica que no requieren AINE y/o aspirina se recomienda mantener el tratamiento antisecretor durante 4 a 8 semanas tras haber finalizado el tratamiento erradicador del *H. pylori*, especialmente si es mayor de 1 cm. Finalmente tras completar el tratamiento erradicador y continuar con IBP posterior, se debe realizar una revisión endoscópica para confirmar la cicatrización ulcerosa [57,67].

1.2.10 Hemorragia digestiva alta por úlcera péptica

En los pacientes con hemorragia digestiva por úlcera péptica, la erradicación de *H. pylori* elimina prácticamente la totalidad de recidiva. Una vez confirmada la erradicación y en ausencia de ingestión de AINEs, se recomienda no administrar tratamiento de mantenimiento con antisecretores [68].

1.3 Posibles dianas de *H. pylori*

Se han propuesto principalmente dos dianas para combatir a *H. pylori*. La primera opción es atacando a las proteínas fijadoras de penicilina (PBP, por sus siglas en ingles), evitando de este modo la biosíntesis de peptidoglucano. La segunda opción es la unión del fármaco al ribosoma 30S bacteriano inhibiendo de este modo la síntesis bacteriana.

1.3.1 PBP

Las PBP son serina aciltransferasas que tienen actividad transpeptidasa, transglucosilasa y carboxipeptidasa, por lo que pueden entrelazar los componentes del peptidoglucano [69]. Además de catalizar la formación de peptidoglucano entrecruzado, también es el objetivo de los antibióticos betalactámicos. Los β -lactámicos bloquean estas enzimas porque el anillo β -lactámico tiene una estructura espacial similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las cadenas del peptidoglucano, que es el sustrato natural de las PBP [70]. Al unirse a la hendidura catalítica de la PBP, los betalactámicos se asocian covalentemente con la serina del sitio activo; la acil-enzima resultante solo se puede hidrolizar a una velocidad muy lenta, lo que reduce la cantidad de entrecruzamiento de peptidoglucano [71]. Las β -lactamasas, sin

embargo, son capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico con tasas de recambio extremadamente altas [72].

Una vez que una PBP es acilada por un antibiótico β -lactámico, no puede catalizar la hidrólisis del intermedio covalente de acil-enzima y se inactiva; la transpeptidación de peptidoglucano no puede ocurrir y la pared celular se debilita. Aunque este hecho ha sido el baluarte de la acción de los antibióticos β -lactámicos durante décadas, la aparición de cepas resistentes a los medicamentos ha demostrado ser un problema mundial. Algunos patógenos gran(-) evaden la acción de los betalactámicos excretando β -lactamasas en el periplasma [71]. También se observan con frecuencia mutaciones o transferencias de genes en mosaico con bacterias naturalmente competentes. Por ejemplo, alteraciones en PBP-1a confieren resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Helicobacter pylori* [73].

1.3.2 Subunidad 30S

El mRNA se une con la subunidad 30S del RNA ribosómico bacteriano. El sitio P (peptidilo) de la subunidad de RNA ribosómica 50S contiene la cadena polipeptídica naciente; en condiciones normales, el aminoacil tRNA cargado con el siguiente aminoácido que se agrega se mueve al sitio A (aceptor), con emparejamiento de bases complementarias entre la secuencia de anticodón de tRNA y la secuencia de codón del mRNA. Las tetraciclinas se unen con la subunidad 30S, bloquean la unión de tRNA con el sitio A y, por tanto, inhiben la síntesis de proteínas (Figura 3) [74].

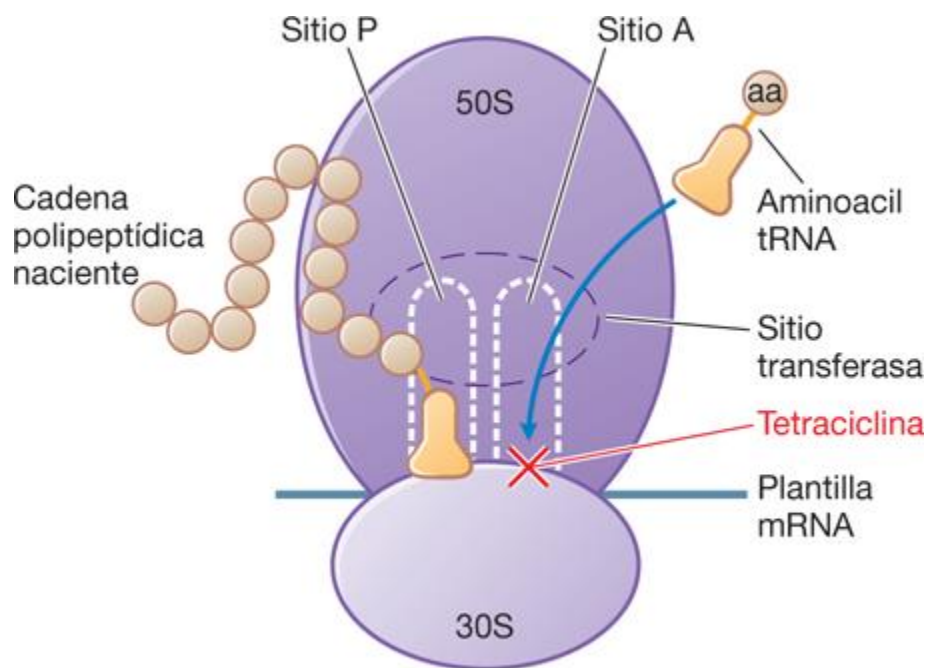


Figura 3. Inhibición de la síntesis proteínica bacteriana por las tetraciclinas

1.4 Cáncer de estómago

El cáncer de estómago ocupa el segundo lugar de todos los tumores malignos en el mundo y el quinto en Europa. En Occidente, ha disminuido la incidencia de cáncer de estómago distal, pero ha aumentado la del proximal y de la unión gastroesofágica (UGE) y la supervivencia global (SG) a los 5 años ha pasado a ser del 22% [75].

El tratamiento fundamental es la intervención quirúrgica, pero incluso en los pacientes sometidos a una cirugía óptima, la enfermedad recurre en un 80% de los casos. La quimioterapia en la enfermedad avanzada consigue respuestas en torno al 40-50% que se traduce en un aumento de la supervivencia con una mejoría de la calidad de vida de los pacientes [76].

El cáncer de estómago es el quinto tumor más frecuente a nivel mundial, con casi un millón de nuevos casos al año. Constituye la tercera causa de muerte por cáncer en ambos sexos en todo el mundo. No obstante, existen diferencias significativas de distribución, tanto por regiones como por género. Dos terceras partes de los casos ocurren en Asia, siendo más baja la incidencia en América del Norte y Europa. En cuanto al sexo, es más frecuente en hombres que en mujeres, 2:1. Esta variabilidad está relacionada con los diferentes factores de riesgo implicados en la patogenia del cáncer de estómago y su distribución asimétrica: la gastritis crónica por *H. pylori*, otras gastritis crónicas, el tabaco, una dieta rica en sal y grasas y baja en fibra, la obesidad y un nivel socioeconómico bajo. Sin embargo, ha habido un descenso de la incidencia desde los años setenta, relacionado con el control de algunos factores de riesgo, como las terapias de erradicación de *H. pylori*, así como la mejora en el diagnóstico y tratamiento [77].

Dentro de los factores de riesgo se consideran los siguientes:

- Lesiones premalignas

Como la gastritis crónica (por *H. pylori*, anemia perniciosa, gastritis crónica atrófica, metaplasia intestinal) que se han relacionado, sobre todo, con tumores de subtipo intestinal. Estudios epidemiológicos y distintos metaanálisis muestran una fuerte correlación entre la serología positiva para *H. pylori* y la incidencia de cáncer de estómago [78,79].

- Factores medioambientales

Como el tabaco, una dieta rica en sal y grasas y baja en fibra, el consumo de compuestos nitrogenados, la obesidad y un nivel socioeconómico bajo se han asociado a cáncer de estómago. Uno de los factores que merecen una mención especial es la dieta. Se ha relacionado la mayor incidencia de cáncer de estómago en Japón en aparente asociación con el consumo de pescado. Otros ejemplos de esta asociación son Chile, Noruega y España [80].

- Presencia de úlceras gástricas o cirugías previas

También favorecen el desarrollo tumoral.

- Enfermedad por reflujo gastroesofágico y esófago de Barrett (RGE)

El RGE crónico favorece la aparición de mucosa gástrica, por mecanismos reparativos frecuentes, que da lugar a la displasia posterior.

- Síndromes hereditarios

Síndrome de Lynch, poliposis adenomatosa familiar y cáncer gástrico difuso hereditario, todos relacionados con cáncer de estómago familiar [76].

El cáncer de estómago con entidad hereditaria

El cuadro hereditario más frecuente en el que está implicado el cáncer de estómago es el cáncer gástrico difuso hereditario. Es una entidad que asocia en la misma familia casos de CG de subtipo difuso con alta invasividad y mal pronóstico. Son típicamente casos en los que el diagnóstico se realiza de un modo tardío (enfermedad avanzada) y en una edad temprana.

Aproximadamente un 30-50% de los pacientes que cumplen los criterios clínicos presentan mutaciones en el gen CDH1, responsable de la adhesión celular.

Se hereda de una forma autosómica dominante e implica la pérdida de función de la E-cadherina, molécula implicada en las uniones intercelulares y la migración celular. Los pacientes portadores de esta mutación tienen un riesgo acumulado de presentar CG en algún momento de su vida entre el 40-67% en varones y el 60-83% en mujeres. La mediana de edad de desarrollo de tumor está en torno a los 38 años [81,82].

La infección por *H. pylori* es el factor de riesgo mejor descrito para el cáncer gástrico no perteneciente a los cardias. La infección crónica de la mucosa gástrica conduce a una progresión escalonada de gastritis atrófica y metaplasia intestinal [83]. La mayoría de la población infectada por *H. pylori* permanece asintomática. El cáncer de estómago debido a la infección por *H. pylori* se relaciona con la virulencia bacteriana, el polimorfismo genético de los huéspedes y los factores ambientales. La mayoría de las cepas de *H. pylori* poseen una isla de patogenicidad del gen A asociado a la citotoxina (CagA), que codifica una proteína

CagA de 120–140 kDa, una oncoproteína que afecta la expresión de las proteínas de señalización celular [84,85]. El tratamiento de *H. pylori* puede reducir el riesgo de transformación al cáncer gástrico, pero la magnitud de la reducción del riesgo depende del grado de daño preexistente en el momento de la erradicación. De acuerdo con las recomendaciones actuales, la erradicación de *H. pylori* debe realizarse en las siguientes poblaciones de riesgo: pangastritis y gastritis con predominio de cuerpo, familiares de primer grado de pacientes con cáncer y neoplasia gástricos previos[62,86–88]. Factores de riesgo más allá de *H. pylori* para no cardias gástrico son edad avanzada, nivel socioeconómico bajo, tabaquismo, consumo de alcohol, predisposición familiar, cirugía gástrica previa, anemia pernicioso y vivir en una población de alto riesgo[89–91]. La ingesta de alimentos salados podría aumentar el riesgo de infección por *H. pylori* y también podría actuar sinérgicamente para promover el desarrollo de cáncer gástrico. Por lo tanto, la modificación de la dieta que implique una menor ingesta de sal y alimentos salados es una posible estrategia para prevenir el cáncer gástrico. El riesgo de cáncer gástrico podría disminuir con un alto consumo de frutas y verduras [92].

1.4.1 Síntomas y diagnóstico

Los síntomas más comunes asociados con el cáncer gástrico son indigestión (dispepsia), anorexia (falta de apetito) o saciedad temprana, pérdida de peso y dolor abdominal. Puede ocurrir disfagia o regurgitación en cánceres gástricos proximales o cánceres ubicados en la unión gastroesofágica. La anemia puede estar presente en los cánceres sangrantes. Si los síntomas están presentes en el momento del diagnóstico, la enfermedad suele ser avanzada e incurable. El cáncer gástrico se diagnostica mediante examen endoscópico durante el cual se determina la localización del tumor dentro del estómago y su tipo macroscópico y se toman biopsias para confirmación histológica. La estadificación clínica determina si el enfoque del tratamiento será curativo o paliativo [93].

Todos los pacientes deben clasificarse en etapas de acuerdo con la última edición de la Unión para el Control Internacional del Cáncer y el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer y revisarse en una junta de tumores multidisciplinaria experimentada antes de determinar una vía de tratamiento [93,94].

1.5 Diseño in silico de antimicrobianos

La industria farmacéutica basada en la investigación ha empleado cada vez más métodos modernos de química médica, incluido el modelado molecular, como herramientas poderosas para el estudio de las relaciones estructura-actividad [95]. Además de los datos farmacodinámicos (por ejemplo, potencia, afinidad, eficacia, selectividad), también se han estudiado las propiedades farmacocinéticas (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) mediante la aplicación de estas metodologías [96]. El campo ha progresado de

la mano con los avances en los métodos espectroscópicos biomoleculares, como la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear (RMN), que han permitido un progreso sorprendente en la biología molecular y estructural. Estas técnicas han permitido la resolución de más de 100 000 estructuras proteicas tridimensionales, proporcionando información estructural vital sobre objetivos farmacológicos macromoleculares clave [97]. Los esfuerzos por almacenar, organizar y explorar dicha información han generado una creciente demanda de herramientas informáticas robustas y sofisticadas. Sobre la base de esta perspectiva, la integración precisa de los métodos *in silico* y experimentales ha proporcionado una comprensión actualizada de los complejos aspectos del reconocimiento intermolecular [98].

Dentro de este contexto, los métodos de diseño de fármacos basados en la estructura (SBDD, por sus siglas en inglés) (es decir, el uso de información estructural tridimensional obtenida de objetivos biológicos) son un componente destacado de la química médica moderna [99].

1.5.1 Diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD)

Comprender los principios por los cuales los ligandos de moléculas pequeñas reconocen e interactúan con las macromoléculas es de gran importancia en la investigación y el desarrollo farmacéutico[100]. El diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD, por sus siglas en inglés) se refiere al uso sistemático de datos estructurales (por ejemplo, objetivos macromoleculares, también llamados receptores), que generalmente se obtienen experimentalmente o mediante modelos de homología computacional[101]. El propósito es concebir ligandos con atributos electrostáticos y estereoquímicos específicos para lograr una alta afinidad de unión al receptor. La disponibilidad de estructuras macromoleculares tridimensionales permite una inspección diligente de la topología del sitio de unión, incluida la presencia de hendiduras, cavidades y bolsas secundarias. Las propiedades electrostáticas, como la distribución de carga, también se pueden examinar cuidadosamente. Los métodos actuales de SBDD permiten el diseño de ligandos que contienen las características necesarias para una modulación eficiente del receptor diana [100,101]. La modulación selectiva de un objetivo de fármaco validado por ligandos de alta afinidad interfiere con procesos celulares específicos y, en última instancia, conduce a los efectos farmacológicos y terapéuticos deseados[102].

A partir de una estructura diana conocida, se realizan estudios *in silico* para identificar posibles ligandos. Estos procedimientos de modelado molecular van seguidos de la síntesis de los compuestos más prometedores[103]. A continuación, se llevan a cabo evaluaciones de propiedades biológicas, como potencia, afinidad y eficacia, utilizando diversas plataformas experimentales[104]. Siempre que se identifiquen los compuestos activos, se puede resolver la estructura tridimensional del complejo ligando-receptor. La estructura disponible permite

la observación de varias características intermoleculares que respaldan el proceso de reconocimiento molecular. Las descripciones estructurales de los complejos ligando-receptor son útiles para la investigación de conformaciones de unión, la caracterización de interacciones intermoleculares clave, la caracterización de sitios de unión desconocidos, los estudios de mecanismos y la elucidación de cambios conformacionales inducidos por ligandos[105].

Una vez que se ha determinado un complejo ligando-receptor, los datos de actividad biológica se correlacionan con la información estructural[106]. De esta forma, el proceso SBDD comienza de nuevo con nuevos pasos para incorporar modificaciones moleculares con el potencial de aumentar la afinidad de nuevos ligandos por el sitio de unión. La flexibilidad del receptor diana es un aspecto esencial que debe tenerse en cuenta a lo largo de la fase de modelado, teniendo en cuenta que puede producirse un cambio conformacional sustancial tras la unión del ligando[107].

1.5.2 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es uno de los métodos más utilizados en SBDD debido a su capacidad para predecir, con un grado sustancial de precisión, la conformación de ligandos de moléculas pequeñas dentro del sitio de unión objetivo apropiado[108]. Tras el desarrollo de los primeros algoritmos en la década de 1980, el acoplamiento molecular se convirtió en una herramienta esencial en el descubrimiento de fármacos[109]. Por ejemplo, las investigaciones que involucran eventos moleculares cruciales, incluidos los modos de unión del ligando y las interacciones intermoleculares correspondientes que estabilizan el complejo ligando-receptor, se pueden realizar convenientemente [110].

La identificación de las conformaciones de unión más probables requiere dos pasos: (i) exploración de un gran espacio conformacional que representa varios modos de unión potenciales; (ii) predicción precisa de la energía de interacción asociada con cada una de las conformaciones de unión predichas[111]. Los programas de acoplamiento molecular realizan estas tareas a través de un proceso cíclico, en el que la conformación del ligando se evalúa mediante funciones de puntuación específicas. Este proceso se realiza recursivamente hasta converger a una solución de mínima energía[110–112].

2.0 Objetivos

Objetivo general

Diseñar *in silico* antibioticos piperidonicos para *Helicobacter pylori* causal del cáncer estomacal

Objetivos particulares

- Emplear herramientas bioinformáticas para el diseño *in silico* de antibióticos.
- Estimar la capacidad antimicrobiana de los candidatos contra *H. pylori*
- Comparar la capacidad antimicrobiana *in silico* de los candidatos respecto a los fármacos del mercado.

3.0 Metodología

3.1 Preparación de Ligandos y Proteínas

Los compuestos diseñados *leucocephala* se minimizaron vía MacroModel [113] y con LigPrep [114] se llevaron a condiciones fisiológicas de acuerdo con la metodología previamente reportada [115]. Las proteínas utilizadas Fragmento Ribosomal 30S (1HNW) [116], la proteína asociada al acoplamiento a penicilinas PBP3 de *Chlamydia trachomatis* (6I1F) [117] y PBP3 de *Pseudomonas aeruginosa* (6I1E) [118] se prepararon a condiciones fisiológicas en el módulo Protein Preparation Wizard [119] de acuerdo con la metodología previamente reportada [115].

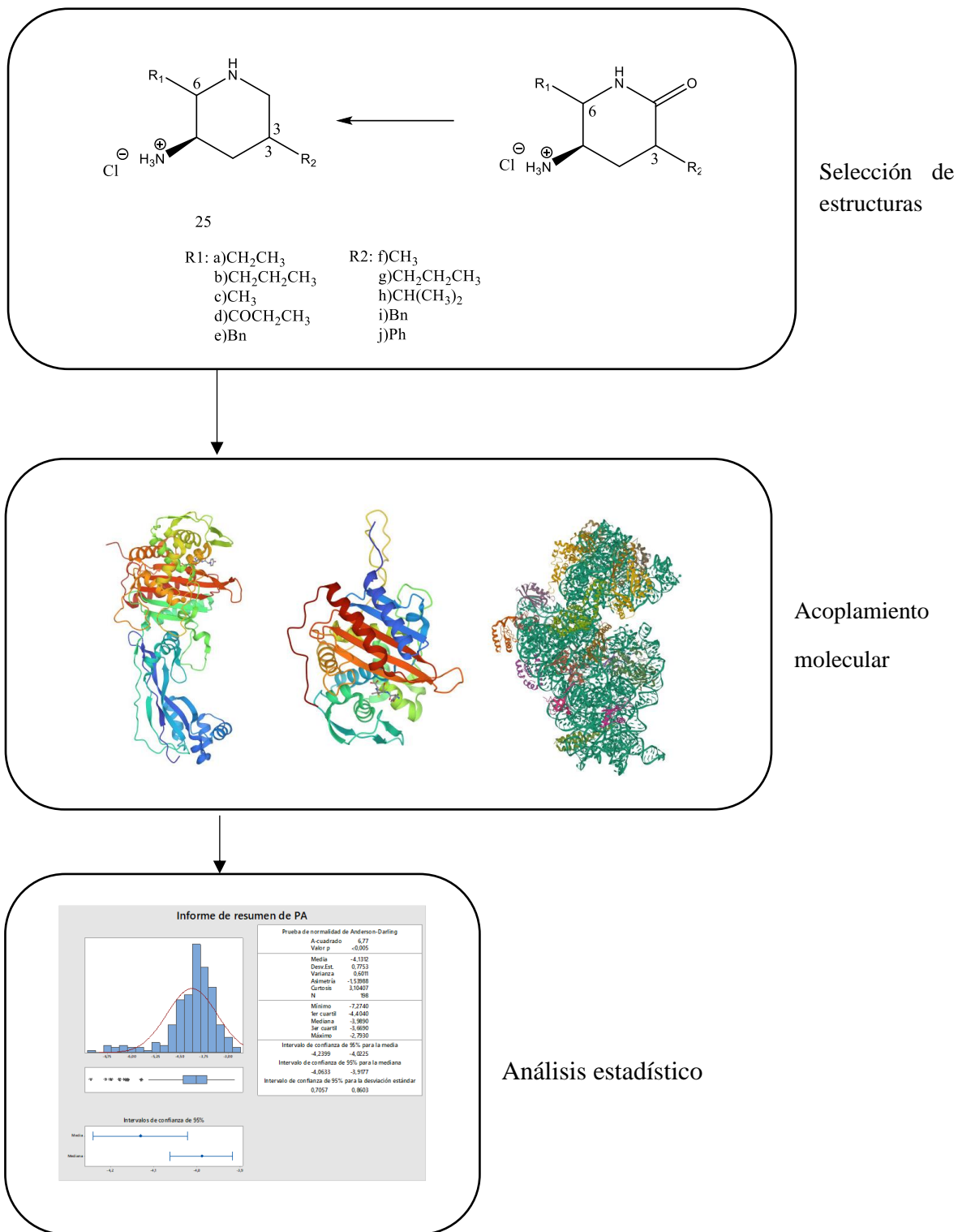
3.2 Docking Molecular

El estudio de docking molecular se realizó en la plataforma Glide [120] en un modelo de precisión SP, con flexibilidad en los ligandos y el sitio activo de acuerdo con la metodología previamente reportada [115].

3.3 Análisis estadístico

Se realizó un estudio de normalidad para el conjunto de datos y de acuerdo a estos los mismos se analizaron por la técnica de medianas de Kruskal-Wallis para determinar diferencias estadísticas significativas.

4.0 Discusión de resultados



Esquema 1. Diagrama de flujo de trabajo de diseño de piperidonas y piperidinas antibióticas.

Para el diseño de nuevos antibióticos contra *H. pylori*, planteamos el uso de la subunidad 30S y también de PBP3, cabe señalar que no se encuentran en la misma bacteria, además de que no se ha reportado en ninguna base de datos alguna proteína cristalizada PBP3 de *H. pylori* que cumpla con los requisitos para realizar el estudio. Sin embargo, las proteínas PBP3 pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* y *Chlamydia trachomatis* comparten prácticamente todas las características necesarias, ya que a nivel estructural son sumamente similares, además de cumplir la misma función dentro de la bacteria. Asimismo, el empleo de herramientas bioinformáticas con estas proteínas puede brindar alternativas para el tratamiento contra *H. pylori*, el cual en múltiples ocasiones puede resultar bastante complicado de tratar.

4.1 PBP3 de *Pseudomonas aeruginosa*

Esta proteína se encarga del crecimiento y de la división celular en la bacteria [121]. Se encontró en *Pseudomonas aeruginosa* y se cristalizó por medio de difracción utilizando el método de difusión de vapor de gota sentada [118]. Al momento de hacer los estudios de acoplamiento molecular con los derivados planteados se encontró que estos datos no presentan distribución normal (Figura 5) por lo que para su estudio estadístico se seleccionó la prueba de Kruskal-Wallis.

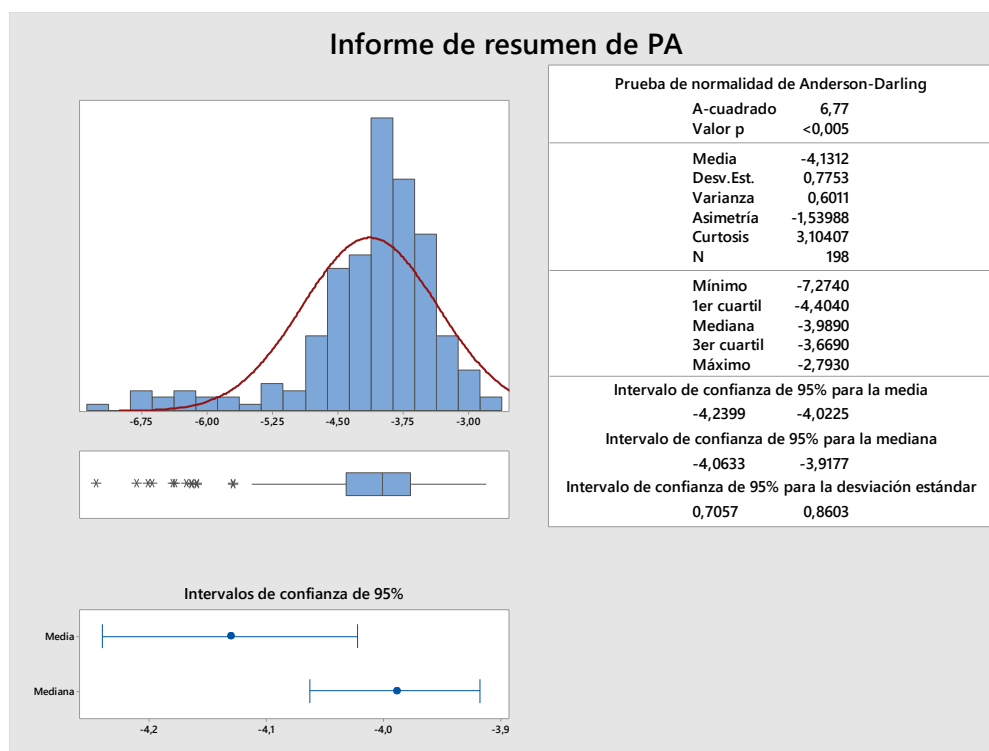


Figura 4. Resumen de prueba de normalidad de estudios con PBP3 de *P. aeruginosa*.

4.1.2 Análisis en R¹ y R²

La segunda variable de estudio es la energía de acoplamiento con diferentes grupos funcionales en R¹ (tabla 2). Estos datos señalan que en R¹ es mejor utilizar propionilo, etilo y metilo. Se presenta a metilo como la mejor opción según los resultados, esto puede ser debido a que es el que causa menor impedimento estérico dentro de la molécula al tener un menor volumen.

R ¹	Mediana
Bn	-3.7680
CH ₂ CH ₂ CH ₃	-3.7675
CH ₂ CH ₃	-4.0685
CH ₃	-4.0400
COCH ₂ CH ₃	-4.3730

Tabla 2. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R¹.

Se realizó el mismo análisis no paramétrico para el caso de R² (tabla 3). Estos datos señalan que en este caso es mejor utilizar fenilo, metilo, bencilo e isopropilo. Al igual que pasa en R¹ se presenta a metilo como la mejor opción según los resultados, esto puede ser debido a que es el que causa menor impedimento estérico dentro de la molécula al tener un menor volumen.

R ²	Mediana
Bn	-4.0660
CH(CH ₃) ₂	-3.9295
CH ₂ CH ₂ CH ₃	-3.7470
CH ₃	-4.0890
Ph	-3.9970

Tabla 3. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R².

4.1.3 Análisis de SR1 y SR2

Al realizar la prueba estadística para comparar los datos de R y S (tablas 4 y 5), estos indican que la estereoquímica en los carbonos es indistinta para la energía de acoplamiento.

SR1	Mediana	Valor p
R	-3.9755	0.513
S	-3.9890	0.513

Tabla 4. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR1.

SR2	Mediana	Valor p
R	-4.073	0.015
S	-3.917	0.015

Tabla 5. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR2.

4.1.4 Análisis energético e interaccional

Explicar el análisis energético e interaccional conlleva a analizar las interacciones entre las moléculas, en las figuras 7 y 8 podemos observar dos ejemplos de moléculas que presentan una similitud bastante grande con respecto al tipo de interacciones que tienen, así como su grado de presencia en ambas. La mayoría de las interacciones que presentan las dos moléculas son de tipo polar y se dan por medio de los aminoácidos serina, asparagina y treonina, al interactuar con ciertos grupos funcionales y formar así puentes de hidrogeno. A su vez también se encuentran en menor cantidad algunas interacciones hidrofóbicas por parte del benceno con aminoácidos apolares como valina, fenilalanina, tirosina, isoleucina y alanina. Cabe mencionar, finalmente, que a pesar de tener características muy parecidas ambas moléculas, se puede apreciar en la figura 8 la presencia de interacciones pi-cación entre el benceno y la lisina.

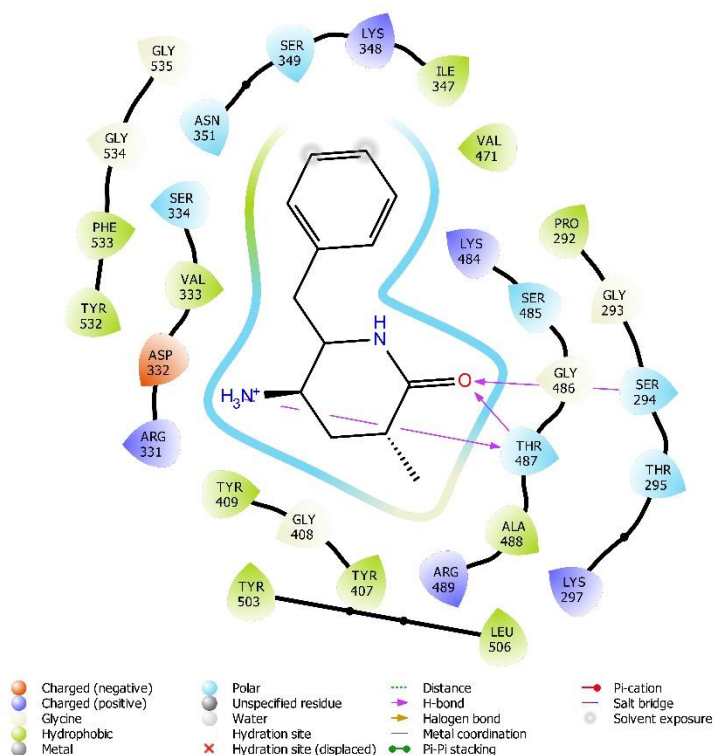


Figura 5. Piperidona antibiótica X para *P. aeruginosa*.

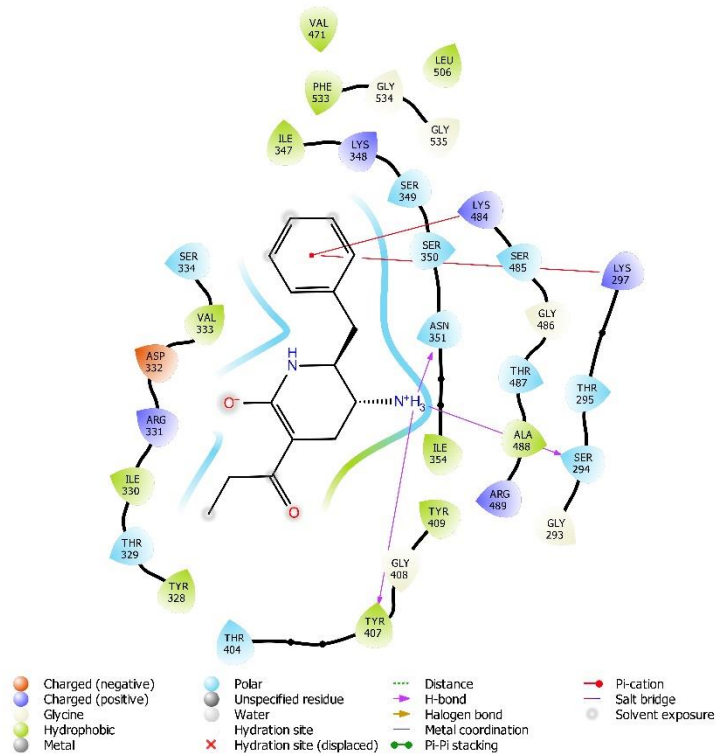


Figura 6. Piperidona antibiótica Z para *P. aeruginosa*.

4.2 PBP3 de *Chlamydia trachomatis*

PBP3 en *Chlamydia trachomatis* actúa para el crecimiento de la bacteria una vez que las primeras etapas de biosíntesis han finalizado [122] y su cristalización fue mediante la técnica de difracción de rayos X. A diferencia de los datos de *P. aeruginosa*, estos si presentan una distribución normal (figura 9), sin embargo, debido a que se están comparando proteínas, es necesario usar el mismo nivel estadístico, por lo cual se procederá de forma no paramétrica con la prueba de Kruskal-Wallis.

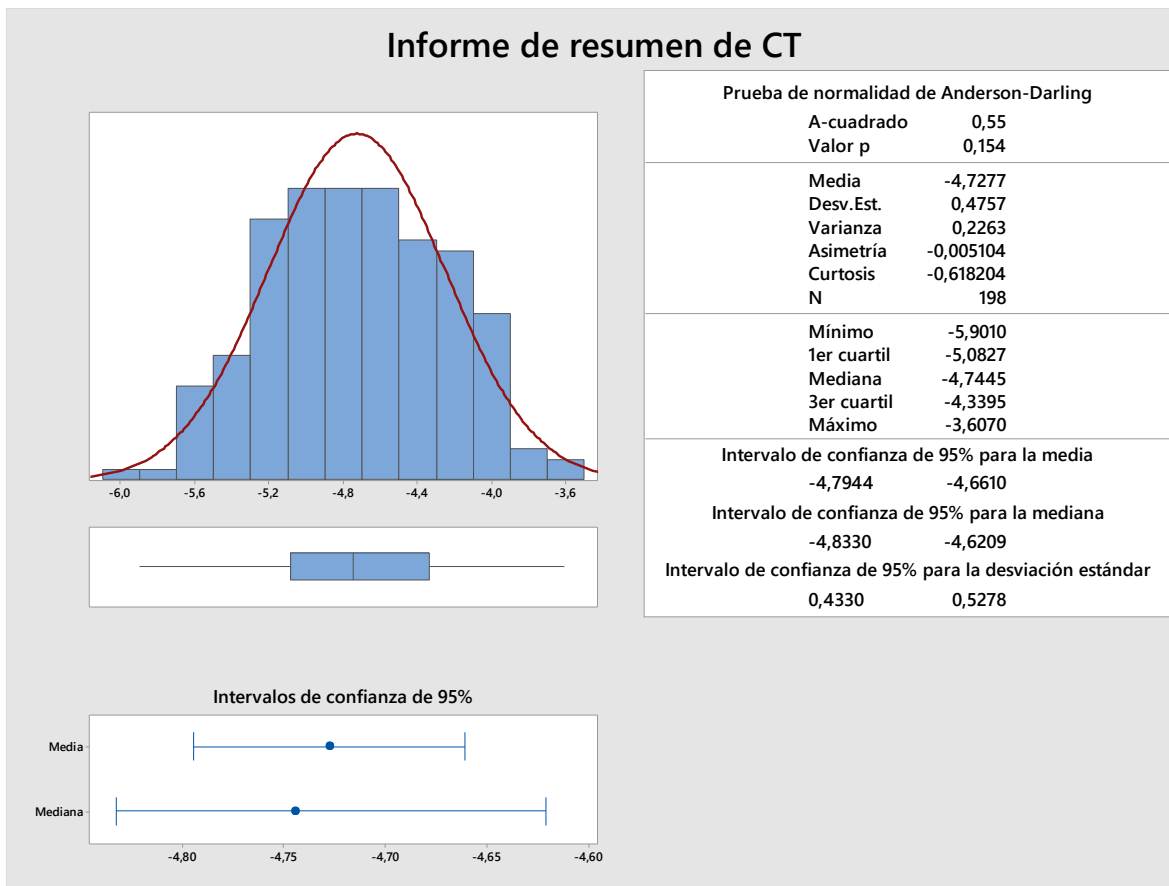


Figura 7. Resumen de prueba de normalidad de estudios con PBP3 de *Chlamydia trachomatis*.

4.2.1 Análisis de O vs H

Se repite como primera variable de análisis al grado de oxidación de la piperidona. Se encontró que al igual que en *P. aeuginosa*, los derivados oxigenados son los más adecuados, con un valor de $p < 0.05$ (tabla 6).

Clase	Mediana	Valor p
H	-4.5810	0.009
O	-4.8305	0.009

Tabla 6. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis del estado de oxidación.

4.2.2 Análisis en R¹ y R²

Como segunda variable, se realizó el análisis de la energía de acoplamiento de los grupos funcionales en R¹ (tabla 7). Estos datos señalan que en R¹ es mejor utilizar etilo, metilo y propionilo. De acuerdo con los resultados, metilo es la mejor opción, posiblemente debido a que es el que causa menor impedimento estérico dentro de la molécula..

R ¹	Mediana
Bn	-4.6220
CH ₂ CH ₂ CH ₃	-4.5035
CH ₂ CH ₃	-4.9200
CH ₃	-4.8695
COCH ₂ CH ₃	-4.9065

Tabla 7. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R1.

Para R² (tabla 8), estos datos señalan que en este caso es mejor utilizar fenilo, metilo e isopropilo. Al igual que pasa en R¹ se presenta a metilo como la mejor opción de acuerdo con los resultados, esto puede ser debido a que es el que causa menor impedimento estérico dentro de la molécula al tener un menor volumen.

R ²	Mediana
Bn	-4.3895
CH(CH ₃) ₂	-4.8865
CH ₂ CH ₂ CH ₃	-4.5180
CH ₃	-4.9300
Ph	-4.8975

Tabla 8. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R2.

4.2.3 Análisis de SR1 y SR2

Nuevamente, al realizar la prueba estadística para comparar los datos de R y S (tablas 9 y 10), estos indican que la estereoquímica en los carbonos es indistinta para la energía de acoplamiento.

SR1	Mediana	Valor p
R	-4.7910	0.331
S	-4.6575	0.331

Tabla 9. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR1.

SR2	Mediana	Valor p
-----	---------	---------

R	-4.717	0.154
S	-4.778	0.154

Tabla 10. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR2.

4.2.4 Análisis energético e interaccional

Explicar el análisis energético e interaccional conlleva a analizar las interacciones entre las moléculas, en las figuras 10 y 11 podemos observar dos ejemplos de moléculas utilizadas para el estudio de la presente bacteria. En el caso de la figura 10 se encuentran prácticamente en misma cantidad zonas hidrofóbicas y zonas con cargas negativas. Las zonas hidrofóbicas son debido a interacciones entre aminoácidos apolares como el triptófano, alanina y tirosina con el anillo heterocíclico de la molécula. Además, hay una alta presencia de zonas cargadas negativamente, esto podría explicarse por ciertos aminoácidos como el ácido glutámico o el ácido aspártico, los cuales en condiciones fisiológicas presentan una carga negativa al encontrarse en su forma ionizada de glutamato y aspartato, respectivamente. Asimismo, hay formación de puentes de hidrogeno con isoleucina, valina y tirosina, además de la presencia de un puente de sal entre la asparagina y el grupo amino cargado positivamente. Para la figura 11, existe bastante similitud con respecto a las interacciones hidrofóbicas, propiciadas por triptófano, valina y prolina. Hay también, la formación de puentes de hidrogeno con triptófano y glutamato y a su vez, un puente de sal con glutamato. La principal diferencia se encuentra en que esta molécula hay presencia de interacciones polares por la treonina, serina y asparagina.

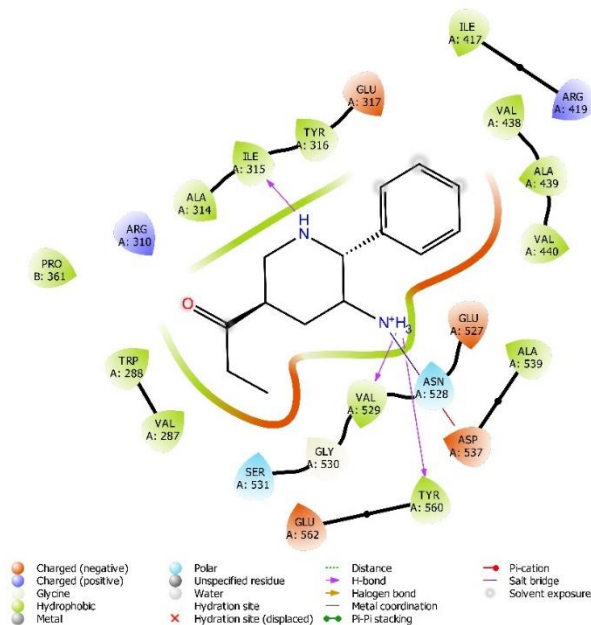


Figura 8. Piperidina antibiótica X para *C. trachomatis*.

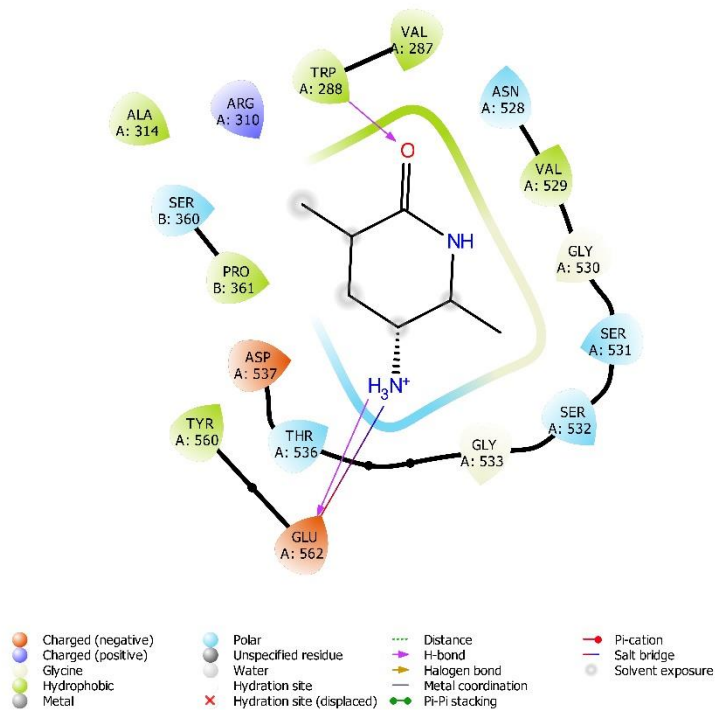


Figura 9. Piperidona antibiótica Z para *C. trachomatis*.

4.3 Subunidad 30S

La subunidad ribosomal 30S controla las interacciones de los tRNA con el mRNA y ayuda a mantener el mRNA en el marco de lectura adecuado[123]. Al igual que los datos de *P. aeruginosa* la subunidad 30S tampoco presentan distribución normal (figura 12), por lo que para su estudio estadístico se seleccionó la prueba de Kruskal-Wallis.

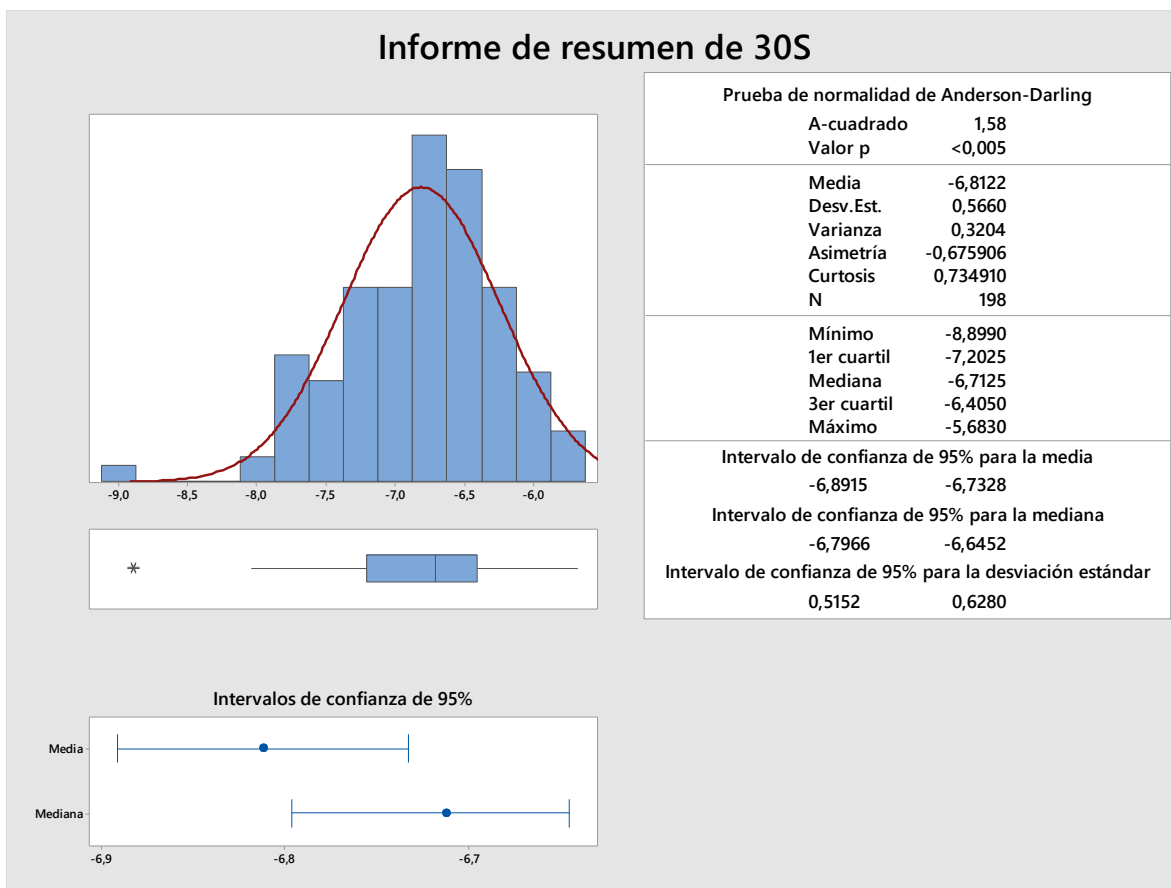


Figura 10. Resumen de prueba de normalidad de estudios con la subunidad 30S

4.3.1 Análisis de O vs H

Al igual que sucedió en los dos casos anteriores se toma como primera variable de análisis el grado de oxidación de la piperidona, ya sea como lactama o como amina secundaria. Se encontró que al igual que en *P. aeuginosa* y en *C. trachomatis*, los derivados oxigenados son los más adecuados, encontrando un valor de $p < 0.05$ (tabla 11).

Clase	Mediana	Valor p
H	-6.5000	0
O	-6.9595	0

Tabla 11. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis del estado de oxidación.

4.3.2 Análisis en R1 y R2

Como sucedió en los dos casos anteriores se realizó el análisis de la energía de acoplamiento de los grupos funcionales en R1 (tabla 12). Estos datos señalan que es mejor utilizar etilo, metilo y propionilo. Se presenta a metilo como la mejor opción según los resultados, esto

puede ser debido a que es el que causa menor impedimento estérico dentro de la molécula al tener un menor volumen.

R1	Mediana
Bn	-6.4625
CH ₂ CH ₂ CH ₃	-6.4685
CH ₂ CH ₃	-6.9695
CH ₃	-7.0140
COCH ₂ CH ₃	-6.7405

Tabla 12. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R1.

Para R2 (tabla 13), los datos señalan que en este caso es mejor utilizar propilo, metilo e isopropilo. Al igual que pasa en R1 se presenta a metilo como la mejor opción según los resultados, esto puede ser debido a que es el que causa menor impedimento estérico dentro de la molécula al tener un menor volumen.

R2	Mediana
Bn	-6.3935
CH(CH ₃) ₂	-6.9220
CH ₂ CH ₂ CH ₃	-6.7020
CH ₃	-7.1720
Ph	-6.6335

Tabla 13. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de grupos funcionales en R2.

4.3.3 Análisis de SR1 y SR2

Al igual que pasó con las proteínas anteriores los datos de SR1 y SR2 (tablas 14 y 15) indican que la estereoquímica en los carbonos es indistinta para la energía de acoplamiento.

SR1	Mediana	Valor p
R	-6.7685	0.221
S	-6.6495	0.221

Tabla 14. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR1.

SR2	Mediana	Valor p
R	-6.702	0.810
S	-6.740	0.810

Tabla 15. Informe de Medianas de Kruskal-Wallis $p < 0.05$ para el análisis de SR2.

4.3.4 Análisis energético e interaccional

Explicar el análisis energético e interaccional conlleva a analizar las interacciones entre las moléculas, en las figuras 13 y 14 podemos observar dos ejemplos de moléculas utilizadas para el estudio de la subunidad 30S. En el caso de la primera molécula (figura 13) encontramos un par de puentes de hidrogeno, ambos se forman mediante los grupos funcionales aminos que tiene la molécula con las bases nitrogenadas citosina y uracilo. Además, también hay presencia de dos puentes salinos en las mismas bases nitrogenadas donde citosina interacciona con una de las aminos y uracilo lo hace con una parte de la estructura cíclica de la piperidona. Asimismo, existe la formación de un compuesto de coordinación entre el magnesio y el oxígeno. Pasando a la segunda molécula, (figura 14) se puede observar la formación de un puente de hidrogeno entre la citosina y la amina. A su vez, el mismo grupo funcional amina presenta dos puentes salinos con los aminoácidos citosina y uracilo. Se encuentra la formación también de un compuesto de coordinación constituido por magnesio y oxígeno.

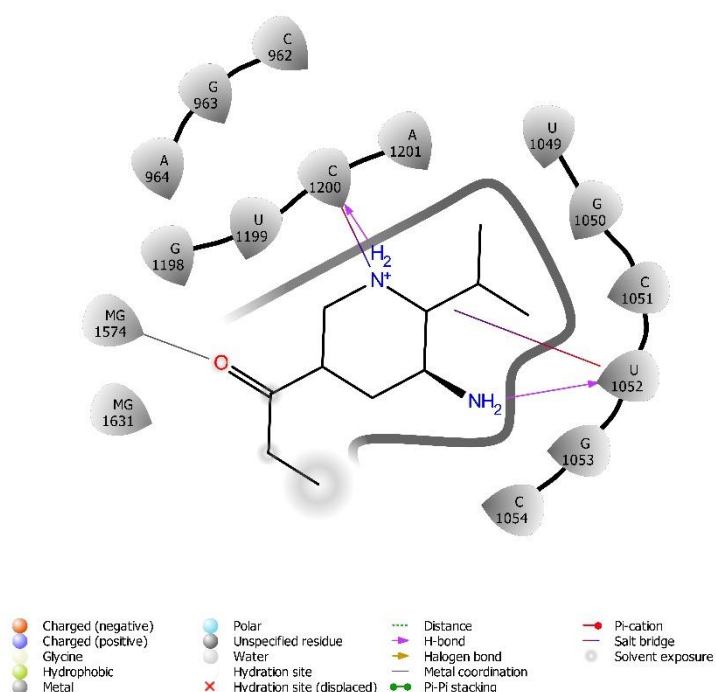


Figura 11. Piperidina antibiótica X para la subunidad 30S

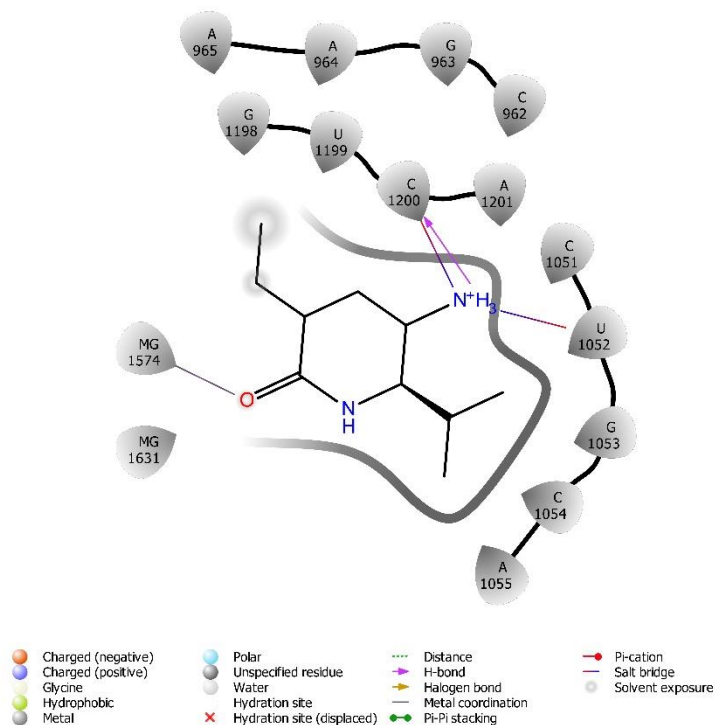
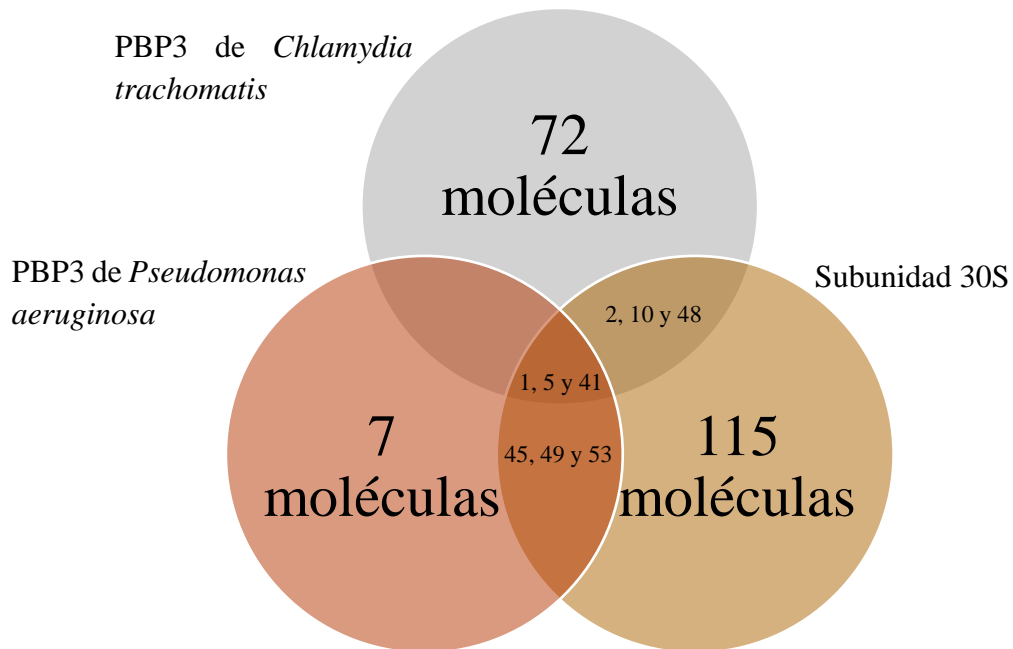


Figura 12. Piperidona antibiótica Z para la subunidad 30S

4.4 Integración de las proteínas



Esquema 2. Diagrama de Venn de los resultados obtenidos.

Con relación a los resultados obtenidos se obtuvo que con respecto a la proteína PBP3 de *Chlamydia trachomatis* existen un total de 72 moléculas dentro del estudio las cuales presentaron mejores resultados que los obtenidos con los fármacos del mercado empleados como comparación. En el caso de la PBP3 de *Pseudomonas aeruginosa* apenas se obtuvieron solo 7 moléculas con mejor resultado, mientras que en el caso de las moléculas que tienen como diana a la subunidad 30S se consiguieron 115 moléculas que presentan un resultado más favorable. Haciendo una comparación entre las proteínas PBP3 estudiadas y la subunidad 30S, se tiene que entre ambas proteínas PBP3 existen 3 moléculas que fueron coincidentes respecto a su buen resultado en el análisis energético, las cuales fueron las moléculas 1,5 y 41. Entre la PBP3 de *Chlamydia trachomatis* y la subunidad 30S hay un total de 53 moléculas en las cuales coinciden en presentar un resultado mayor que los fármacos con los que se compararon, dentro de las cuales destacan las moléculas 2, 10 y 48. Mientras que entre la PBP3 de *Pseudomonas aeruginosa* y la subunidad 30S se obtuvieron 7 resultados iguales en ambas moléculas en cuanto a tener un resultado mejor que el obtenido en los fármacos con los que se compararon, ejemplos de estas moléculas son la 45, 49 y 53. Finalmente al hacer una triple comparación se obtuvieron solo 3 moléculas que coincidían en las 3 moléculas como buenos resultados, éstas fueron exactamente las mismas que se encontraron al hacer la comparación entre ambas proteínas PBP3, estas son la 1, 5 y 41.

Conclusiones

El propósito de la presente tesis consistió en el diseño *in silico* de antimicrobianos contra *H. pylori*, causante del cáncer estomacal, así como comparar la capacidad antimicrobiana que los candidatos presentaban respecto a los fármacos del mercado. Para esto, fue necesario el empleo de múltiples herramientas bioinformáticas como, por ejemplo, Schrödinger, Maestro, RCSB Protein Data Bank, entre otras.

Con base en los resultados obtenidos en el estudio de la PBP de *C. trachomatis* y de *P. aeruginosa*, así como en la subunidad 30S podemos concluir que hay una gran cantidad de candidatos que presentan una mejor capacidad antimicrobiana con respecto a los fármacos que existen en el mercado. Asimismo, dentro del estudio se buscó una relación de coincidencia para ver qué candidatos se repetían en cada uno de los tres casos de estudio y que presentan a su vez una capacidad antimicrobiana superior. Al hacer esto, se tuvo una lista sumamente más reducida con los candidatos que podrían considerarse más versátiles, ya que funcionan bien ya sea en las dos PBP o en una y la subunidad 30S. Finalmente, se hizo una triple comparación con 3 candidatos, los cuales podrían considerarse como los más versátiles y por lo tanto continuar investigando. Además, todos los candidatos que presentan una actividad microbiana superior a la del mercado también representan una opción de estudio factible.

el siguiente paso dentro de la investigación del presente tema es transferirlo a un estudio *in vitro* en el cual se pueda confirmar la factibilidad que tienen los candidatos propuestos en el estudio para convertirse en fármacos en un futuro.

Bibliografía

- [1] B. Marshall, R. Warren, Unidentified Curved Bacilli on Gastric Epithelium In Active Chronic Gastritis, *Lancet*. (1983).
- [2] B.J. Marshall, H. Royce, D.I. Annear, Original isolation of *Campylobacter pyloridis* from human gastric mucosa, *Microbios Lett.* (1984).
- [3] C.S. Goodwin, J.A. Armstrong, T. Chilvers, M. Peters, M.D. Collins, L. Sly, W. McConnell, W.E.S. Harper, Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39 (1989). <https://doi.org/10.1099/00207713-39-4-397>.
- [4] E. Cervantes García, R. García-González, *Helicobacter pylori* y la respuesta inmune, *Rev. Latinoam. Patol. Clínica y Med. Lab.* (2015).
- [5] V.R.C. González, C. R., & Jiménez, *Helicobacter pylori*, un modelo de bacteria carcinogénica, *Rev. Espec. Médico-Quirúrgicas.* (2010).
- [6] C.Y. Kao, B.S. Sheu, J.J. Wu, *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis, *Biomed. J.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.06.002>.
- [7] V. Camilo, T. Sugiyama, E. Touati, Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter.* (2017). <https://doi.org/10.1111/hel.12405>.
- [8] M.K.R. Tummuru, T.L. Cover, M.J. Blaser, Cloning and expression of a high-molecular-mass major antigen of *Helicobacter pylori*: Evidence of linkage to cytotoxin production, *Infect. Immun.* (1993). <https://doi.org/10.1128/iai.61.5.1799-1809.1993>.
- [9] M.J. Blaser, G.I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T.L. Cover, R.M. Peek, P.H. Chyou, G.N. Stemmermann, A. Nomura, Infection with *Helicobacter pylori* Strains Possessing *cagA* Is Associated with an Increased Risk of Developing Adenocarcinoma of the Stomach, *Cancer Res.* (1995).
- [10] M. Denic, E. Touati, H. De Reuse, Review: Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection, *Helicobacter.* (2020). <https://doi.org/10.1111/hel.12736>.
- [11] E. Aihara, N.M. Medina-Candelaria, H. Hanyu, A.L. Matthis, K.A. Engevik, C.B. Gurniak, W. Witke, J.R. Turner, T. Zhang, M.H. Montrose, Cell injury triggers actin polymerization to initiate epithelial restitution, *J. Cell Sci.* (2018). <https://doi.org/10.1242/jcs.216317>.
- [12] K. Thorell, S. Hosseini, R.V.P. Palacios Gonzáles, C. Chaotham, D.Y. Graham, L. Paszat, L. Rabeneck, S.B. Lundin, I. Nookaew, Å. Sjöling, Identification of a Latin American-specific BabA adhesin variant through whole genome sequencing of *Helicobacter pylori* patient isolates from Nicaragua, *BMC Evol. Biol.* (2016). <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0619-y>.
- [13] S. Suerbaum, J. Maynard Smith, K. Bapumia, G. Morelli, N.H. Smith, E. Kunstmann, I. Dyrek, M. Achtman, Free recombination within *Helicobacter pylori*, *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U. S. A. (1998). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12619>.

- [14] L.E. Wroblewski, R.M. Peek, K.T. Wilson, Helicobacter pylori and gastric cancer: Factors that modulate disease risk, *Clin. Microbiol. Rev.* (2010). <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-10>.
- [15] F. Maixner, B. Krause-Kyora, D. Turaev, A. Herbig, M.R. Hoopmann, J.L. Hallows, U. Kusebauch, E.E. Vigl, P. Malfertheiner, F. Megraud, N. O'Sullivan, G. Cipollini, V. Coia, M. Samadelli, L. Engstrand, B. Linz, R.L. Moritz, R. Grimm, J. Krause, A. Nebel, Y. Moodley, T. Rattei, A. Zink, The 5300-year-old Helicobacter pylori genome of the Iceman, *Science* (80-.). (2016). <https://doi.org/10.1126/science.aad2545>.
- [16] Y. Moodley, B. Linz, R.P. Bond, M. Nieuwoudt, H. Soodyall, C.M. Schlebusch, S. Bernhöft, J. Hale, S. Suerbaum, L. Mugisha, S.W. van der Merwe, M. Achtman, Age of the association between Helicobacter pylori and man, *PLoS Pathog.* (2012). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002693>.
- [17] D. Falush, T. Wirth, B. Linz, J.K. Pritchard, M. Stephens, M. Kidd, M.J. Blaser, D.Y. Graham, S. Vacher, G.I. Perez-Perez, Y. Yamaoka, F. Mégraud, K. Otto, U. Reichard, E. Katzowitsch, X. Wang, M. Achtman, S. Suerbaum, Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations, *Science* (80-.). (2003). <https://doi.org/10.1126/science.1080857>.
- [18] F. Maixner, K. Thorell, L. Granehall, B. Linz, Y. Moodley, T. Rattei, L. Engstrand, A. Zink, Helicobacter pylori in ancient human remains, *World J. Gastroenterol.* (2019). <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i42.6289>.
- [19] E.M. Bik, P.B. Eckburg, S.R. Gill, K.E. Nelson, E.A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M.J. Blaser, D.A. Relman, Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006). <https://doi.org/10.1073/pnas.0506655103>.
- [20] D.Y. Graham, History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer, *World J. Gastroenterol.* (2014). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5191>.
- [21] P. Nagy, S. Johansson, M. Molloy-Bland, Systematic review of time trends in the prevalence of Helicobacter pylori infection in China and the USA, *Gut Pathog.* (2016). <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0091-7>.
- [22] S. ichi Yokota, M. Konno, S. ichi Fujiwara, N. Toita, M. Takahashi, S. Yamamoto, N. Ogasawara, T. Shiraishi, Intrafamilial, Preferentially Mother-to-Child and Intrasposal, Helicobacter pylori Infection in Japan Determined by Mutilocus Sequence Typing and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting, *Helicobacter.* (2015). <https://doi.org/10.1111/hel.12217>.
- [23] J.K.Y. Hooi, W.Y. Lai, W.K. Ng, M.M.Y. Suen, F.E. Underwood, D. Tanyingoh, P. Malfertheiner, D.Y. Graham, V.W.S. Wong, J.C.Y. Wu, F.K.L. Chan, J.J.Y. Sung, G.G. Kaplan, S.C. Ng, Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis, *Gastroenterology.* (2017). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.04.022>.

- [24] M. Zamani, F. Ebrahimitabar, V. Zamani, W.H. Miller, R. Alizadeh-Navaei, J. Shokri-Shirvani, M.H. Derakhshan, Systematic review with meta-analysis: the worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection, *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2018). <https://doi.org/10.1111/apt.14561>.
- [25] K. Venneman, I. Huybrechts, M.J. Gunter, L. Vandendaele, R. Herrero, K. Van Herck, The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in Europe and the impact of lifestyle on its natural evolution toward stomach cancer after infection: A systematic review, *Helicobacter*. (2018). <https://doi.org/10.1111/hel.12483>.
- [26] S. Rejchrt, I. Koupil, M. Kopov, M. Fendrichov, B. Seifert, V. Voek, J. Pirkov, T. Douda, I. Tachec, J. Bure, The prevalence and sociodemographic determinants of uninvestigated dyspepsia in the Czech Republic: A multicentre prospective study accomplished 10 years after the first study from the same geographical areas, *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* (2018). <https://doi.org/10.1097/MEG.0000000000001007>.
- [27] I. Varela, P. Tarpey, K. Raine, D. Huang, C.K. Ong, P. Stephens, H. Davies, D. Jones, M.L. Lin, J. Teague, G. Bignell, A. Butler, J. Cho, G.L. Dalgliesh, D. Galappaththige, C. Greenman, C. Hardy, M. Jia, C. Latimer, K.W. Lau, J. Marshall, S. McLaren, A. Menzies, L. Mudie, L. Stebbings, D.A. Largaespada, L.F.A. Wessels, S. Richard, R.J. Kahnoski, J. Anema, D. A.tuveson, P.A. Perez-Mancera, V. Mustonen, A. Fischer, D.J. Adams, A. Rust, W. Chan-On, C. Subimerb, K. Dykema, K. Furge, P.J. Campbell, B.T. Teh, M.R. Stratton, P.A. Futreal, Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma, *Nature*. (2011). <https://doi.org/10.1038/nature09639>.
- [28] C. Franck, A. Hoffmann, A. Link, C. Schulz, K. Wuttig, E. Becker, M. Heim, M. Venerito, P. Malfertheiner, Prevalence of *Helicobacter pylori* infection among blood donors in Saxony-Anhalt, Germany - A region at intermediate risk for gastric cancer, *Z. Gastroenterol.* (2017). <https://doi.org/10.1055/s-0043-106311>.
- [29] T. Tacikowski, S. Bawa, D. Gajewska, J. Myszkowska-Ryciak, J. Bujko, G. Rydzewska, Current prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with dyspepsia treated in Warsaw, Poland, *Prz. Gastroenterol.* (2017). <https://doi.org/10.5114/pg.2017.68042>.
- [30] S. Levenstein, R.K. Jacobsen, S. Rosenstock, T. Jørgensen, Mental vulnerability, *Helicobacter pylori*, and incidence of hospital-diagnosed peptic ulcer over 28 years in a population-based cohort, *Scand. J. Gastroenterol.* (2017). <https://doi.org/10.1080/00365521.2017.1324897>.
- [31] M. Salehi, A. Ghasemian, S.K.S. Mostafavi, S. Najafi, H.R. Vardanjani, Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in Neyshabur, Iran, during 2010-2015, Iran. *J. Pathol.* (2017). <https://doi.org/10.30699/ijp.2017.25037>.
- [32] H. Dabiri, F. Jafari, K. Baghaei, L. Shokrzadeh, S. Abdi, M.A. Pourhoseingholi, A. Mohammadzadeh, Prevalence of *Helicobacter pylori* *vacA*, *cagA*, *cagE*, *oipA*, *iceA*, *babA2* and *babB* genotypes in Iranian dyspeptic patients, *Microb. Pathog.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.018>.

- [33] M.H. Hamrah, M.S. Hamrah, M.H. Hamrah, M. Kanda, A.E. Hamrah, A.E. Dahi, F. Homayoun, M.H. Hamrah, A. Fotouhi, J. Sakamoto, Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients in Andkhoy Afghanistan, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* (2017). <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.11.3123>.
- [34] D. Kasew, A. Abebe, U. Munea, T. Deressa, Y. Tegegne, M. Alemayehu, M. Melku, Magnitude of *Helicobacter pylori* among Dyspeptic Patients Attending at University of Gondar Hospital, Gondar, Northwest Ethiopia, *Ethiop. J. Health Sci.* (2017). <https://doi.org/10.4314/ejhs.v27i6.2>.
- [35] T.N. Archampong, R.H. Asmah, E.K. Aidoo, E.K. Wiredu, R.K. Gyasi, D.N. Adjei, S. Beleza, C.D. Bayliss, K. Krogfelt, *Helicobacter pylori* cagA and vacA genes in dyspeptic Ghanaian patients, *BMC Res. Notes.* (2017). <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2542-8>.
- [36] N. Raaf, W. Amhis, H. Saoula, A. Abid, M. Nakmouche, A. Balamane, N. Ali Arous, M. Ouar-Korichi, F.F. Vale, L. Bénéjat, F. Mégraud, Prevalence, antibiotic resistance, and MLST typing of *Helicobacter pylori* in Algiers, Algeria, *Helicobacter.* (2017). <https://doi.org/10.1111/hel.12446>.
- [37] S.I. Smith, A. Seriki, R. Ndip, R. Pellicano, *Helicobacter pylori* infection in Africa: 2018 literature update, *Minerva Gastroenterol. Dietol.* (2018). <https://doi.org/10.23736/S1121-421X.18.02464-9>.
- [38] C. Wang, T. Nishiyama, S. Kikuchi, M. Inoue, N. Sawada, S. Tsugane, Y. Lin, Changing trends in the prevalence of *H. pylori* infection in Japan (1908-2003): A systematic review and meta-regression analysis of 170,752 individuals, *Sci. Rep.* (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15490-7>.
- [39] J. Liu, Y. Wang, Q. Zhao, R. Luo, M. Xiao, M. Zhang, W. Xie, Prevalence and risk factors for *Helicobacter pylori* infection in southwest China: A study of health examination participants based on ¹³C-urea breath test, *Turkish J. Med. Sci.* (2017). <https://doi.org/10.3906/sag-1605-149>.
- [40] J.H. Lee, K.D. Choi, H.Y. Jung, G.H. Baik, J.K. Park, S.S. Kim, B.W. Kim, S.J. Hong, H. Lim, C.M. Shin, S.H. Lee, S.W. Jeon, J.H. Kim, C.W. Choi, H.K. Jung, J.H. Kim, S.C. Choi, J.W. Cho, W.S. Lee, S.Y. Na, J.K. Sung, K.H. Song, J.W. Chung, S.C. Yun, Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Korea: A multicenter, nationwide study conducted in 2015 and 2016, *Helicobacter.* (2018). <https://doi.org/10.1111/hel.12463>.
- [41] O. Khasag, G. Boldbaatar, T. Tegshee, D. Duger, A. Dashdorj, T. Uchida, T. Matsuhisa, Y. Yamaoka, The prevalence of *Helicobacter pylori* infection and other risk factors among Mongolian dyspeptic patients who have a high incidence and mortality rate of gastric cancer, *Gut Pathog.* (2018). <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0240-2>.
- [42] S. Ansari, E.T. Kabamba, P.K. Shrestha, H. Aftab, T. Myint, L. Tshering, R.P. Sharma, N. Ni, T.T. Aye, P. Subsomwong, T. Uchida, T. Ratanachu-ek, R. Vilaichone, V. Mahachai, T. Matsumoto, J. Akada, Y. Yamaoka, *Helicobacter pylori* bab characterization in clinical isolates from Bhutan, Myanmar, Nepal and Bangladesh,

PLoS One. (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187225>.

- [43] R.P. Sharma, M. Miftahussurur, P.K. Shrestha, P. Subsomwong, T. Uchida, Y. Yamaoka, Nepalese *Helicobacter pylori* genotypes reflects a geographical diversity than a true virulence factor, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* (2017). <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.10.2637>.
- [44] P. Subsomwong, M. Miftahussurur, R.K. Vilaichone, T. Ratanachu-Ek, R. Suzuki, J. Akada, T. Uchida, V. Mahachai, Y. Yamaoka, *Helicobacter pylori* virulence genes of minor ethnic groups in North Thailand, *Gut Pathog.* (2017). <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0205-x>.
- [45] L. Jeyamani, J. Jayarajan, V. Leelakrishnan, M. Swaminathan, *CagA* and *VacA* genes of *Helicobacter pylori* and their clinical relevance, *Indian J. Pathol. Microbiol.* (2018). https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_234_17.
- [46] T.T. Binh, V.P. Tuan, H.D.Q. Dung, P.H. Tung, T.D. Tri, N.P.M. Thuan, L.Q. Tam, B.C. Nam, D.A. Giang, P.Q. Hoan, T. Uchida, T.T.H. Trang, V. Van Khien, Y. Yamaoka, Molecular epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in a minor ethnic group of Vietnam: A multiethnic, population-based study, *Int. J. Mol. Sci.* (2018). <https://doi.org/10.3390/ijms19030708>.
- [47] M.R. Huerta-Franco, J.W. Banderas, J.E. Allsworth, Ethnic/racial differences in gastrointestinal symptoms and diagnosis associated with the risk of *Helicobacter pylori* infection in the US, *Clin. Exp. Gastroenterol.* (2018). <https://doi.org/10.2147/CEG.S144967>.
- [48] M.S. Stratton, B.T. Searcy, S.A. Tobet, GABA regulates corticotropin releasing hormone levels in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in newborn mice, *Physiol. Behav.* (2011). <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.01.003>.
- [49] K.M. Miernyk, L.R. Bulkow, B.D. Gold, M.G. Bruce, D.H. Hurlburt, P.M. Griffin, D.L. Swerdlow, K. Cook, T.W. Hennessy, A.J. Parkinson, Prevalence of *Helicobacter pylori* among Alaskans: Factors associated with infection and comparison of urea breath test and anti-*Helicobacter pylori* IgG antibodies, *Helicobacter.* (2018). <https://doi.org/10.1111/hel.12482>.
- [50] D. Long Parma, E. Muñoz, S.M. Ogden, G.F. Westin, R.J. Leach, I.M. Thompson, A.G. Ramirez, *Helicobacter Pylori* Infection in Texas Hispanic and Non-Hispanic White Men: Implications for Gastric Cancer Risk Disparities, *Am. J. Mens. Health.* (2017). <https://doi.org/10.1177/1557988317702038>.
- [51] J. Atrisco-Morales, V.I. Martínez-Santos, A. Román-Román, J. Alarcón-Millán, J. De Sampedro-Reyes, I. Cruz-del Carmen, D.N. Martínez-Carrillo, G. Fernández-Tilapa, *Vaca s1m1* genotype and *cagA* EPIYA-ABC pattern are predominant among *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis, *J. Med. Microbiol.* (2018). <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000660>.
- [52] M. González-Pons, M. Soto-Salgado, J. Sevilla, J.M. Márquez-Lespier, D. Morgan, C.M. Pérez, M. Cruz-Correa, Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Hispanics living in Puerto Rico: A population-based study, *Helicobacter.* (2018).

<https://doi.org/10.1111/hel.12453>.

- [53] I. Campolmi, M. Spinicci, D.R. Mayaregua, H.G. Barahona, A. Mantella, Y. Lara, M. Roselli, M. Strohmeier, G. Corti, F. Tolari, J.M. Pinckert, H.R. Dalton, A. Bartoloni, Seroprevalence of hepatitis a virus, hepatitis e virus, and helicobacter pylori in rural communities of the Bolivian Chaco, 2013, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* (2018). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0747>.
- [54] S.L. Stratton, T.D. Horvath, A. Bogusiewicz, N.I. Matthews, C.L. Henrich, H.J. Spencer, J.H. Moran, D.M. Mock, Urinary excretion of 3-hydroxyisovaleryl carnitine is an early and sensitive indicator of marginal biotin deficiency in humans, *J. Nutr.* (2011). <https://doi.org/10.3945/jn.110.135772>.
- [55] S. Morais, A.R. Costa, A. Ferro, N. Lunet, B. Peleteiro, Contemporary migration patterns in the prevalence of Helicobacter pylori infection: A systematic review, *Helicobacter*. (2017). <https://doi.org/10.1111/hel.12372>.
- [56] W.D. Chey, G.I. Leontiadis, C.W. Howden, S.F. Moss, ACG Clinical Guideline: Treatment of Helicobacter pylori Infection, *Am. J. Gastroenterol.* (2017). <https://doi.org/10.1038/ajg.2016.563>.
- [57] J.P. Gisbert, J. Molina-Infante, J. Amador, F. Bermejo, L. Bujanda, X. Calvet, M. Castro-Fernández, A. Cuadrado-Lavín, J.I. Elizalde, E. Gene, F. Gomollón, Á. Lanás, C. Martín de Argila, F. Mearin, M. Montoro, Á. Pérez-Aisa, E. Pérez-Trallero, A.G. McNicholl, IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de la infección por Helicobacter pylori, *Gastroenterol. Hepatol.* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2016.05.003>.
- [58] J. Molina-Infante, A. Shiotani, Practical Aspects in Choosing a Helicobacter pylori Therapy, *Gastroenterol. Clin. North Am.* (2015). <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.05.004>.
- [59] F. Mégraud, The challenge of Helicobacter pylori resistance to antibiotics: The comeback of bismuth-based quadruple therapy, *Therap. Adv. Gastroenterol.* (2012). <https://doi.org/10.1177/1756283X11432492>.
- [60] P. Malfertheiner, F. Bazzoli, J.C. Delchier, K. Celiński, M. Giguère, M. Rivière, F. Mégraud, Helicobacter pylori eradication with a capsule containing bismuth subcitrate potassium, metronidazole, and tetracycline given with omeprazole versus clarithromycin-based triple therapy: A randomised, open-label, non-inferiority, phase 3 trial, *Lancet*. (2011). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60020-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60020-2).
- [61] P.S.E.I. MINISTERIO DE SANIDAD, Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ficha técnica: Pylera, (2017). https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/75095/FichaTecnica_75095.html.pdf.
- [62] P. Malfertheiner, F. Megraud, C. O'Morain, J.P. Gisbert, E.J. Kuipers, A. Axon, F. Bazzoli, A. Gasbarrini, J. Atherton, D.Y. Graham, R. Hunt, P. Moayyedi, T. Rokkas, M. Rugge, M. Selgrad, S. Suerbaum, K. Sugano, E. El-Omar, L. Agreus, L.P. Andersen, L. Coelho, J.C. Delchier, F. Di Mario, M. Dinis-Ribeiro, W. Fischbach, B. Flahou, K.M. Fock, G. Gasbarrini, G. Gensini, K.L. Goh, R. Herrero, L. Kupcinskis,

- A. Lanas, M. Leja, J.C. Machado, V. Mahachai, T. Milosavljevic, Y. Niv, A. Ristimaki, B. Tepes, D. Vaira, M. Vieth, W. You, Management of helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence consensus report, *Gut*. (2017). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>.
- [63] C.A. Fallone, N. Chiba, S.V. van Zanten, L. Fischbach, J.P. Gisbert, R.H. Hunt, N.L. Jones, C. Render, G.I. Leontiadis, P. Moayyedi, J.K. Marshall, The Toronto Consensus for the Treatment of Helicobacter pylori Infection in Adults, *Gastroenterology*. (2016). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.04.006>.
- [64] A.F. Ciccaglione, R. Tavani, L. Grossi, L. Cellini, L. Manzoli, L. Marzio, Rifabutin Containing Triple Therapy and Rifabutin with Bismuth Containing Quadruple Therapy for Third-Line Treatment of Helicobacter pylori Infection: Two Pilot Studies, *Helicobacter*. (2016). <https://doi.org/10.1111/hel.12296>.
- [65] S. Koletzko, N.L. Jones, K.J. Goodman, B. Gold, M. Rowland, S. Cadranet, S. Chong, R.B. Colletti, T. Casswall, J. Guarner, N. Kalach, A. Madrazo, F. Megraud, G. Oderda, Evidence-based guidelines from ESPGHAN and NASPGHAN for helicobacter pylori infection in children, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2011). <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182227e90>.
- [66] Ros Arnal I., Patología relacionada con el gluten. Actualización en Helicobacter pylori, *Curso Actual. Pediatría 2017*. (2017) 66–77.
- [67] T. Takeuchi, E. Umegaki, N. Takeuchi, Y. Yoda, Y. Kojima, S. Tokioka, K. Higuchi, Strategies for peptic ulcer healing after 1 week proton pump inhibitor-based triple Helicobacter pylori eradication therapy in Japanese patients: Differences of gastric ulcers and duodenal ulcers, *J. Clin. Biochem. Nutr.* (2012). <https://doi.org/10.3164/jcbn.12-15>.
- [68] J.P. Gisbert, S. Khorrami, F. Carballo, X. Calvet, E. Gene, E. Dominguez-Muñoz, Meta-analysis: Helicobacter pylori eradication therapy vs. antisecretory non-eradication therapy for the prevention of recurrent bleeding from peptic ulcer, *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2004). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2004.01898.x>.
- [69] E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak, J.A. Ayala, P. Charlier, The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis, *FEMS Microbiol. Rev.* (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>.
- [70] J. Calvo, L. Martínez-Martínez, Mecanismos de acción de los antimicrobianos, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>.
- [71] P. Macheboeuf, C. Contreras-Martel, V. Job, O. Dideberg, A. Dessen, Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes, *FEMS Microbiol. Rev.* (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x>.
- [72] C. Goffin, J.-M. Ghuysen, Biochemistry and Comparative Genomics of SxxK Superfamily Acyltransferases Offer a Clue to the Mycobacterial Paradox: Presence of Penicillin-Susceptible Target Proteins versus Lack of Efficiency of Penicillin as Therapeutic Agent, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* (2002).

<https://doi.org/10.1128/membr.66.4.702-738.2002>.

- [73] K. DH, D. MP, K. JJ, K. M, L. M, W. JY, G. DY, High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*, *Antimicrob Agents Chemother.* (2003). <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2169-2178.2003>.
- [74] A.. Fallis, Goodman y Gilman manual de farmacologia y terapeutica, 2013.
- [75] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2012, CA. *Cancer J. Clin.* (2012). <https://doi.org/10.3322/caac.20138>.
- [76] R.M. Villaverde, A.M.J. Gordo, A.S.J. del Moral, M. Álvarez-Mon Soto, *Cáncer de estómago, Med.* (2017). <https://doi.org/10.1016/j.med.2017.04.011>.
- [77] K.M. Fock, Review article: The epidemiology and prevention of gastric cancer, *Aliment. Pharmacol. Ther.* (2014). <https://doi.org/10.1111/apt.12814>.
- [78] N.U. Aomi Uemura, S.O. Hiro Okamoto, S.Y. Oichiro Amamoto, N.M. Obutoshi Matsumura, S.Y. Huji Yamaguchi, M.Y. Ichio Yamakido, K.T. Iyomi Aniyama, N.S. Aomi Asaki, R.J. Onald S Chlemper, A. Bstract, *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer, *N Engl J Med.* (2001).
- [79] J.Q. Huang, G.F. Zheng, K. Sumanac, E.J. Irvine, R.H. Hunt, Meta-Analysis of the Relationship between *cagA* Seropositivity and Gastric Cancer, *Gastroenterology.* (2003). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2003.08.033>.
- [80] S. Tsugane, S. Sasazuki, Diet and the risk of gastric cancer: Review of epidemiological evidence, in: *Gastric Cancer*, 2007. <https://doi.org/10.1007/s10120-007-0420-0>.
- [81] P. Guilford, B. Humar, V. Blair, Hereditary diffuse gastric cancer: Translation of *CDH1* germline mutations into clinical practice, *Gastric Cancer.* (2010). <https://doi.org/10.1007/s10120-009-0531-x>.
- [82] R.Y. Cong Tan, J. Ngeow, Hereditary Diffuse Gastric Cancer: What the Clinician Should Know, *World J. Gastrointest. Oncol.* (2015). <https://doi.org/10.4251/wjgo.v7.i9.153>.
- [83] I.D. Nagtegaal, R.D. Odze, D. Klimstra, V. Paradis, M. Rugge, P. Schirmacher, K.M. Washington, F. Carneiro, I.A. Cree, The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system, *Histopathology.* 76 (2020). <https://doi.org/10.1111/his.13975>.
- [84] S.Y. Chen, R.G. Zhang, G.C. Duan, Pathogenic mechanisms of the oncoprotein *CagA* in *H. pylori*-induced gastric cancer (Review), *Oncol. Rep.* (2016). <https://doi.org/10.3892/or.2016.5145>.
- [85] M. Hatakeyama, Malignant *Helicobacter pylori*-Associated Diseases: Gastric Cancer and MALT Lymphoma, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2019. https://doi.org/10.1007/5584_2019_363.
- [86] S. Kumar, D.C. Metz, S. Ellenberg, D.E. Kaplan, D.S. Goldberg, Risk Factors and Incidence of Gastric Cancer After Detection of *Helicobacter pylori* Infection: A Large Cohort Study, *Gastroenterology.* (2020). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.10.019>.

- [87] I.J. Choi, M.-C. Kook, Y.-I. Kim, S.-J. Cho, J.Y. Lee, C.G. Kim, B. Park, B.-H. Nam, Helicobacter pylori Therapy for the Prevention of Metachronous Gastric Cancer , N. Engl. J. Med. (2018). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1708423>.
- [88] I.J. Choi, C.G. Kim, J.Y. Lee, Y.-I. Kim, M.-C. Kook, B. Park, J. Joo, Family History of Gastric Cancer and Helicobacter pylori Treatment , N. Engl. J. Med. (2020). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1909666>.
- [89] M. Yaghoobi, J. McNabb-Baltar, R. Bijarchi, R.H. Hunt, What is the quantitative risk of gastric cancer in the first-degree relatives of patients? A meta-analysis, World J. Gastroenterol. (2017). <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i13.2435>.
- [90] G. Murphy, S.M. Dawsey, E.A. Engels, W. Ricker, R. Parsons, A. Etemadi, S.W. Lin, C.C. Abnet, N.D. Freedman, Cancer Risk After Pernicious Anemia in the US Elderly Population, Clin. Gastroenterol. Hepatol. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.05.040>.
- [91] P. Morgagni, A. Gardini, D. Marrelli, G. Vittimberga, A. Marchet, G. De Manzoni, M.A. Di Cosmo, G.M. Rossi, D. Garcea, F. Roviello, Gastric stump carcinoma after distal subtotal gastrectomy for early gastric cancer: Experience of 541 patients with long-term follow-up, Am. J. Surg. (2015). <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2014.06.021>.
- [92] E.C. Smyth, M. Nilsson, H.I. Grabsch, N.C. van Grieken, F. Lordick, Gastric cancer, Lancet. (2020). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31288-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31288-5).
- [93] E.C. Smyth, M. Verheij, W. Allum, D. Cunningham, A. Cervantes, D. Arnold, E. Guidelines, Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, ESMO Updat. Clin. Pract. Guidel. 27 (2016).
- [94] et al Amin MB, Edge SB, Greene FL, AJCC Cancer Staging Manual, Springer. (2017).
- [95] J.P. Hughes, S.S. Rees, S.B. Kalindjian, K.L. Philpott, Principles of early drug discovery, Br. J. Pharmacol. (2011). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.
- [96] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, Adv. Drug Deliv. Rev. (2012). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.019>.
- [97] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, Nucleic Acids Res. (2000). <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>.
- [98] J. Weigelt, Structural genomics-Impact on biomedicine and drug discovery, Exp. Cell Res. (2010). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.041>.
- [99] L.B. Salum, I. Polikarpov, A.D. Andricopulo, Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity, J. Chem. Inf. Model. (2008). <https://doi.org/10.1021/ci8002182>.

- [100] J. Blaney, A very short history of structure-based design: How did we get here and where do we need to go?, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* (2012). <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9518-x>.
- [101] S. Mandal, M. Moudgil, S.K. Mandal, Rational drug design, *Eur. J. Pharmacol.* (2009). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.06.065>.
- [102] S. Urwyler, Allosteric modulation of family C G-protein-coupled receptors: From molecular insights to therapeutic perspectives, *Pharmacol. Rev.* (2011). <https://doi.org/10.1124/pr.109.002501>.
- [103] G.L. Wilson, M.A. Lill, Integrating structure-based and ligand-based approaches for computational drug design, *Future Med. Chem.* (2011). <https://doi.org/10.4155/fmc.11.18>.
- [104] Y. Fang, Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.* (2012). <https://doi.org/10.1517/17460441.2012.715631>.
- [105] A.W. Kahsai, K. Xiao, S. Rajagopal, S. Ahn, A.K. Shukla, J. Sun, T.G. Oas, R.J. Lefkowitz, Multiple ligand-specific conformations of the β 2-adrenergic receptor, *Nat. Chem. Biol.* (2011). <https://doi.org/10.1038/nchembio.634>.
- [106] B.K. Shoichet, B.K. Kobilka, Structure-based drug screening for G-protein-coupled receptors, *Trends Pharmacol. Sci.* (2012). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.007>.
- [107] L.G. Ferreira, R.N. Dos Santos, G. Oliva, A.D. Andricopulo, Molecular docking and structure-based drug design strategies, *Molecules.* (2015). <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- [108] X.-Y. Meng, H.-X. Zhang, M. Mezei, M. Cui, Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery, *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* (2012). <https://doi.org/10.2174/157340911795677602>.
- [109] F. Lopez-Vallejo, T. Caulfield, K. Martinez-Mayorga, M. A. Giulianotti, A. Nefzi, R. A. Houghten, J. L. Medina-Franco, Integrating Virtual Screening and Combinatorial Chemistry for Accelerated Drug Discovery, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* (2011). <https://doi.org/10.2174/138620711795767866>.
- [110] S.Y. Huang, X. Zou, Advances and challenges in Protein-ligand docking, *Int. J. Mol. Sci.* (2010). <https://doi.org/10.3390/ijms11083016>.
- [111] I.M. Kapetanovic, Computer-aided drug discovery and development (CADD): In silico-chemico-biological approach, *Chem. Biol. Interact.* (2008). <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.006>.
- [112] E. Yuriev, M. Agostino, P.A. Ramsland, Challenges and advances in computational docking: 2009 in review, *J. Mol. Recognit.* (2011). <https://doi.org/10.1002/jmr.1077>.
- [113] Schrödinger Release 2022-4: MacroModel, (2021).
- [114] Schrödinger Release 2022-4: LigPrep, (2021).

- [115] A. Carrasco-Carballo, D.F. Mendoza-Lara, J.A. Rojas-Morales, V. Alatraste, P. Merino-Montiel, F. Luna, J. Sandoval-Ramirez, In silico Study of Coumarins Derivatives With Potential Use in Systemic Diseases, *Biointerface Res. Appl. Chem.* 13 (2023). <https://doi.org/10.33263/BRIAC133.240>.
- [116] D.E. Brodersen, W.M. Clemons, A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly, V. Ramakrishnan, The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B, on the 30S ribosomal subunit, *Cell.* 103 (2000) 1143–1154. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00216-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00216-6).
- [117] D. Bellini, L. Koekemoer, H. Newman, C.G. Dowson, Crystal structure of TP domain from *Chlamydia trachomatis* Penicillin-Binding Protein 3 in complex with amoxicillin, (2019). <https://doi.org/10.2210/pdb6i1f/pdb>.
- [118] D. Bellini, L. Koekemoer, H. Newman, C.G. Dowson, Novel and Improved Crystal Structures of *H. influenzae*, *E. coli* and *P. aeruginosa* Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) and *N. gonorrhoeae* PBP2: Toward a Better Understanding of β -Lactam Target-Mediated Resistance, *J. Mol. Biol.* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.07.010>.
- [119] Schrödinger Release 2022-4: Schrödinger KNIME Extensions, (2021).
- [120] Schrödinger, “Schrödinger Release 2022-4: Glide, (2021).
- [121] W. Chen, Y.M. Zhang, C. Davies, Penicillin-binding protein 3 is essential for growth of *pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2017). <https://doi.org/10.1128/AAC.01651-16>.
- [122] N. Jacquier, P.H. Viollier, G. Greub, The role of peptidoglycan in chlamydial cell division: Towards resolving the chlamydial anomaly, *FEMS Microbiol. Rev.* (2015). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv001>.
- [123] Z.L. Watson, F.R. Ward, R. Méheust, O. Ad, A. Schepartz, J.F. Banfield, J.H.D. Cate, Structure of the bacterial ribosome at 2 Å resolution, *Elife.* (2020). <https://doi.org/10.7554/ELIFE.60482>.