



Trabajo Fin de Máster

Galleria mellonella como modelo animal de la infección por *Helicobacter pylori* y para estudios de eficacia preclínica de nuevos antimicrobianos frente a este patógeno.

Autor/es

Ana Cabetas Borjabad

Director/es

Andrés González Rodríguez y Eduardo Chueca Lapuente

Facultad de Ciencias
2019/2020

ÍNDICE

1.	RESUMEN/ ABSTRACT	4
2.	<i>HELICOBACTER PYLORI:</i> MICROBIOLOGÍA.....	6
2.1.	Taxonomía y clasificación.....	6
2.2.	Morfología y metabolismo	6
2.3.	Condiciones de crecimiento y medios de cultivo.....	8
3.	PATOGENIA.....	9
3.1.	Manifestaciones clínicas.....	9
3.1.1.	Patologías gastrointestinales	10
3.1.2.	Patologías extraintestinales	11
3.2.	Diagnóstico	11
3.2.1.	Métodos invasivos.....	12
3.2.2.	Métodos no invasivos.....	12
3.3.	Factores de virulencia	13
3.3.1.	Sistema Ureasa.....	14
3.3.2.	CagA, CagE	14
3.3.3.	VacA.....	15
3.3.4.	IceA.....	16
3.3.5.	DupA.....	16
3.3.6.	OipA.....	16
3.3.7.	BabA	16
3.3.8.	Otros.....	17
4.	PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN	17
5.	PAUTAS DE TRATAMIENTO	19
5.1.	Terapias de primera línea.....	19
5.2.	Terapias de segunda línea	22

5.3. Terapias de tercera línea.....	22
6. CRISIS DE ANTIBIÓTICOS: MECANISMOS DE RESISTENCIA EN <i>H. PYLORI</i>	23
6.1. Resistencia a claritromicina.....	24
6.2. Resistencia a metronidazol	24
6.3. Resistencia a levofloxacina.....	24
6.4. Otros mecanismos de resistencia	25
7. NUEVAS DIANAS PARA NUEVOS ANTIMICROBIANOS.....	25
8. MODELOS ANIMALES PARA LA INFECCIÓN POR <i>H. PYLORI</i>	30
8.1. Ratones.....	30
8.2. Jerbos	32
8.3. Otros.....	33
9. LAS 3RS EN EL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. MODELOS INVERTEBRADOS	34
10. <i>GALLERIA MELLONELLA</i>.....	36
10.1. Características biológicas y ciclo de vida.....	36
10.2. <i>G. mellonella</i> como modelo animal en múltiples infecciones de interés clínico.....	39
10.3. <i>G. mellonella</i> como modelo de infección por <i>H. pylori</i>	42
10.4. <i>G. mellonella</i> para estudios de eficacia preclínica de nuevos antimicrobianos.	44
11. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	46
12. PERSPECTIVAS FUTURAS	48
13. BIBLIOGRAFÍA	49

1. RESUMEN/ ABSTRACT

H. pylori es una bacteria Gram-negativa que coloniza el estómago de los humanos. La prevalencia de la infección por *H. pylori* en el mundo varía en función de numerosos factores como la edad, el origen étnico, el estado geográfico y socioeconómico. Más del 50 % de la población mundial está infectada con *H. pylori* y se considera un agente etiológico importante en el desarrollo de enfermedades como gastritis, úlcera péptica, linfoma gástrico asociado a mucosa (MALT) y cáncer gástrico. El dinamismo genético del organismo, unido a diversos factores ambientales y del propio huésped determina el daño epitelial y la capacidad colonizadora de *H. pylori*, lo que explica la diversidad de enfermedades causadas por la bacteria. Existen varios factores de virulencia que se han relacionado con la agresividad de la bacteria y por tanto, están implicados en la colonización y daño en la mucosa. Los regímenes farmacológicos más utilizados para tratar la infección por *H. pylori* han variado durante los últimos años y no existe un tratamiento único. La creciente prevalencia de cepas de *H. pylori* resistentes a antibióticos es una de las principales causas de la dificultad actual de erradicar la infección. Además, la Organización Mundial de la Salud en 2017 catalogó a *H. pylori* como una de las infecciones con resistencia a antibióticos alta. Por ello, hoy en día es necesario encontrar una nueva terapia efectiva contra *H. pylori*. Como modelo animal para el estudio de la eficacia de tratamientos en la infección por *H. pylori* se han utilizado modelos animales como ratones y jirbos, pero debido al gran coste que suponen y a los impedimentos éticos que supone el uso de animales actualmente se están buscando alternativas que permitan reducir el número de los mismos. Por ello, se están reemplazando con modelos de animales invertebrados como es el caso de *G. mellonella*. Se ha demostrado que este modelo es susceptible a la infección por *H. pylori* y se puede utilizar para estudiar mecanismos patogénicos y factores de virulencia de la bacteria.

H. pylori is a Gram-negative bacterium which colonizes the human stomach. The prevalence of *H. pylori* infection in the world varies according to numerous factors such as age, ethnic origin, geographic and socioeconomic status. More than 50 % of the world population is infected with *H. pylori* and it is considered an important etiological agent in the development of diseases such as gastritis, peptic ulcer, gastric mucosa-associated lymphoma (MALT) and gastric cancer. The genetic dynamism of the organism, together with various environmental and host factors determines the epithelial damage and colonizing capacity of *H. pylori*, and also explains the diversity of diseases caused by the bacteria. There are several virulence factors that have been related to the aggressiveness of the bacteria and, therefore, are involved in colonization and damage to the mucosa. The most commonly used drug regimens to treat *H. pylori* infection have varied in recent years and to date there is not a universally effective therapy against the bacteria. The increasing prevalence of antibiotic resistant strains of *H. pylori* is one of the main causes of the current difficulty in eradicating the infection. In addition, the World Health Organization in 2017 listed *H. pylori* as one of the infections with high antibiotic resistance. Therefore, today it is mandatory to find a novel effective therapy against *H. pylori*. Animal models such as mice and gerbils have been used as an animal model to study the efficacy of treatments in *H. pylori* infection, but due to the high cost involved and the ethical impediments involved in the use of animals, alternatives are currently being sought that allow reducing their number. For this reason, they are being replaced by invertebrate animal models such as *G. mellonella*. This model has been shown to be susceptible to *H. pylori* infection and can be used to study pathogenic mechanisms and virulence factors of the bacterium.

2. *HELICOBACTER PYLORI*: MICROBIOLOGÍA

Helicobacter pylori es una bacteria helicoidal Gram-negativa que coloniza el epitelio gástrico humano. Esta bacteria fue identificada por primera vez por los científicos australianos Barry J. Marshal y Robin Warren en 1982 [1].

2.1. Taxonomía y clasificación

El género *Helicobacter* pertenece a la clase *Epsilonproteobacteria* del filo *Proteobacteria*, orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteraceae*. Esta familia también incluye los géneros *Wolinella*, *Flexispira*, *Sulphurimonas*, *Thiomicrospira* y *Thiovulum*. Hasta la fecha, el género *Helicobacter* consta de más de 20 especies reconocidas [2] que podemos subdividir en dos grupos: las gástricas, como *H. pylori* o *H. heilmannii*; y las enterohepáticas, como *H. hepaticus* [3].

2.2. Morfología y metabolismo

H. pylori es una bacteria que mide de 2 a 4 µm de largo y 0,5 a 1 µm de ancho (Figura 1). Generalmente presenta una forma de espiral cuando se encuentra en la mucosa gástrica y menos espiral, en forma de varilla, cuando crece en medios artificiales. Las formas coccoides aparecen después de un cultivo *in vitro* prolongado, ante un estrés o un tratamiento con antibióticos. Se cree que representan células muertas o un estado viable pero no cultivable de la bacteria [4]. La bacteria tiene de 2 a 6 flagelos unipolares, los cuales confieren motilidad y movilidad en sustancias viscosas. Estos apéndices están recubiertos por una estructura lipídica que los protege de la degradación en medio ácido [5]. Cada flagelo, compuesto por múltiples subunidades de proteínas, consta de 3 componentes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento flagelar. El filamento flagelar está formado por dos flagelinas: FlaA y FlaB. El gancho está compuesto de FlgE y une el cuerpo basal y el filamento flagelar. El cuerpo basal lo componen varias estructuras de proteínas y es una fuente de energía para la motilidad [6].



Figura 1. Morfología y flagelos de *H. pylori*. <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/>

H. pylori está formada, como otras bacterias Gram-negativas, por una membrana interna, periplasma con peptidoglucano y una membrana externa. Esta última contiene fosfolípidos, lipopolisacáridos (LPS) y glucósidos de colesterol, a diferencia de otras bacterias [7]. El LPS presenta una estructura de 3 regiones principales: un lípido A, un núcleo con oligosacáridos y una capa externa de polisacáridos o cadena lateral O [3]. El lípido A es el responsable de la actividad inmunológica, baja en esta bacteria en comparación con otras bacterias Gram-negativas, debido a una modificación en su estructura, lo que le confiere la capacidad para evadir la respuesta inmunológica del huésped. Al inducir una baja respuesta inmunológica, la bacteria persiste durante más tiempo en el estómago, produciendo infecciones crónicas [8]. Los aislamientos clínicos de *H. pylori* producen LPS de alto peso molecular (fenotipo liso) con un antígeno O, sin embargo, en cultivos *in vitro*, las bacterias pueden convertirse en variantes de LPS rugosas, que carecen de la cadena lateral O [9]. La cadena lateral O de *H. pylori* tiene similitud con los antígenos del grupo sanguíneo de Lewis, ayudando a la imitación molecular de los antígenos del huésped y a la evasión inmune. Cuando esto sucede, se dice que son cepas que expresan los antígenos de Lewis y su expresión está asociada a patologías más severas [10].

El genoma de *H. pylori* tiene un tamaño de 1,60-1,70 megabases y un contenido de G + C entre 35 y 40 %. Las cepas de *H. pylori* son genéticamente muy diversas debido a múltiples factores como un alto grado de mutaciones y un alto grado de recombinación genética, cuya caracterización se ha llevado a cabo gracias al estudio de la secuencia de nucleótidos de genes en diferentes cepas de *H. pylori* [11].

H. pylori es una bacteria microaerofílica, que no tolera altos niveles de oxígeno, pero requiere al menos 2 % de este gas ya que lo utiliza como aceptor final de electrones en la respiración aerobia [12]. Los aminoácidos y la urea son las dos fuentes principales de nitrógeno para la bacteria en el entorno gástrico. Las vías que intervienen en la síntesis de amoniaco a partir del metabolismo de estos compuestos nitrogenados se regulan en respuesta a estímulos, lo que hace que *H. pylori* active o desactive las rutas en función de las condiciones ambientales a las que esté expuesta [13].

Cabe destacar el papel que algunos metales desempeñan en el metabolismo de *H. pylori*, como es el caso del níquel, cofactor de las enzimas ureasa e hidrogenasa que resultan esenciales durante la colonización del estómago [14].

2.3. Condiciones de crecimiento y medios de cultivo

Puesto que el microorganismo se encuentra principalmente en la región inferior del estómago, la muestra más habitual para su identificación es la biopsia gástrica. Además, se ha cultivado con éxito en muestras extragástricas como placa dental, esófago, recto y vejiga urinaria [15].

H. pylori puede crecer en diferentes medios de cultivo. Los medios sólidos más utilizados son Agar Columbia o Agar Mueller-Hinton suplementados con sangre de caballo u oveja o, alternativamente, con suero de fetal bovino que pueden actuar como fuentes adicionales de nutrientes y protegiendo de los efectos tóxicos que producen los ácidos grasos de cadena larga del medio de cultivo. Este último efecto también puede ser proporcionado adicionando suplementos de medios como las β-ciclodextrinas, IsoVitaleX o mediante el uso de carbón activado [16]. El cultivo en medio líquido se realiza a partir de caldo de *Brucella*, infusión cerebro-corazón, Mueller-Hinton y tripticasa soja, todos ellos suplementados con un extra de nutrientes [17]. *H. pylori* solo se puede cultivar en un medio químicamente definido con los aminoácidos adicionales arginina, histidina, leucina, metionina, fenilalanina y valina [3].

Las condiciones óptimas de crecimiento se dan en una atmósfera con niveles de O₂ entre 5-10 %, de CO₂ entre 5-10 %, 80-90 % de N₂ y alta humedad (95 %). La temperatura óptima de crecimiento es 37 °C, aunque puede desarrollarse en un rango de 35-39 °C [17]. Aunque el microorganismo puede sobrevivir a pH menores de 4, su multiplicación únicamente ocurre en un rango de 5,5 a 8, con un crecimiento óptimo a pH neutro. Estas condiciones se

obtienen utilizando cajas o jarras de anaerobiosis con sobres comerciales que proporcionen la mezcla de gases adecuada [18].

La identificación del microorganismo se realiza mediante visualización en fresco con un microscopio de contraste de fases para ver la morfología o bien mediante una tinción de Gram. *H. pylori* es ureasa, catalasa y oxidasa positiva, características que a menudo se utilizan para su identificación [15]. Tanto para aislamiento primario como para cultivos de rutina, se emplean mezclas selectivas de antibióticos tales como el suplemento de Dent y el suplemento de Skirrow, con el objetivo de evitar el sobrecrecimiento de contaminantes [19]. Una vez realizado el aislamiento se debe subcultivar cada 48-72 horas en medios no selectivos en las condiciones anteriormente expuestas. Las cepas se pueden conservar en caldo tripticasa soja o infusión de cerebro corazón con glicerol al 10-20 % en congelador a -80 °C o en nitrógeno líquido durante varios meses [15].

3. PATOGENIA

Aunque *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica de millones de personas en el mundo, únicamente un pequeño porcentaje desarrollan síntomas clínicos. *H. pylori* ha desarrollado numerosas estrategias de supervivencia y persistencia dentro de la mucosa gástrica, así como diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped [20]. Tanto los factores bacterianos como los del huésped juegan un papel en la mediación de la virulencia bacteriana y la susceptibilidad a la infección y pueden explicar de alguna manera los diferentes grados de infección en diferentes individuos [21].

3.1. Manifestaciones clínicas

H. pylori coloniza la mucosa gástrica llegando a producir gastritis superficial, enfermedad de la úlcera péptica o gastritis atrófica, pudiendo desencadenar cáncer gástrico. El transcurso de la enfermedad depende de la virulencia de la cepa, la susceptibilidad del huésped y de factores ambientales. Numerosos estudios han demostrado que *H. pylori* no solo produce enfermedades digestivas, sino además, puede causar otras patologías extraintestinales como anemia ferropénica, púrpura trombocitopénica, déficit de vitamina B₁₂ o enfermedades alérgicas [22]. Todavía no ha sido identificado el mecanismo de transmisión de *H. pylori*, aunque algunas evidencias apoyan que la transmisión puede ser a partir de una

fuente ambiental común o de persona a persona por vía fecal-oral, oral-oral u oro-gástrica [23].

3.1.1. Patologías gastrointestinales

- **Gastritis.** La infección por *H. pylori* usualmente conduce a gastritis crónica, con cambios variables en la estructura de la mucosa gástrica. Aunque en la mayoría de los pacientes infectados no causa síntomas, existe un pequeño porcentaje de individuos en los que puede desencadenar dispepsia y úlcera péptica. Conlleva, además, un riesgo significativamente mayor para el desarrollo del cáncer gástrico [24].
- **Úlcera péptica.** Numerosos investigadores han descrito que aproximadamente el 95 % de las úlceras duodenales y el 85 % de las úlceras gástricas ocurren en presencia de *H. pylori* [3]. Varios estudios estimaron que el riesgo de padecer enfermedad ulcerosa en individuos positivos para *H. pylori* es de 3 a 10 veces mayor que en sujetos negativos [25]. Las úlceras aparecen principalmente en zonas de la mucosa donde la inflamación (gastritis) es más grave. Las complicaciones de la enfermedad ulcerosa incluyen sangrado, perforación y formación de estenosis, siendo la más común el sangrado gastrointestinal superior [3].
- **Cáncer gástrico.** La infección persistente por *H. pylori* es el principal factor de riesgo y la causa más frecuente de carcinoma gástrico [26]. El riesgo es hasta 20 veces superior en pacientes infectados por la bacteria. Por ello, en 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasificó a *H. pylori* como carcinógeno del Grupo 1 en base a una revisión exhaustiva de estudios epidemiológicos y de laboratorio relevantes [27]. La gastritis puede promover la carcinogénesis gástrica, generalmente a través de una secuencia de cambios histológicos en la mucosa gástrica caracterizada por la aparición sucesiva de gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia, denominada cascada de Correa (Figura 2) [28].

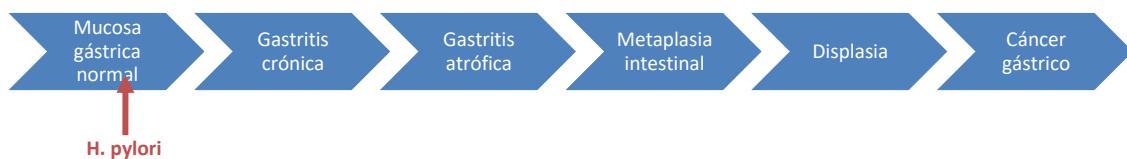


Figura 2. Cascada de Correa precancerosa gástrica.

- **Linfoma gástrico asociado a mucosa (MALT).** Los linfomas MALT son un grupo de linfomas extraganglionares de células B localizados en el estómago, glándulas salivares, pulmones y otras localizaciones [29]. Estudios realizados en los años 90 describieron una elevada incidencia de gastritis por *H. pylori* en pacientes con linfoma MALT gástrico y mostraron la relación entre la infección y la aparición de la enfermedad. Cabe destacar que la erradicación de *H. pylori* provoca la remisión de este tumor en la mayoría de los pacientes [30].

3.1.2. Patologías extraintestinales

- **Anemia ferropénica refractaria.** Algunos trabajos han relacionado a *H. pylori* con el desarrollo de anemia ferropénica, sobre todo en pacientes pediátricos. Se ha observado que la eliminación del germen permite normalizar las cifras y valores de ferritina y de hierro, aunque no se sabe si el efecto que la infección provoca se trata de un incremento en las pérdidas de hierro o de una disminución en su absorción [31].
- **Púrpura trombocitopénica idiopática (PTI).** La púrpura trombocitopénica idiopática es un trastorno inmunológico caracterizado por la disminución del recuento de plaquetas de forma transitoria o persistente. Uno de los mecanismos propuestos para el desarrollo de PTI en pacientes infectados por *H. pylori* es la reactividad cruzada entre anticuerpos dirigidos contra esta bacteria; específicamente, contra su proteína CagA, y proteínas en la superficie de las plaquetas [32].
- **Déficit de vitamina B₁₂.** La infección por *H. pylori* puede afectar la homeostasis de micronutrientes como la vitamina B₁₂. Se ha sugerido que la infección por *H. pylori* puede desempeñar un papel importante en la reducción de la producción de ácido estomacal, la secreción de factor intrínseco y por lo tanto, una deficiencia en la absorción de vitamina B₁₂ [33].

3.2. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* existen dos tipos de métodos, los métodos invasivos (se basan en la obtención en una muestra de biopsia gástrica a través de una endoscopia) y los no invasivos (no requieren endoscopia previa) [15].

3.2.1. Métodos invasivos

- **Histología.** El examen histopatológico es considerado como la prueba estándar para la detección de *H. pylori*. El estudio histológico de la biopsia permite conocer las lesiones de la mucosa, valorando el grado de gastritis, metaplasia o atrofia, además de detectar la infección por *H. pylori* [15].
- **Cultivo.** El aislamiento mediante cultivo de *H. pylori* es sin duda el método más específico en el diagnóstico de la infección, ya que incluye el diagnóstico microbiológico, la clasificación genotípica del microorganismo, la evaluación de su toxicidad y virulencia, la determinación y monitoreo de la resistencia a antibióticos y producción de antígenos. Además, este método permite preservar la cepa para futuros estudios [34].
- **Test de ureasa.** Es una prueba rápida que se basa en la detección de la enzima bacteriana ureasa con un 95 % de sensibilidad y un 100 % de especificidad. Esta enzima facilita la supervivencia de la bacteria en el ambiente ácido del estómago, ya que descompone la urea en amoniaco y dióxido de carbono, lo cual genera un pH básico. Debido al indicador de pH, se produce un cambio de color del medio de naranja-amarillo a rosa [35].
- **Técnicas de detección molecular.** Existen numerosas técnicas que permiten detectar la presencia del DNA de *H. pylori* directamente de biopsia gástrica [36]. Una de ellas es la técnica PCR que detecta secuencias específicas de DNA bacteriano, pertenecientes a importantes genes involucrados en la patogenicidad y colonización de *H. pylori* [37].

3.2.2. Métodos no invasivos

- **Serología.** Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos específicos frente a antígenos específicos de *H. pylori* como CagA o VacA en suero, saliva u orina [15,36]. *H. pylori* provoca una respuesta inmunitaria local y sistémica, el sistema inmune responde aumentando los niveles de IgM específica, seguido de un aumento de los tipos IgG e IgA, los cuales persisten durante la infección [36].
- **Prueba del aliento (*urea breath test, UBT*).** Es una de las pruebas más confiables y más empleadas para diagnosticar la infección por *H. pylori*. Este método indirecto se basa en la presencia de la enzima ureasa de *H. pylori*. El patógeno se encuentra en el estómago donde hidroliza la urea marcada con el isótopo ^{13}C o ^{14}C gracias a la enzima ureasa y libera CO₂ marcado, que se difunde a la sangre y pasa a los pulmones dónde es liberado

con el aliento. Los resultados se miden como la relación de ^{13}C o $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la prueba con respecto al estándar en un espectrómetro de masas [15].

- **Detección de antígenos en heces.** Esta prueba se recomienda cuando la prueba del aliento no está disponible. Permite la detección de antígenos de *H. pylori* en muestras de heces utilizando anticuerpos monoclonales o policlonales [15]. Actualmente hay dos pruebas disponibles en el mercado: el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y el Ensayo Rápido Inmunocromatográfico (ICT) [37].

3.3. Factores de virulencia

Existe una gran variedad de factores de virulencia que permiten a *H. pylori* infectar, permanecer y dañar la mucosa gástrica (Figura 3). *H. pylori* es una bacteria que se ha adaptado a sobrevivir en el ambiente ácido del estómago. La motilidad de los flagelos de *H. pylori* hace que se mueva hacia las células del epitelio gástrico del huésped y las adhesinas permiten que las bacterias interactúen con los receptores celulares. Una vez ocurrida la adhesión y colonización, la bacteria libera toxinas efectoras, como CagA y VacA, causando daño en el tejido huésped. El epitelio gástrico, a su vez, libera quimiocinas para iniciar la respuesta inmune [38] provocando en el organismo huésped en la mayoría de los casos gastritis crónica y en una minoría complicaciones más severas como úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma MALT [39]. Desde que se descubrió esta bacteria, los investigadores han centrado sus estudios en la identificación de los factores de virulencia responsables de la progresión de la infección desde una gastritis hasta las manifestaciones clínicas más severas como el cáncer.

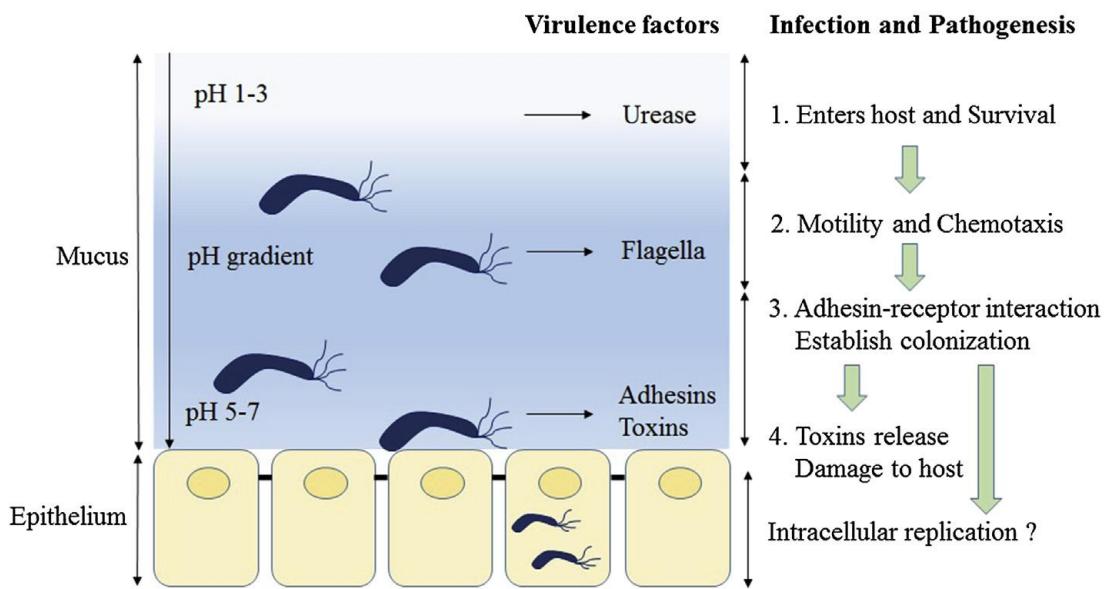


Figura 3. Diagrama de la infección por *H. pylori* y patogénesis [38].

3.3.1. Sistema Ureasa

El pH de la mucosa gástrica varía entre 4 y 6,5, pudiendo ocurrir picos de acidez ocasionales. Por ello, *H. pylori* ha desarrollado mecanismos para crecer en valores de pH en torno a 5,5 [40]. Para resistir al ácido del estómago se requiere la actividad de la enzima ureasa, enzima más abundante producida por *H. pylori* cuya actividad está regulada por el canal de urea dependiente de protones Urel, que permite la entrada de urea. A partir de la urea presente en el estómago, *H. pylori* produce grandes cantidades de amoniaco, el cual se combina con los protones secretados por las células parietales gástricas dando lugar a amonio y neutralizando el ácido del estómago [41]. El amonio produce importantes efectos tóxicos en el intestino como alteraciones en la síntesis de DNA, incremento del riesgo de infecciones virales y carcinogénesis [42].

3.3.2. CagA, CagE

La isla de patogenicidad de *cag* (*cagPAI*) es un segmento de DNA que contiene varios genes de virulencia, presenta un tamaño de 40 kb y su expresión está regulada por mecanismos que se activan o no, dependiendo de condiciones microambientales como el nivel de oxígeno, la osmolaridad, la fase de crecimiento bacteriano, el pH y la presencia de ácidos grasos volátiles de cadena corta [20].

La isla de patogenicidad *cagA* contiene 32 genes codificantes de proteínas que participan en el sistema de secreción tipo IV (T4SS), uno de los cuales codifica la proteína CagA (*cytotoxin*-

associated gene A). Esta proteína fue la primera identificada de PAI y constituye el principal factor de virulencia de *H. pylori*, por lo que su presencia (cepas *cagA* +) es un marcador directo de patogenicidad. El sistema de secreción tipo IV (T4SS) participa en la translocación de CagA y compuestos celulares tales como fragmentos de peptidoglucano bacteriano en el interior de las células gástricas epiteliales [43]. Además, estimula la liberación de citoquinas como IL-8, IL-1 β , TNF- α y la molécula NF-k β [44]. Una vez la toxina CagA es translocada a la célula de la mucosa gástrica y es posteriormente fosforilada, interactúa con diversas vías de señalización y desencadena cambios en el citoesqueleto, en la morfología y en la movilidad de la célula huésped [45]. No todas las cepas de *H. pylori* presentan este factor de virulencia [44]. Varios estudios como el de Yuan *et al.* han demostrado que las cepas *cagA* + presentan mayor virulencia y riesgo de producir enfermedades como gastritis atrófica, úlcera péptica y cáncer gástrico [45,46].

Otro miembro de cagPAI se llama *cagE* (*cytotoxin associated gene E*) y está relacionado con una mayor inducción de la secreción de IL-8 en las células epiteliales gástricas [47]. El gen *cagE*, al igual que *cagA*, es un biomarcador para determinar la existencia de cagPAI en la cepa [48]. La expresión de CagE tiene un papel relevante en el riesgo de desarrollar gastritis severa, úlcera péptica y cáncer gástrico [49]

3.3.3. VacA

La citotoxina VacA (*vacuolating cytotoxin A*) induce la formación de vacuolas dentro de la célula huésped mediante la formación de canales selectivos de aniones [50]. Además promueve la apoptosis, liberando citocromo C a través de la activación de proteínas proapoptóticas y mediante la activación del receptor Fas/CD95. La presencia de VacA induce la expresión de factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF) desencadenando procesos carcinogénos. Por otro lado, VacA aumenta la respuesta inflamatoria de la mucosa gástrica elevando la expresión de la ciclooxygenasa 2 en las células T, neutrófilos y macrófagos, lo que promueve también la carcinogénesis. A diferencia de lo que sucede con el gen *cagA*, todas las cepas de *H. pylori* son *vacA* +, aunque solo el 50 % de estas aproximadamente expresan la proteína [44].

3.3.4. IceA

El gen *iceA* (*Induced by contact with epithelium*) también está asociado con la infección por *H. pylori* [51]. *iceA* tiene dos variantes alélicas principales, designadas *iceA1* y *iceA2* [44]. El genotipo *iceA1* se ha asociado con una expresión incrementada de IL-8 en la mucosa y una inflamación antral aguda. Se ha observado que la adherencia de la bacteria a las células epiteliales gástricas *in vitro* estimula la transcripción de *iceA1* [52]. Varios estudios sugieren una asociación de la variante *iceA1* y úlcera péptica. A pesar de que este alelo está asociado con gastritis asintomática y dispepsia no ulcerosa, la función exacta de *IceA2* no se conoce *iceA2* no tiene homología con genes conocidos [53].

3.3.5. DupA

DupA (*Duodenal ulcer-promoting gene*) es el primer factor genético de *H. pylori* detectado que se asocia con una susceptibilidad diferencial a la úlcera duodenal y al cáncer gástrico, por lo que puede considerarse como un marcador de virulencia específico para estas enfermedades [52]. El mecanismo patogénico de DupA parece implicar la inducción de la expresión de IL-8 en el antro, lo que lleva a una gastritis con predominio del antro, con mayor producción de ácido y riesgo de desarrollar úlcera duodenal [54].

3.3.6. OipA

OipA (*Outer inflammatory protein*) juega un papel relevante en la colonización efectiva de la mucosa [55]. Varios estudios revelaron que OipA puede inducir inflamación a través de la fosforilación de múltiples vías de señalización que generalmente interactúan con otras vías relacionadas con *cagPAI* (CagA) [52]. Esta proteína está implicada en la adherencia bacteriana a las células epiteliales gástricas y en la inflamación de la mucosa mediante la inducción de IL-8 agravando la gastritis y favoreciendo el desarrollo de úlcera duodenal [56].

3.3.7. BabA

Cuando *H. pylori* coloniza la mucosa gástrica, a través de las adhesinas se une a los receptores de la célula diana protegiendo el posible desplazamiento de las bacterias por fuerzas del estómago como la peristalsis y el vaciamiento gástrico [38]. Una de las adhesinas más importantes en *H. pylori* es BabA (*blood antigen binding adhesion*), la cual se une a las células epiteliales gástricas a través del antígeno del grupo sanguíneo B y del antígeno Lewis, ubicado en la mucosa gástrica [57]. Esta unión desencadena una respuesta inmune no

específica y el desarrollo de autoanticuerpos frente a las células productoras de ácido, lo que contribuye al desarrollo de gastritis crónica [58]. Por otro lado, BabA facilita la entrada de CagA y VacA, factores de virulencia que favorecen el desarrollo de úlcera y cáncer gástrico [59].

3.3.8. Otros

- **Flagelos.** *H. pylori* atraviesa el mucus y se mueve desde la capa del epitelio de la mucosa gástrica hasta la capa basal, donde el valor del pH es más cercano a 7 con la ayuda de los flagelos polares, apéndices extracelulares que por ser importantes en el proceso de colonización son considerados factores de virulencia [38].
- **Sistemas antioxidantes.** Durante la colonización, *H. pylori* promueve una fuerte respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos y macrófagos, los cuales producen radicales de oxígeno que producen especies reactivas de oxígeno, con efectos potencialmente dañinos sobre la bacteria y la mucosa gástrica. *H. pylori* cuenta con mecanismos de detoxificación de estos radicales libres, así como para la reparación de los daños sufridos por la célula microbiana, que favorecen su supervivencia en el tejido inflamado [60]. Entre los sistemas enzimáticos de detoxificación de los metabolitos reactivos del oxígeno destacan la enzima superóxido dismutasa, la catalasa o peroxidasa, las peroxirredoxinas, la flavoproteína MdaB y el sistema tiorredoxina. Las proteínas RecA, UvrABC, endonucleasa III, MutSy RuvC, son mecanismos que utiliza la bacteria para la reparación de los daños producidos por los radicales libres [20].
- **Lipopolisacárido (LPS).** El LPS de *H. pylori* presenta una baja toxicidad en comparación con otras bacterias Gram-negativas. La estructura química del LPS de *H. pylori*, en concreto la cadena específica O, puede mimetizar los antígenos de grupo sanguíneo de Lewis. Cuando esto sucede, se promueve una respuesta inmune no específica y el desarrollo de autoanticuerpos frente a las células productoras de ácido, lo que contribuye a la gastritis crónica y la pérdida de células parietales [20].

4. PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN

La infección por *H. pylori* es considerada la infección crónica bacteriana de mayor prevalencia en humanos, afectando aproximadamente a 4.400 millones de personas en todo el mundo y constituyendo un importante problema de salud pública a nivel mundial. Existe

una gran variación en la prevalencia de *H. pylori* entre regiones y países. Como se puede observar en la Figura 4, regiones en vías de desarrollo como África (79,1 %), América Latina y el Caribe (63,4 %) y Asia (54,7 %) muestran una elevada prevalencia de la infección, a diferencia de América del Norte (37,1 %) y Oceanía (24,4 %), que son las zonas donde existe una menor prevalencia. La aparente correlación de la prevalencia en el nivel de desarrollo podría indicar mayores niveles de saneamiento, diagnóstico y tratamiento de la infección en los países desarrollados [61].

En España, la prevalencia de infección por *H. pylori* es algo superior al 50 % en la población adulta [62], en el noroeste de España la prevalencia aumenta hasta el 70 % [63], lo cual pudiera estar determinado por un mayor diagnóstico de la infección o debido a diferencias en los hábitos alimenticios de la población. Estos factores podrían también replicar una elevada prevalencia en países altamente industrializados como Finlandia [61].

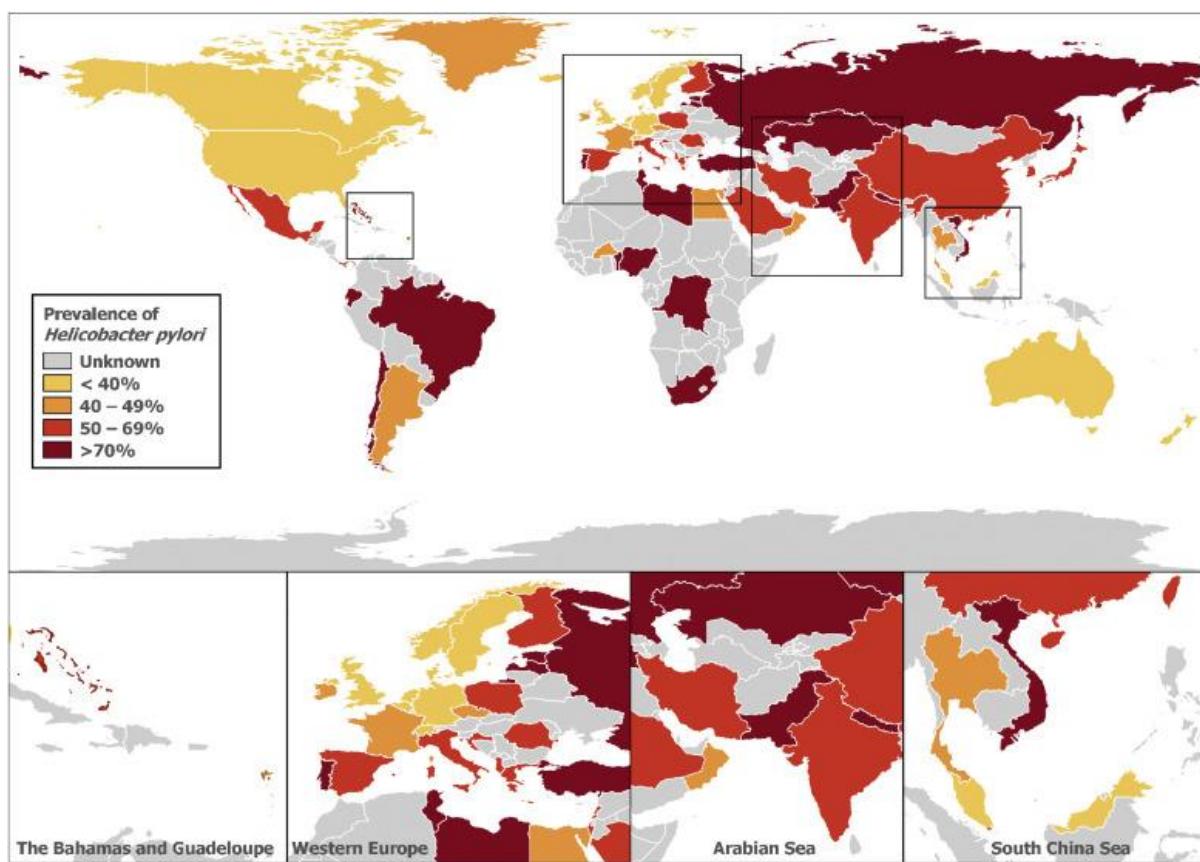


Figura 4. Prevalencia mundial de la infección por *H. pylori* [61].

5. PAUTAS DE TRATAMIENTO

El tratamiento de la infección por *H. pylori* ha cambiado drásticamente en estos años. Muchas pautas de tratamiento han quedado en desuso debido a la resistencia microbiana y la epidemiología cambiante. Por otro lado, el tratamiento frente a esta bacteria varía ampliamente en todo el mundo, por lo que resulta difícil establecer una guía única de terapia [64]. En la Tabla 1, se resumen los tratamientos usados para combatir la infección por *H. pylori*.

Tabla 1. Tratamientos empleados para erradicar la infección por *H. pylori* [65].

TERAPIA	COMPONENTES
Terapia dual	IBP + amoxicilina
Terapia triple estándar	IBP + claritromicina + amoxicilina
Terapia cuádruple con bismuto	IBP + bismuto + doxiciclina + metronidazol
	IBP + amoxicilina + bismuto + levofloxacina
	IBP + bismuto + tetraciclina + metronidazol
Terapia cuádruple sin bismuto	IBP + amoxicilina + claritromicina + metronidazol
Terapia secuencial	IBP + amoxicilina (5 días)
	IBP + claritromicina + metronidazol (5 días)
Terapia cuádruple concomitante con bismuto	IBP + bismuto + tetraciclina + metronidazol
Terapia cuádruple concomitante sin bismuto	IBP + amoxicilina + claritromicina + metronidazol

*IBP: Inhibidor de la bomba de protones.

5.1. Terapias de primera línea

La terapia triple estándar basada en el inhibidor de la bomba de protones (IBP) más dos antibióticos, claritromicina y amoxicilina o metronidazol, cuya duración es de 7 a 10 días, se ha considerado tradicionalmente como la terapia de primera línea para el tratamiento de infección por *H. pylori* [66]. Sin embargo, la eficacia de la misma ha disminuido de manera significativa en los últimos años. Hay varios factores que podrían explicar esta disminución: incumplimiento de la pauta por el paciente, alta acidez gástrica, alta carga microbiana infectante; pero la más importante es el aumento de la resistencia de *H. pylori* a la claritromicina. Como se muestra en la Figura 5, en áreas de alta resistencia dual a claritromicina y metronidazol, la terapia cuádruple con bismuto (BQT) constituye el tratamiento de elección. Si el bismuto no está disponible en dichas áreas, se pueden

considerar tratamientos con levofloxacina, rifabutina y altas dosis dobles (PPI + amoxicilina) [67]. En áreas con alta resistencia a claritromicina, pero baja o intermedia resistencia al metronidazol, se recomiendan las terapias cuádruples sin bismuto o con bismuto o las terapias concomitantes (IBP, amoxicilina, claritromicina y nitroimidazol). Estudios recientes en España, Grecia e Italia [68] han mostrado consistentemente tasas de curación que van del 85 % al 94 % con la terapia concomitante. En áreas geográficas donde la resistencia al metronidazol es baja, el reemplazo de claritromicina por metronidazol en terapia triple (es decir, IBP, amoxicilina, metronidazol) aún muestra excelentes tasas de curación [69]. En zonas con baja resistencia a la claritromicina, se recomienda la triple terapia como tratamiento de primera línea o la terapia cuádruple con bismuto como alternativa [70].

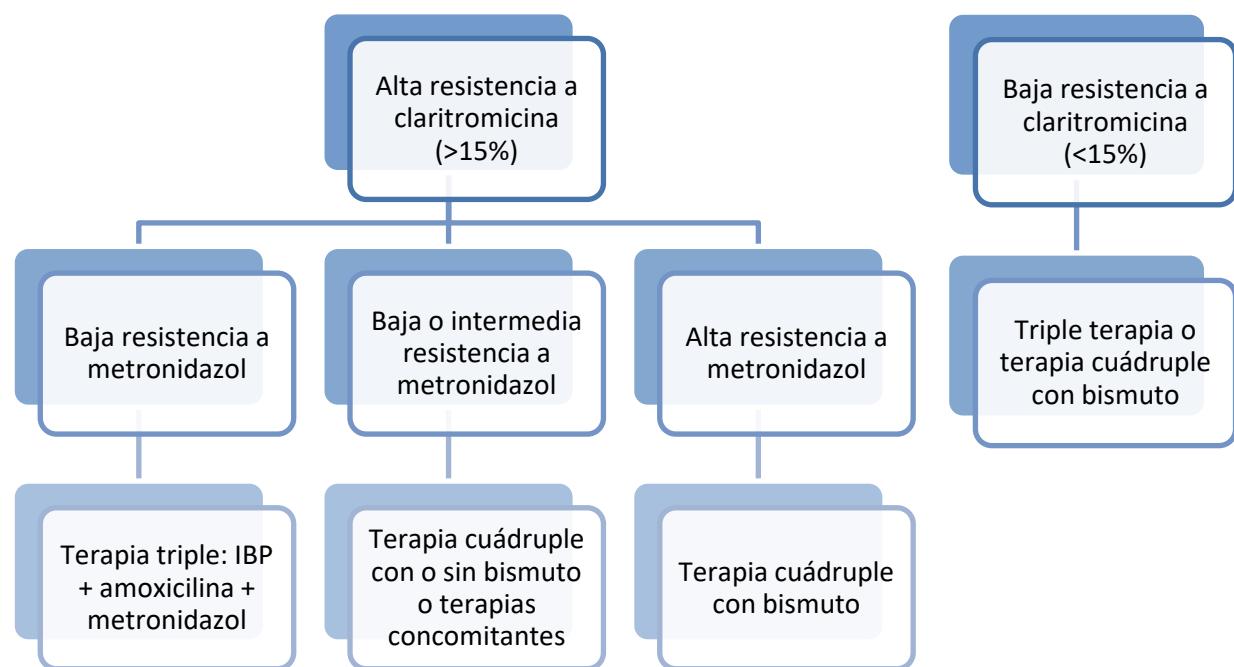


Figura 5. Algoritmo terapéutico frente a la infección por *H. pylori* en áreas con alta y baja resistencia a claritromicina. Editado de: [70].

La terapia cuádruple con bismuto consiste en un inhibidor de la bomba de protones (IBP) más bismuto y dos antibióticos, tetraciclina y metronidazol [64]. En el informe del V Consenso de Maastricht/Florencia de 2017 destacaron que la duración de este tratamiento debía extenderse a 14 días [70]. El grupo de Fischbach *et al.* realizaron varios estudios de eficacia y efectos adversos de esta terapia cuádruple, concluyendo que la eficacia de dicha terapia durante 1-3 días, 4 días o 7 días fue menor que cuando se administró durante 10-14

días [71]. La combinación de IBP, bismuto, metronidazol y tetraciclina con una duración de 10 a 14 días logró una tasa de erradicación ≥85 %, incluso en áreas con una elevada resistencia a metronidazol [70]. En España, la terapia cuádruple con bismuto se considera una alternativa como tratamiento erradicador de primera línea [62].

La terapia cuádruple sin bismuto incluye un IBP y tres antibióticos: claritromicina, amoxicilina y metronidazol o tinidazol. Actualmente, de acuerdo a las recomendaciones de la IV Conferencia Española de Consenso sobre el tratamiento de *H. pylori*, puede ser una terapia de rescate de segunda línea para pacientes que fracasan después de la terapia cuádruple con bismuto, pero el nivel de evidencia es bajo para esta recomendación [70]. Su eficacia dependerá de la resistencia de las cepas de *H. pylori* a claritromicina y metronidazol [62].

La denominada terapia secuencial consiste en la administración de un IBP junto con amoxicilina durante los primeros días (habitualmente 5), para posteriormente combinar el IBP con claritromicina y un nitroimidazol (como metronidazol o tinidazol) durante unos días más (generalmente también 5) [72]. Cuando se evaluó la eficacia conjuntamente con datos de susceptibilidad antimicrobiana, se pudo observar que este tratamiento pierde eficacia en regiones donde la resistencia aislada a metronidazol es alta y la tasa combinada de resistencia a claritromicina y metronidazol es mayor al 5 % [65]. En concreto, en España varios estudios previos han evaluado el tratamiento secuencial y han demostrado una tasa de curación discreta (81-84 %) [73] o incluso inaceptable (76 %) [74].

La terapia cuádruple concomitante sin bismuto es la más utilizada y consta de IBP y tres antibióticos: amoxicilina, claritromicina y metronidazol [75]. Esta terapia recomendada en zonas donde la resistencia simultánea a claritromicina y metronidazol no es frecuente [76]. Así, el metronidazol eliminará las cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina y, de forma inversa, la claritromicina suprimirá las resistentes a metronidazol [75]. En España se han realizado numerosos estudios donde se ha evaluado la eficacia de la terapia cuádruple sin bismuto concomitante llegando a obtener aproximadamente un 90 % de erradicación [76]. En consecuencia, esta terapia es considerada una alternativa de primera elección [62]. Los primeros estudios en Europa sugirieron una duración de tratamiento entre 3-5 días [77], sin

embargo, se ha demostrado que, con una duración del tratamiento más larga de 14 días, se obtienen tasas de erradicación más altas, en torno al 91 % [78].

La terapia cuádruple concomitante con bismuto incluye IBP, bismuto, tetraciclina y metronidazol. En un estudio realizado por Molina-Infante *et al*, en 2017, compararon la terapia triple durante 14 días frente a la cuádruple con bismuto y concomitante durante 10 días. No se encontraron diferencias significativas en eficacia de la terapia cuádruple con bismuto (90 %) y concomitante (86 %), con una eficacia inferior de la terapia triple (83 %). Esto señala la necesidad de cambiar las terapias cuádruples e incrementar la duración de la terapia concomitante para mejorar su eficacia [65].

5.2. Terapias de segunda línea

Después del fracaso de la terapia de primera línea, la terapia de segunda línea no debe incluir antibióticos utilizados en el tratamiento anterior. La terapia cuádruple con bismuto o la terapia triple de levofloxacina constituyen frecuentemente el próximo tratamiento de elección [64].

5.3. Terapias de tercera línea

Después del fracaso de las terapias de primera y segunda líneas, es recomendable hacer pruebas de resistencia a los antimicrobianos, sin embargo, en ocasiones, estas pruebas no están disponibles por falta de un aislamiento clínico al microscopio óptico. Como tratamiento de tercera línea se deben administrar medicamentos no utilizados por el paciente en las terapias de primera y segunda líneas. Una alternativa para el tratamiento de tercera línea puede ser una terapia cuádruple de levofloxacina a base de bismuto o una terapia triple que contenga rifabutina (IBP más rifabutina y amoxicilina). Sin embargo, dado que la rifabutina es un antibiótico reservado para combatir la tuberculosis, el uso masivo de este antimicrobiano frente a *H. pylori* no está recomendado, en aras de minimizar el desarrollo de resistencias [64].

6. CRISIS DE ANTIBIÓTICOS: MECANISMOS DE RESISTENCIA EN *H. PYLORI*

El aumento en la resistencia bacteriana a los antibióticos constituye uno de los problemas más importantes de salud mundial y debe constituir una prioridad para la comunidad científica. En las últimas décadas, el uso inapropiado de antibióticos, la adquisición y la acumulación de genes de resistencia por los patógenos de mayor importancia clínica y la falta de desarrollo de nuevos medicamentos por parte de la industria farmacéutica han contribuido a un aumento significativo de la resistencia a los antibióticos en todo el mundo [79,80] lo que ha afectado en gran medida a la eficacia de los tratamientos actuales [81]. Las tasas de resistencia de *H. pylori* a claritromicina, metronidazol y levofloxacina han aumentado en los últimos años en todas las regiones epidemiológicas definidas por la OMS.

En un estudio realizado por Savoldi *et al.* [82] se observó un aumento de la resistencia a claritromicina en el suroeste de Asia del 13 % en 2006-2008 al 21 % en 2012-2016 y a la levofloxacina en el Pacífico del 12 % en 2006-2008 al 31 % en 2012-2016. En América, la resistencia oscila alrededor del 20 % de los aislamientos, el 28 % en Europa y el 32 % en la región del Mediterráneo Oriental. La resistencia a metronidazol se detectó en tasas muy elevadas en todos los continentes (América 29 %, Pacífico 57 %, Asia 53 %, en el Mediterráneo Oriental 60 % y Europa 46 %), mientras las tasas de resistencia a levofloxacina superan el 10 % (América 19 %, Europa 12 %, Mediterráneo Oriental 24 %, Asia 29 % y Pacífico 31 %) [82].

El grupo de Macías-García *et al.*, estudiaron en 2017 las tasas de resistencia de *H. pylori* a los antibióticos en España. Los resultados confirmaron elevadas tasas de resistencia a todos los antibióticos de uso común: levofloxacina (38,7 %), metronidazol (27 %) y claritromicina (22,4 %) [83]. La resistencia observada a levofloxacina (38,7 %) fue significativamente mayor de lo observado en estudios anteriores en España y Europa (14,1 %) [84]. La resistencia a claritromicina (22,4 %) fue algo superior a otros resultados recientes en España: 14,7 % [85], 17,9 % [86], 21,5 % [87]. Sin embargo, la resistencia a metronidazol (27 %) fue ligeramente menor de lo informado en otros estudios: 45,1 % [85] y 39,2 % [88].

6.1. Resistencia a claritromicina

La claritromicina es un medicamento bactericida para *H. pylori* que pertenece a la familia de los macrólidos y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas al unirse y ralentizar la actividad de la subunidad ribosomal 23S [89]. Mutaciones puntuales en la subunidad 23S constituyen el mecanismo principal de resistencia, ya que inhiben la unión entre la claritromicina y su diana [90]. Las mutaciones más frecuentes (90 %) son la sustitución de adenina por citosina en las posiciones 2143 y 2142 de rRNA [91]. Otro mecanismo, además de las mutaciones, son las bombas de eflujo. Se ha demostrado que cuatro genes de la familia RND están involucrados en la resistencia a claritromicina [92].

6.2. Resistencia a metronidazol

El metronidazol es un antibiótico nitroimidazol utilizado particularmente contra bacterias anaerobias y protozoos. La actividad bactericida del metronidazol depende de la reducción de sus grupos nitro en radicales aniónicos, derivados nitrosos e hidroxilaminas que pueden dañar la estructura helicoidal del DNA. Estas reacciones de reducción dependen de los componentes de las cadenas de electrones, por lo tanto, la supresión o reducción de la actividad de los transportadores de electrones causa resistencia a los antibióticos [93]. El mecanismo principal que confiere resistencia al metronidazol son las mutaciones puntuales en el gen *rdxA* [94]. Actualmente se han encontrado además proteínas de eflujo de membrana externa (OEP) en *H. pylori* que interactúan con translocasas intracelulares y regulan la secreción de diferentes antibióticos, entre ellos el metronidazol [95].

6.3. Resistencia a levofloxacina

La levofloxacina es un antibiótico que pertenece a la familia de las fluoroquinolonas, activas tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas [96]. La levofloxacina se une a la subunidad A de la DNA girasa (topoisomerasa II), enzima esencial para separar las cadenas de DNA durante la replicación [97]. La resistencia de *H. pylori* a la levofloxacina se debe a mutaciones puntuales en el gen *gyrA*, evitando la unión entre el antibiótico y la enzima [98]. La utilización de levofloxacina como tratamiento frente a *H. pylori* es cada vez mayor debido al aumento significativo de resistencias a claritromicina [97].

6.4. Otros mecanismos de resistencia

La amoxicilina es un antibiótico derivado de la penicilina que actúa frente a bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Los mecanismos principales de resistencia a amoxicilina en *H. pylori* son la alteración de las proteínas de unión a la penicilina o la disminución de la permeabilidad de la membrana celular [64]. Se ha informado que los niveles más recientes de resistencia a la amoxicilina siguen siendo relativamente bajos exceptuando algunas regiones geográficas del mundo como Pakistán, China, Japón, India e Irán [99], con tasas de resistencia superiores a 15 % y hasta 37 %. La tetraciclina es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis de proteínas y el crecimiento bacteriano. En *H. pylori*, el mecanismo primario de resistencia a la tetraciclina es mediante mutaciones genéticas en el sitio de unión de la tetraciclina [64]. La resistencia de *H. pylori* a tetraciclina continúa siendo baja (<5 %) o incluso ausente en la mayoría de los países desarrollados y en algunos países en vías de desarrollo [100].

7. NUEVAS DIANAS PARA NUEVOS ANTIMICROBIANOS

En febrero de 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó su primera lista de patógenos prioritarios para los esfuerzos de I+D en la búsqueda de nuevos antimicrobianos. Este catálogo de 12 familias de bacterias representa en la actualidad la mayor amenaza para la salud humana, dada su alta resistencia a los antibióticos de uso clínico. Los patógenos de la lista se clasificaron en tres estados prioritarios: crítico, alto y medio, con las cepas de *H. pylori* resistentes a claritromicina dentro de la categoría de alta prioridad [101]. Tras este llamamiento a la comunidad científica internacional, numerosos investigadores han centrado sus estudios en la búsqueda de nuevos antimicrobianos contra este patógeno, con el objetivo de superar los actuales mecanismos de resistencia desarrollados por *H. pylori*, aumentar las tasas de erradicación y minimizar los efectos colaterales indeseables contra la microbiota normal.

Inexorablemente, las bacterias en su evolución desarrollarán estrategias para superar la acción de los compuestos antimicrobianos del ambiente para lograr sobrevivir. A pesar de la existencia de más de 20 clases diferentes de antibióticos en la actualidad, todos están dirigidos frente a solo 5 dianas terapéuticas o procesos fisiológicos esenciales en la célula bacteriana: la síntesis e integridad de la pared celular, la síntesis de ácidos nucleicos, la

síntesis de proteínas, la síntesis de ácido fólico y la integridad de la membrana plasmática. Con vistas a evadir los actuales mecanismos de resistencia, el desarrollo de nuevos fármacos frente a nuevas dianas moleculares permitiría combatir con éxito la actual crisis de los antibióticos. El uso de nuevas dianas moleculares podría conducir al desarrollo de nuevas clases de antimicrobianos que logren evadir los mecanismos de resistencia desarrolladas por los microorganismos a los antibióticos de uso actual. En tal sentido, aquellas biomoléculas esenciales para el crecimiento, la colonización del hospedero, la aclimatación y la supervivencia del patógeno constituyen prometedoras dianas terapéuticas [102].

Entre las biomoléculas bacterianas consideradas como prometedoras dianas terapéuticas se incluyen enzimas como la topoisomerasa I, las tiol-oxidorreductasas, la biotina ligasa, las anhidrasas carbónicas, la sortasa A, enzimas de biosíntesis del lípido A, la ATP sintasa y enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos bacterianos, entre otros. Asimismo, muchos factores de virulencia que desempeñan papeles relevantes en la colonización del hospedero, la invasión y el daño, constituyen candidatos a dianas terapéuticas para el desarrollo de nuevos fármacos. En tal sentido, las llamadas estrategias “anti-virulencia” dirigidas contra adhesinas, proteínas implicadas en el *quorum-sensing*, las bombas de eflujo, los sistemas de secreción y las toxinas se consideran en la actualidad herramientas terapéuticas alternativas o complementarias a los tratamientos antimicrobianos clásicos, que podrían además de disminuir los daños que la infección causa al paciente, potenciar la eficacia de los antibióticos convencionales en terapias combinatorias [102].

En *H. pylori* existen diferentes procesos fisiológicos esenciales que pudieran constituir prometedoras dianas terapéuticas para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, entre ellos el control del pH ambiental, la motilidad, la adherencia, las bombas de eflujo o los factores de virulencia (Figura 6) [103]. Algunas de las biomoléculas consideradas en la actualidad posibles dianas terapéuticas frente a la infección por *H. pylori* se detallan en la Tabla 2.

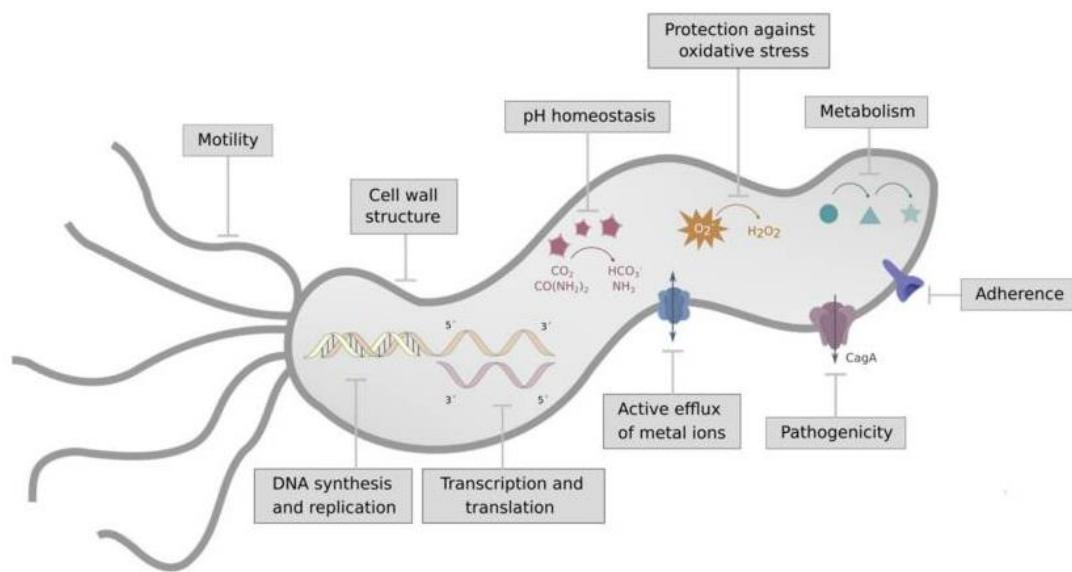


Figura 6. Procesos fisiológicos y mecanismos de patogenicidad considerados posibles dianas terapéuticas frente a la infección por *H. pylori* [103].

Tabla 2. Biomoléculas consideradas como dianas terapéuticas para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos frente a la infección por *H. pylori* [103].

DIANA MOLECULAR	PROCESO FISIOLÓGICO DONDE ACTÚA
Flavodoxina	Descarboxilación oxidativa de piruvato
Shikimato quinasa	Ruta shikimato
Fumarato reductasa	Ciclo de Krebs y respiración anaeróbica
Citocromo C oxidasa	Síntesis de ATP
Glutamato racemasa	Biosíntesis de peptidoglucano
Ureasa	Aclimatación a pH bajo
Canal de urea Urel	Permeabilidad de la urea
Anhidrasa carbónica	Aclimatación a pH bajo
Proteínas flagelares FlaA y FlaB	Composición del filamento flagelar
Citotoxina CagA	Isla de patogenicidad de <i>cag</i> (modulación del metabolismo de la célula huésped, inflamación, metaplasia y transformaciones precancerosas)
Sistemas de secrección tipo IV (T4SS)	Isla de patogenicidad de <i>cag</i> (translocación de factores bacterianos (por ejemplo, CagA y peptidoglicano) en células huésped)
Citotoxina VacA	Vacuolación celular, apoptosis e inhibición de la progresión del ciclo celular y la respuesta inmune del huésped
Adhesinas BabA, SabA, HopZ, OipA, AlpA/B	Adhesión a las células huésped
Superóxido dismutasa	Dismutación de superóxido
Tiorredoxina reductasa	Prevención de la formación de especies reactivas tóxicas

Entre la gran cantidad de genes indispensables para el crecimiento y la supervivencia de los patógenos bacterianos en el huésped, los reguladores transcripcionales (TR) se destacan como prometedoras dianas terapéuticas dado el posible efecto *multi-targeting* de las moléculas anti-TR sobre la virulencia y la fisiología celular [104].

Los medicamentos anti-TR inhibirán no solo la actividad de los TR, sino que también afectarán potencialmente la expresión de los genes ubicados en etapas posteriores de la red regulatoria, los cuales en sí mismos también pudieran codificar biomoléculas esenciales. Los fármacos anti-TR podrían funcionar como quimioterapia bactericida o bacteriostática, pero también como estrategias anti-virulencia, evitando la expresión de toxinas, adhesinas, invasinas, cápsulas, mecanismos de *quorum sensing* y bombas de flujo, incrementando la susceptibilidad del microorganismo a la respuesta inmune del huésped o la acción de antibióticos convencionales en terapias combinatorias [104].

En *H. pylori*, el regulador transcripcional similar a OmpR, ArsR, es parte del sistema de dos componentes ArsRS de respuesta ácida (también conocido como sistema HP165-HP166), compuesto por la proteína sensora quinasa ArsS (HP165) y el regulador de respuesta ArsR (HP166). Mediante este mecanismo de transducción de señales, la acidificación del periplasma de *H. pylori* en el estómago humano es detectada por ArsS a través de la protonación de residuos de histidina del dominio sensorial periplásмico. Esta señal ambiental desencadena la auto-fosforilación de ArsS y la transfosforilación del regulador de respuesta ArsR, lo que en consecuencia aumenta la afinidad del regulador transcripcional a secuencias de DNA ubicadas en los promotores diana sensibles al ácido [105].

El sistema de dos componentes ArsRS es esencial tanto para la aclimatación ácida como para la colonización estomacal de *H. pylori*. La expresión de varios mecanismos moleculares involucrados en la resistencia al ácido, como el sistema ureasa, la proteína del canal de la membrana interna Urel, la arginasa RocF, la anhidrasa alfa-carbónica HP1186, así como las amidas alifáticas AmiE y AmiF se encuentra regulada transcripcionalmente por la forma fosforilada de ArsR (ArsR-P). Adicionalmente, el sistema de dos componentes ArsRS controla la expresión de factores de virulencia relevantes de *H. pylori*, incluidas las adhesinas y la producción de biofilm. Mientras que los mutantes de delección de ArsS son viables *in vitro*, el regulador de respuesta ArsR resulta esencial para la viabilidad de *H. pylori*, lo cual sugiere

que varios genes esenciales incluidos en el regulón ArsR parecen estar regulados transcripcionalmente por la forma no fosforilada de ArsR, de forma independiente a ArsS. Al constituir una proteína esencial para la viabilidad del microorganismo, producida fácilmente en condiciones de laboratorio y sin contraparte funcional en humanos, el regulador de respuesta ArsR puede ser considerada una diana terapéutica prometedora frente a la infección por *H. pylori* [104].

Otro de los reguladores transcripcionales que constituye una prometedora diana terapéutica en *H. pylori* es el regulador de respuesta "huérfano" HsrA. HsrA (*homeostatic stress regulator A*) es único y altamente conservado entre los miembros de Epsilonproteobacteria. La proteína funciona como un regulador homeostático global que sincroniza las funciones metabólicas y la virulencia con la disponibilidad de nutrientes y la división celular, mediando también la respuesta al estrés oxidativo. HsrA modula su propia expresión y la de una gran cantidad de genes involucrados en funciones celulares cruciales como traducción, transcripción, metabolismo energético, metabolismo del nitrógeno y homeostasis redox. Los análisis de espectroscopía de RMN y cristalografía de rayos X propusieron que HsrA existe como un dímero simétrico *in vivo* con dos dominios funcionales bien definidos, un dominio regulador N-terminal y un dominio efector/de unión a DNA C-terminal. A diferencia de la mayoría de los reguladores de respuesta, donde la fosforilación del dominio regulador desencadena cambios conformacionales que promueven la dimerización de la proteína y activan su función de unión al DNA, los dos dominios de HsrA parecen actuar de forma independiente. Por lo tanto, las mutaciones en el dominio regulador N-terminal que inhibieron la dimerización no afectaron la función de unión al DNA, mientras que la eliminación del dominio efector C-terminal no tuvo efecto sobre la capacidad de dimerización de la proteína. Los intentos tanto de eliminación como de sobreexpresión de HsrA han resultado infructuosos, respaldando no solo una función esencial del regulador sino también un control postranscripcional muy estricto de su expresión que asegura niveles apropiados de la proteína en la célula [105].

Desde hace varios años, el grupo de Patología Digestiva del Instituto de Investigación Sanitaria Aragón (IIS-Aragón) desarrolla un proyecto encaminado en la identificación y evaluación básica y preclínica de nuevos compuestos antimicrobianos frente a cepas de *H. pylori* resistentes a los antibióticos convencionales. Nuestro equipo, liderado por los Dres

Andrés González y Ángel Lanas, constituye el primer grupo de investigación en el mundo que han empleado con éxito el uso de los reguladores transcripcionales ArsR y HsrA de *H. pylori* como nuevas dianas terapéuticas. Pequeñas moléculas de naturaleza química diversa logran inhibir la actividad biológica de ArsR y HsrA *in vitro* y muestran una potente actividad bactericida frente a diferentes cepas de *H. pylori*, incluyendo cepas resistentes a claritromicina y metronidazol. Varios de estos pequeños compuestos han demostrado además un fuerte efecto sinérgico en su actividad anti-*H. pylori*, en combinación con antibióticos convencionales. Adicionalmente, algunos de estos potenciales nuevos antimicrobianos han logrado reducir significativamente la colonización gástrica de *H. pylori* en ratones [104,105,106].

8. MODELOS ANIMALES PARA LA INFECCIÓN POR *H. PYLORI*

El uso de modelos animales para el estudio de la infección por *H. pylori* ha sido muy amplio a nivel mundial [107]; sin embargo, no se ha conseguido aún un modelo animal idóneo para este fin [108]. Cada modelo empleado en la actualidad tiene sus ventajas e inconvenientes y su elección dependerá de los objetivos experimentales propuestos [107].

Entre la gran variedad de modelos animales empleados para estudiar la patogénesis de la infección por *H. pylori* destacan los roedores, pero también animales más grandes como primates, gatos, perros y cerdos. Ningún modelo animal es capaz de replicar todos los resultados patológicos de la infección en humanos, sin embargo, cada modelo en específico permite simular con mayor exactitud algún mecanismo patogénico de la infección por *H. pylori* en el hombre [109]. Por ejemplo, los jerbos han sido utilizados comúnmente para investigar los factores del huésped que permiten una colonización gástrica óptima [110] y para estudiar el desarrollo de patologías como adenocarcinoma gástrico [111] y úlceras pépticas [112]. En primates como los monos macacos se observó que las patologías inducidas por la infección eran muy similares a las observadas en humanos [113].

8.1. Ratones

Los modelos animales *in vivo*, particularmente ratones, son altamente informativos al permitir a los investigadores estudiar las contribuciones relativas de los factores del huésped, bacterianos y ambientales en la infección por *H. pylori* y el resultado de la

enfermedad [114]. A diferencia de otros modelos experimentales, su fácil manipulación genética permite el desarrollo de líneas puras (*inbred lines*) homocigóticas para todos sus genes, lo cual garantiza la estabilidad genética de los animales tras sucesivas generaciones. Además, los ratones son baratos en comparación con otros modelos animales, están bien caracterizados y son fácilmente manejables en el laboratorio [115]. En cada modelo de estudio resulta crucial considerar la línea óptima tanto del modelo ratón como de la cepa bacteriana, así como la dosis, vía de inoculación y la duración de la infección entre otras variables, con el objetivo de adaptarse mejor al propósito del experimento [116].

En 1997, Lee *et al.* desarrollaron una cepa de *H. pylori* altamente colonizadora de la mucosa gástrica de ratón, llamada comúnmente cepa Sydney de *H. pylori* o cepa SS1, siendo *cagA* y *vacA* positivas [117]. La cepa SS1 de *H. pylori* es un derivado adaptado a ratón de un aislamiento clínico que se informó que albergaba un *cagPAI* incompleto, ya que carece de un marco de lectura abierto. Sin embargo, no parece que esta ausencia pueda proporcionar una explicación molecular de la incapacidad de la cepa SS1 para inducir la secreción de IL-8 en las células epiteliales gástricas, sino que parece que el defecto en la inducción de IL-8 exhibido por *H. pylori* SS1 está relacionado con su incapacidad para activar NF-K en las células epiteliales gástricas [118]. SS1 coloniza consistentemente múltiples cepas de ratones, como C57BL/6, a un nivel alto. Sin embargo, la colonización de otras cepas de ratón como BALB/c, DBa/2 y C3H/He, aunque ocurre, es menor. SS1 establece una infección que persiste durante muchos meses, proporcionando así una oportunidad ideal para estudiar los efectos de la infección crónica y la especificidad del huésped en este modelo animal. El éxito de la cepa SS1 para colonizar el ratón podría deberse a que el aislamiento humano original posee una capacidad intrínseca mayor de sobrevivir en el estómago de los roedores en comparación con otros aislamientos de *H. pylori* [117].

Arnold *et al.* en 2011 utilizaron un modelo de infección CagA + para investigar los mecanismos subyacentes a la susceptibilidad diferencial de las personas infectadas al desarrollo de la enfermedad gástrica asociada a *H. pylori*. La cepa de *H. pylori* utilizada en este estudio para la experimentación *in vivo* en modelos de ratones C57BL/6 fue PMSS1 (cepa Sydney 1 pre-mouse), que tiene una isla de patogenicidad *cag* intacta y expresa un sistema de secreción de tipo IV (T4SS) [119]. PMSS1 coloniza ratones, aunque a niveles significantemente más bajos que SS1. En contraste con la mayoría de cepas de

H. pylori colonizadores de ratones, PMSS1 alberga el gen *cagA*, expresa la correspondiente proteína y es capaz de inyectar CagA en células epiteliales gástricas humanas cultivadas. Sin embargo, si bien PMSS1 parece tener mayor nivel de patogenicidad en ratones, con el tiempo (3 meses) se ha informado que las cepas aisladas a partir de ratones previamente inoculados pierden la capacidad de translocar CagA [120]. La cepa PMSS1 produce infección a largo plazo en ratones induciendo inflamación gástrica e infiltración de neutrófilos progresando a metaplasia intestinal [121]. Los resultados del estudio mostraron que los ratones infectados a las 5-6 semanas de edad con cepas CagA + de *H. pylori* desarrollaron rápidamente gastritis, atrofia gástrica, hiperplasia epitelial y metaplasia. En contraste, los ratones infectados en período neonatal con la misma cepa parecían protegidos de estas lesiones. En tal sentido, la edad de infección inicial en humanos pudiera explicar la susceptibilidad diferencial de las personas infectadas a las manifestaciones de la enfermedad asociada a *H. pylori* [120].

8.2. Jerbos

El jerbo mongol (*Meriones unguiculatus*) es un modelo de roedor eficiente, rentable y de fácil cuidado. Es empleado como huésped de diversos microorganismos y parásitos de interés clínico, entre ellos *H. pylori* [122]. La función del sistema de secreción de *H. pylori* T4SS se pierde comúnmente durante la colonización de ratones [123], pero ocurre con menos frecuencia en el jerbo mongol, lo que pudiera indicar que este modelo sea más adecuado para el estudio de algunos factores de virulencia de *H. pylori* y de los procesos inflamatorios asociados a la infección. Sin embargo, a diferencia del modelo ratón, no se pueden establecer líneas puras en jebros, lo que determina una elevada variabilidad a la susceptibilidad de la infección por *H. pylori* entre individuos y en ocasiones una mala repetibilidad en los resultados de los estudios en este modelo [124].

En 1996, Hirayama desarrolló un modelo animal exitoso para el estudio de la infección de *H. pylori* en jebros mongoles. Demostró que los jebros mongoles son colonizados fácilmente por *H. pylori* y la infección induce varios cambios en la mucosa gástrica, como gastritis atrófica, úlceras y metaplasia intestinal, que imitan los resultados finales de la infección por *H. pylori* en humanos [125].

Una investigación realizada por Keto *et al.* en 2001, confirmó por primera vez que *H. pylori* induce carcinogénesis gástrica en jebos mongoles. Tras el tratamiento con IBP + claritromicina varios meses después se descubrió que los estómagos del modelo carecían de la infección [126].

En un estudio realizado por Lv *et al.* en 2014 evaluaron la eficacia de la vacuna multi-epítopo CTB-UE para estimular respuestas inmunes celulares y humorales específicas contra *H. pylori*, obteniendo una buena eficacia terapéutica contra la infección por la bacteria en un modelo de jerbo mongol [127].

El modelo de jerbo mongol también se utilizó para probar la eficacia de la inmunización terapéutica oral mediante una vacuna multivalente basada en epítopos (CWAE) contra *H. pylori* que mostró una reducción significativa en la colonización de los animales infectados con la bacteria [128].

8.3. Otros

Aunque los animales más empleados para la investigación en *H. pylori* hayan sido los ratones y jebos, también se han utilizado otros más grandes, puesto que, a pesar de su elevado precio y la carencia de infraestructuras adecuadas para su mantenimiento en la mayoría de centros de investigación, su larga supervivencia permite evaluar en detalle alteraciones a largo plazo como las observadas en los estudios de carcinogénesis.

- Los hurones (*Mustela furo*) se han usado ampliamente llegando a un 50 % de colonización de cepas de bacteria aisladas de humanos [129].
- El cerdo (*Sus scrofa*), inclusive cerdos gnotobióticos, han sido usados ampliamente logrando un 100 % de colonización en inoculaciones por vía oral [130]. El modelo de cerdo se ha utilizado mayoritariamente para el estudio de úlceras gástricas y carcinogénesis gástrica asociada a la infección por *H. pylori* [114].
- Perros y gatos también han sido utilizados para estudiar las infecciones y patologías causadas por *H. pylori*, con resultados del 99 % de colonización en infecciones experimentales [129].
- Los primates por sus características genéticas e inmunológicas similares al humano, se consideran el modelo animal ideal, pero por motivos económicos y bioéticos su empleo es limitado [114].

- Los lémures (*Hapalemur aureus*) han sido ampliamente utilizados, seguidos por el mono Rhesus (*Macaca mulatta*), el mono japonés (*Macaca fuscata*) e inclusive el chimpancé (*Pan troglodytes*) [129].

9. LAS 3RS EN EL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

MODELOS INVERTEBRADOS

En la década de 1950 hubo grandes protestas contra la experimentación con animales, lo que obligó a los investigadores a implementar mejoras en el cuidado y uso de los animales en los estudios. Estas mejoras siguieron principalmente los principios definidos por Russell y Burch en 1959: reemplazo, reducción y refinamiento conocidos como las "3R" [131] (Figura 7):

1. **Reemplazar.** Esta regla aborda la importancia de combinar diferentes métodos y fuentes de información para permitir el reemplazo de una investigación con animales [132]. La mayoría de los modelos animales son costosos, requieren mucho tiempo y dependiendo de la investigación, aparecen limitaciones. Esto se puede solucionar utilizando modelos alternativos. El reemplazo se divide en dos categorías [133]:
 - a. Reemplazo completo. Elimina por completo el uso de animales sustituyéndolos por células, tejidos, modelos matemáticos o informáticos.
 - b. Reemplazo parcial. Incluye algunos animales que no se consideran capaces de sufrir daño como invertebrados o formas inmaduras de vertebrados. Este reemplazo también incluye el uso de células primarias y tejidos extraídos de animales sacrificados.
2. **Reducción** en el número de animales utilizados en investigación. Es esencial que los estudios con animales se diseñen y analicen apropiadamente para garantizar que los resultados sean reproducibles y robustos con el menor número de animales posible. Este apartado también incluye métodos que permitan obtener la máxima información por animal en un experimento, reduciendo así el número de animales por ensayo [133].
3. El **refinamiento** conlleva al empleo de métodos que minimicen cualquier dolor, sufrimiento o angustia que puedan padecer los animales de investigación, así como mejorar el bienestar animal antes y durante el experimento. El refinamiento incluye todos los aspectos del uso de animales, desde su cría y alojamiento hasta los

procedimientos científicos realizados con ellos [133]. Comprometer el bienestar de un animal puede tener efectos posteriores ya que los animales utilizados en los estudios son a menudo fisiológicamente e inmunológicamente deficientes, lo que puede invalidar las conclusiones de los experimentos [131].

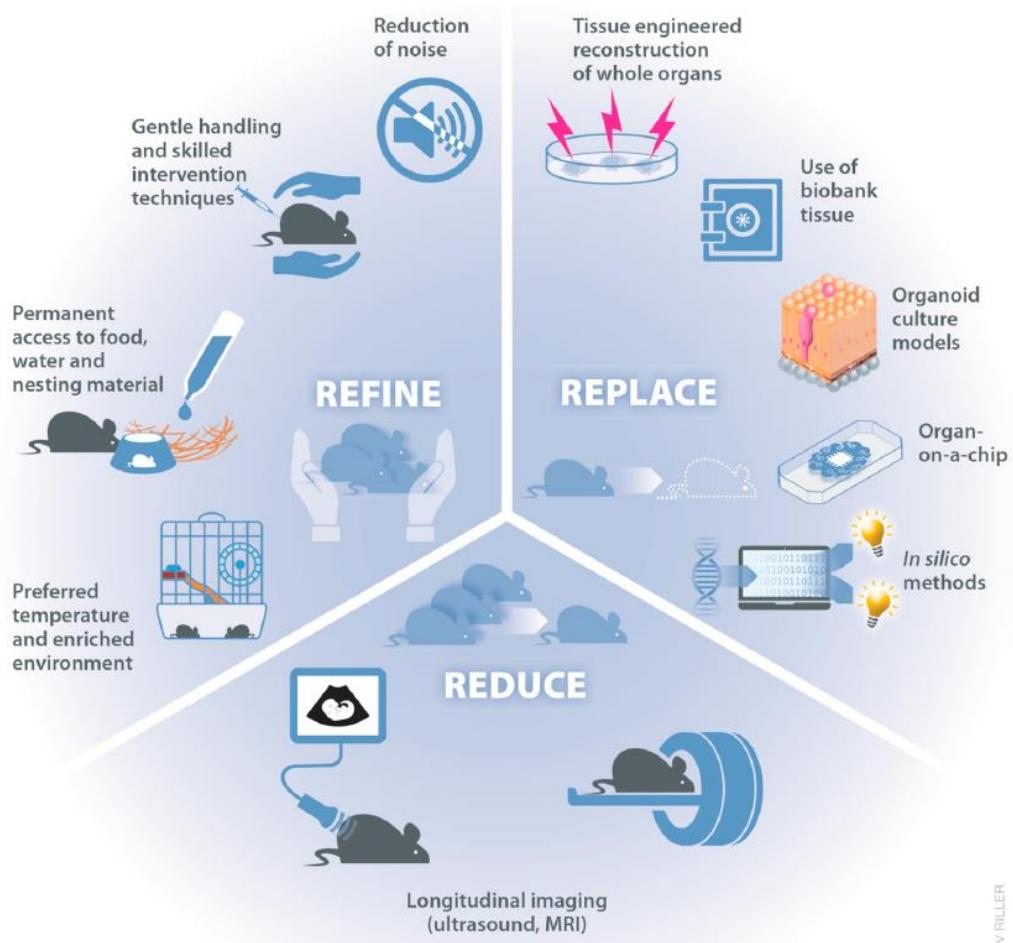


Figura 7. Principio 3R en diseños de investigación experimental [134].

La regla de las 3R ha generado un beneficio tanto para el cuidado de los animales como para la investigación. Una experimentación apoyada en el principio de las 3R proporciona mayor fiabilidad científica, validez y reproducibilidad. Sin embargo, no existe un estándar global para informar si alguno de los principios se ha aplicado y de qué forma se ha aplicado [131]. La legislación y la presentación de informes sobre el uso de animales de experimentación en relación con el principio de las 3R varía mucho entre los diferentes países, lo que aumenta las dificultades para implementar esta regla a nivel nacional e internacional [135].

En la actualidad, el principio de las 3R representa la metodología y ética de la Directiva Europea (Directiva 2010/63/UE) sobre la protección de los animales utilizados en procedimientos científicos. La directiva no es una serie de normas que prohíben o favorecen

el uso de animales en experimentación, sino que protege a los animales que se utilizan en el laboratorio hasta que se apliquen métodos alternativos que no impliquen su uso [136].

Hoy, todos los miembros de la comunidad científica que usan, cuidan y crían animales en el laboratorio, deben asumir su bienestar. Los científicos tienen que cumplir con las leyes, reglamentos, políticas y pautas descritos por cada país para el cuidado de los animales de investigación [137].

10. *GALLERIA MELLONELLA*

Galleria mellonella o también conocida como polilla de la cera es un insecto del Orden Lepidoptera y pertenece a la Familia de los pirálidos (*Pyralidae*). Los lepidópteros conforman el segundo orden más representado entre los insectos e incluye a todas las mariposas, tanto diurnas como nocturnas [138].

10.1. Características biológicas y ciclo de vida

G. mellonella habita comúnmente en colmenas, dentro de los nidos de las abejas, donde se alimenta de la cera y polen. Se puede considerar como causante de plagas en nidos de abeja y más raramente, de abejorros o avispas. *G. mellonella* es susceptible a la infección por diferentes tipos de bacterias, hongos y virus [139].

G. mellonella es un insecto holometabólico y presenta 4 etapas de vida: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos de la polilla de la cera (Figura 8) tienen forma esferoidal, con líneas onduladas, produciendo una textura rugosa. El color del huevo varía del rosa al blanco [140].



Figura 8. Etapas de desarrollo de *G. mellonella*. Huevos (1), larva de aproximadamente 10 días (2), larva de aproximadamente 20 días (3), larva de 25-35 días (4 y 5), larva de aproximadamente 40 días (última etapa larval) (6), pre-pupas y pupas (7 y 8), polillas adultas (9) [141].

Al eclosionar, las larvas de la polilla de la cera tienen una longitud de 1 a 3 mm y 0,12 a 0,15 mm de diámetro. Las larvas en estado tardío, antes de la pupación, logran una longitud de hasta 25 a 30 mm y un diámetro de 5 a 7 mm. En la etapa larval, el sexado entre machos y hembras resulta difícil ya que no se han desarrollado los caracteres morfológicos específicos del sexo. Las larvas tienen 6 patas en el tórax y varias patas en los segmentos abdominales del tercero al sexto. La larva presenta un color crema, aunque puede cambiar a colores oscuros cuando melaniza (Figura 9) [140].

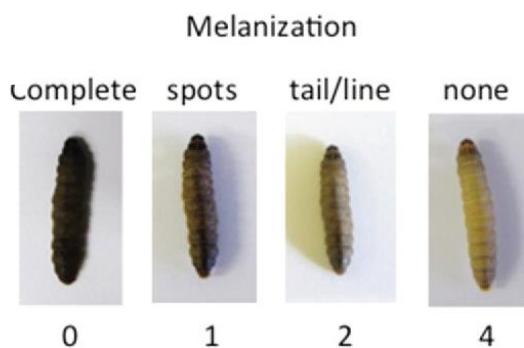


Figura 9. Grado de melanización de las larvas [142].

La pupa de *G. mellonella* tiene de 12 a 20 mm de longitud y 5 a 7 mm de diámetro [143]. Las extremidades de las pupas se encuentran pegadas al cuerpo. Al comienzo de la pupación, presentan un color blanco o amarillo, pero cambia progresivamente a marrón y a marrón oscuro con la edad y el desarrollo. Las pupas hembras por lo general son más largas que los machos. La pupa hembra posee una abertura para la *bursa copulatrix* en su octavo segmento abdominal, mientras que el macho carece de este, en cambio posee un pequeño par de botones externos redondeados en el lado ventral del noveno segmento abdominal que representan los falómeros [144].

La polilla adulta hembra tiene una longitud corporal entre 15-20 mm, con 31 mm de envergadura y un peso promedio de 169 mg. El macho es más pequeño y de color más oscuro en comparación con las hembras [143]. Se ha observado que las dietas larvales y la duración del desarrollo influyen en el cuerpo del adulto [140]. Los machos adultos tienen una vida más larga, aproximadamente 21 días, mientras que las hembras viven aproximadamente 12 días [145].

La duración del ciclo de vida (Figura 10) varía de semanas a meses en función de diversos factores bióticos y abióticos. Dentro de los factores bióticos cabe destacar los factores

intraespecíficos, que afectan a la duración del desarrollo y la supervivencia, como es el caso de la comida; y los factores interespecíficos, que incluyen parasitoides y abejas [140]. Un estudio realizado por Krams *et al.* demostró que la calidad de la dieta afecta al desarrollo de las larvas [146]. Los factores abióticos como la temperatura y la humedad son cruciales para el desarrollo de las larvas. Una temperatura entre los 29 y 33 °C ha demostrado ser óptima para el desarrollo. Aunque no se ha establecido un rango de humedad adecuado, algunas observaciones muestran que 45-55 % de humedad relativa es la apropiada para la supervivencia [147]. Para el apareamiento, las polillas macho adultas emiten una señal acústica para estimular a las hembras y liberan una feromona sexual que finalmente atrae al sexo opuesto [148]. La ovoposición comienza poco después del apareamiento y las hembras adultas depositan los huevos en grupos de 50 a 150 en pequeñas grietas dentro de la colmena [143]. Cuando los huevos eclosionan, las larvas se mueven por el panal de cera y comienzan a alimentarse [149]. A medida que las larvas se convierten en pupas, progresan a través de 8 etapas en las que producen hilos de seda en todas ellas, pero solo en la última desarrollan el capullo [150]. El desarrollo larval puede prolongarse hasta 12 semanas a temperatura ambiente (24 °C) [151]. Tras la fase larvaria forman prepupas y pupas, que duran entre 1 y 9 semanas hasta que aparecen las polillas adultas [143].



Figura 10. Ciclo biológico de *G. mellonella*.

10.2. *G. mellonella* como modelo animal en múltiples infecciones de interés clínico

Por motivos económicos y bioéticos, los modelos animales invertebrados como nematodos e insectos se están utilizando de forma creciente como una alternativa del uso de modelos tradicionales con mamíferos [152]. Los modelos invertebrados han sido utilizados con éxito como modelo de infección para muchos patógenos bacterianos y fúngicos [153], aunque en algunos casos presentan desventajas importantes con respecto a los modelos en mamíferos. Por ejemplo, el nematodo *Caenorhabditis elegans* no logra sobrevivir a 37 °C, temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los patógenos humanos y carece además de homólogos funcionales de los componentes del sistema inmune de humanos, por lo que resulta inviable utilizarlos para infecciones experimentales [154].

Insectos como las larvas de *Drosophila melanogaster* y *G. mellonella* ofrecen la ventaja de que pueden sobrevivir a 37 °C [153]. En este sentido, *G. mellonella* se está utilizando cada vez más como modelo de estudio de una serie de patógenos humanos, incluyendo bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* o *Enterococcus faecalis*, y varios hongos como *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus* o *Candida albicans* [155]. Los estudios realizados muestran que, independientemente del patógeno inoculado, los resultados obtenidos con las larvas de *G. mellonella* infectadas se correlacionan con los resultados de infecciones en mamíferos. Por ejemplo, las cepas bacterianas atenuadas en modelos de mamíferos demuestran también una menor virulencia en *G. mellonella* y de forma similar, las cepas que causan infecciones humanas graves resultan altamente virulentas en el modelo *G. mellonella* [156].

Numerosas investigaciones se han centrado en el sistema inmune de *G. mellonella*, lo que ha contribuido a una mayor caracterización y conocimiento de este modelo [152]. Los componentes del sistema inmunitario de *G. mellonella* incluyen principalmente: el cuerpo graso, los ganglios linfáticos y los hemocitos que se originan en el mesodermo. Como todos los insectos tienen un sistema circulatorio abierto denominado hemolinfa, que ocupa la cavidad general del cuerpo (hemocele) [157] y, de forma similar a los mamíferos, la

respuesta inmune innata de estos insectos consta de 2 componentes: la respuesta inmune celular y la respuesta humoral [142].

- La respuesta celular está mediada por células fagocíticas, denominadas hemocitos, situados dentro de la hemolinfa. Estas células no solo están involucradas en la fagocitosis, sino también en la encapsulación y la coagulación. Se han descrito hasta 6 clases de hemocitos en este insecto: prohemocitos, plasmatocitos, células granulares, coagulocitos, esferulocitos y enocitoides [142]. Durante una infección se produce la nodulación, en la que los patógenos son reconocidos y eliminados al atraparlos en agregados de hemocitos, mientras se da la melanización de los nódulos. El proceso de fagocitosis ocurre cuando las células granulares se unen al patógeno y desencadenan la unión de los plasmatocitos, que rodean al microorganismo y lo eliminan mediante la liberación de moléculas efectoras por parte de ambas células [158]. Una vez internalizado, se inducen varios mecanismos de muerte, como la producción de radical superóxido, que conduce a la destrucción del patógeno [157].
- La respuesta humoral está constituida por moléculas efectoras solubles que inmovilizan o matan al patógeno [142], entre las que destacan:
 - *Péptidos antimicrobianos (AMP)*. La respuesta humoral de los insectos se basa fundamentalmente en la síntesis de AMP [158]. Estas moléculas se producen en el cuerpo graso, los hemocitos, el tracto digestivo, las glándulas salivales y el tracto reproductivo, y posteriormente se liberan en la hemolinfa [142].
 - *Lisozimas*. La lisozima es una enzima antimicrobiana que daña las células bacterianas al hidrolizar los enlaces β -1,4 [159].
 - *Melanina*. La melanización se basa en la síntesis y deposición de melanina para encapsular los patógenos, seguida de coagulación y opsonización de hemolinfa [157]. La enzima fenoloxidasa (PO) puede oxidar sustancias fenólicas en quinonas que luego se convierten en la vía que conduce a la formación de melanina. La forma inactiva de PO es una proenzima llamada profenoloxidasa (PPO) la cual se encuentra en los hemocitos de *G. mellonella*. Los patógenos invasores en la hemolinfa de *G. mellonella* son reconocidos como cuerpos extraños por diversas proteínas y este reconocimiento es seguido por la activación de la cascada PPO.

Estas proteínas de reconocimiento tienen afinidad de unión a moléculas tales como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicano y β -1,3-glucano [158].

- *Opsoninas.* *G. mellonella* produce varias proteínas plasmáticas que sirven como opsoninas, que reconocen componentes de la pared celular de diferentes microorganismos, como bacterias y hongos. La apolipophorin-III (apoLp-III) es una molécula de reconocimiento de patrones que muestra una gran afinidad por ligandos hidrófobos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y el ácido lipoteicoico (LTA) [142]. La proteína de reconocimiento de peptidoglucano (PGRP) se une al peptidoglucano bacteriano de la pared celular causando hidrólisis de los patógenos [160]. La hemolina es una inmunoglobulina que se une a LPS y LTA y se asocia con hemocitos [142] cuya expresión en *G. mellonella*, la hemolina se incrementa tras la infección con bacterias y virus [161]. La opsonina GmCP8, identificada por Kim *et al.* en larvas de *G. mellonella* [162] se secreta en la hemolinfa y puede reconocer y unirse a la pared celular de diferentes patógenos y estimular la fagocitosis [163].

Aunque las larvas de *G. mellonella* no reproducen todos los aspectos de la infección de mamíferos, se están empleando de modo creciente para el estudio de la patogénesis y los factores de virulencia de numerosos patógenos bacterianos [164] y fúngicos [165] de interés clínico. El uso de un modelo invertebrado como *G. mellonella* cuenta con varias ventajas importantes que lo hacen interesante de cara a su uso en modelos de infección e investigación preclínica de fármacos [163]. Por un lado, no está sujeto a las limitaciones éticas de los modelos de mamíferos [155]. Por otro lado, los costos de cría de las larvas son muy bajos y existe disponibilidad comercial a nivel mundial [158]. Debido a su tamaño (aproximadamente 2 cm de largo y un peso de 250 mg) y su ciclo de vida, son fáciles de manejar y no se requiere la necesidad de personal con experiencia [153]. Pueden incubarse y sobrevivir en un rango muy amplio de temperaturas (incluyendo 37 °C, temperatura del cuerpo humano) a pesar de que su temperatura óptima de crecimiento es de 25 °C [157]. La infección experimental de las larvas permite estimar la virulencia del patógeno por varios procedimientos, incluidos el cálculo de dosis letal 50 (DL_{50}) [166], la medición de la supervivencia en el hemocele [167] y la cuantificación del grado de infección [168].

Sin embargo, el uso de este modelo también presenta algunos inconvenientes. En primer lugar, hasta el momento no existen centros que suministren cepas de referencia, generadas en condiciones estándar, que permitan garantizar una alta reproducibilidad de los experimentos entre diferentes grupos de investigación. Existen muy pocos distribuidores que crían larvas específicamente para la investigación, lo que aumenta el precio de compra. No existe una metodología estandarizada de manipulación, por lo que las condiciones experimentales pueden diferir entre los distintos grupos de investigación [142,163]. Por otro lado, aunque su genoma se ha secuenciado recientemente [169], no es posible aún hacer manipulaciones genéticas [157].

10.3. *G. mellonella* como modelo de infección por *H. pylori*

Las larvas de *G. mellonella* son susceptibles a la infección por *H. pylori* y pueden representar un modelo *in vivo* fácil de emplear para el estudio de factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad [153].

Las larvas de último estadio, aproximadamente de unas 5 semanas, son las recomendadas para estudios experimentales. Presentan una longitud de 20 a 25 mm, un peso entre 200-400 mg y tienen un color cremoso (Figura 11). Se pueden almacenar a 15 °C antes de su uso y 24 horas antes del experimento, se recomienda atemperarlas a la temperatura a la que se va a realizar dicho experimento y no administrarles comida [142]. La ruta de infección de *G. mellonella* más común es la vía intrahemocoélica, a través de la última pata izquierda mediante una jeringa Hamilton. Se ha descrito también infección oral, pero no se recomienda ya que es difícil determinar las dosis exactas de administración [170]. Se recomienda inocular a las larvas una dosis adecuada de 10 µl y utilizar grupos control en cada ensayo.



Figura 11. Aspecto de las larvas para los experimentos [142].

En los últimos años se han publicado numerosos estudios sobre la infección de *G. mellonella* por *H. pylori*. Así, Giannouli *et al.* en 2014 examinaron la efectividad de las larvas de la polilla de la cera *G. mellonella* como nuevo modelo para la infección por *H. pylori*. Para ello, inocularon las larvas de *G. mellonella* con suspensiones bacterianas de diferentes cepas de *H. pylori* de tipo salvaje o mutantes para algunos factores de virulencia como VacA, CagA, CagE, la isla de patogenicidad *cag* y ureasa. Se trazaron curvas de supervivencia y se contaron las bacterias viables en el hemocoel hasta las 96 h después de la infección. Se comprobó que las cepas de *H. pylori* salvajes y mutantes pudieron sobrevivir y replicarse en las larvas de *G. mellonella* [153].

En un artículo recientemente publicado en 2018 por Tharmalingam *et al.* se investigó si la niclosamida, un medicamento antihelmíntico, tenía actividad contra *H. pylori* tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando el modelo de *G. mellonella*. Se inocularon las larvas y se monitorearon supervivientes cada 24 horas. El tratamiento con niclosamida rescató significativamente las larvas de la infección por *H. pylori* con una tasa de supervivencia de hasta el 70 % en comparación con el grupo sin tratamiento [171].

Otro estudio utilizando el modelo de *G. mellonella* fue el de Di Lodovico *et al.* en 2019 donde evaluaron la eficacia antimicrobiana de *Pistacia vera* L. oleoresina (ORS) solo y combinado con levofloxacina contra cepas resistentes de *H. pylori*. Se utilizaron larvas de *G. mellonella* como modelo *in vivo* para confirmar los datos obtenidos *in vitro*. Los resultados mostraron que la levofloxacina redujo significativamente la replicación de *H. pylori* en larvas de *G. mellonella* con un alto porcentaje de larvas que sobrevivieron. Curiosamente, *P. vera* L. ORS solo o combinado con levofloxacina mostró un efecto protector significativo y estos datos sugirieron su uso potencial en la infección por *H. pylori* [172].

En el artículo recientemente publicado (2020) por Almeida Furquim de Camargo *et al.* Se utilizaron nanopartículas poliméricas para mejorar la actividad antibacteriana de complejos de plata (I) como una nueva estrategia para el control de infecciones por *H. pylori* usando *G. mellonella* como modelo *in vivo* para evaluar la citotoxicidad. Los resultados sugieren que el sistema desarrollado en este estudio es un agente terapéutico potencial contra *H. pylori*. Además, es la primera demostración de la actividad antibacteriana de un complejo de plata encerrado en nanopartículas poliméricas contra *H. pylori* [173].

10.4. *G. mellonella* para estudios de eficacia preclínica de nuevos antimicrobianos.

La investigación y desarrollo de nuevos fármacos, incluyendo los antibióticos, requiere en la actualidad la realización de cuidadosos y extensos ensayos que garanticen no solo su efectividad, sino también su seguridad. Los nuevos compuestos generalmente se seleccionan primero *in vitro* para evaluar su efectividad y toxicidad potencial. Sin embargo, los candidatos exitosos deben ser evaluados en modelos animales antes de su posible aplicación en humanos. Las pruebas *in vivo* son importantes para valorar dosis y esquemas, analizar la pérdida potencial de actividad debido a factores del huésped y garantizar la ausencia de daño o la ocurrencia de efectos colaterales indeseables graves una vez administrado el nuevo fármaco. Los mamíferos, en especial roedores, simulan con mayor éxito el sistema inmune y la fisiología humana, por lo que han sido comúnmente los modelos animales más empleados para estudios de eficacia y toxicidad *in vivo* [142].

Dado que los experimentos con mamíferos requieren mucho tiempo, son caros y a menudo se consideran éticamente objetables, comienzan a utilizarse nuevos modelos animales menos sensibles al dolor, más baratos y éticamente aceptables, los invertebrados. Entre los invertebrados, el modelo de *G. mellonella* no solo comienza a ser útil como modelo animal de infección para estudios de la patogenicidad de diferentes bacterias y hongos clínicamente relevantes, sino además como modelo exitoso para la evaluación de la efectividad de fármacos antimicrobianos *in vivo*. Este modelo se está empleando en la actualidad como un experimento de preselección para reducir el número de fármacos antimicrobianos que se someten a pruebas en modelos de mamíferos. Las larvas de *G. mellonella* se pueden inocular con dosis estandarizadas de bacterias, calcular la DL₅₀ y determinar efectivamente dosis letales y e infectivas no letales. De esta forma, los compuestos en estudio se pueden evaluar en función de su capacidad de proteger contra la muerte o contra el avance de la infección. La infección en la larva de *G. mellonella* se puede seguir mediante conteo de UFC en el hemocoel. Los agentes antimicrobianos se pueden administrar atendiendo a diferentes regímenes de tratamiento, incluida la dosis total administrada, el número de dosis y el programa de tratamiento [142]. En la mayoría de los casos se aplican dosis de tratamiento únicas que se administran entre los 30 minutos y las 2 horas después de la infección de las

larvas con el patógeno en estudio. En algunos estudios, el agente se administra seguidamente de la infección o antes de la infección [174].

Actualmente se han publicado numerosos estudios sobre la utilización de *G. mellonella* para estudios de eficacia preclínica de nuevos antimicrobianos. En un estudio llevado a cabo por Leshkasheli *et al.* en 2019, investigaron la eficacia de dos tipos de bacteriófagos frente a cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a todos los β-lactámicos evaluando su eficacia *in vivo* en el modelo *G. mellonella*. Los tratamientos basados en fagos mostraron una alta protección en las larvas con una supervivencia del 100 % a las 80 horas después de la infección lo que indica que *G. mellonella* es un modelo útil para evaluar los fagos como antimicrobianos antes de probar modelos de mamíferos más sofisticados [175].

Greber *et al.* en 2020 estudiaron la eficacia de dos lipopéptidos catiónicos antimicrobianos contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Para el estudio *in vivo* se utilizó el modelo de larvas de *G. mellonella* ya que este modelo ha demostrado ser útil para la evaluación de la eficacia de los agentes antiestafilocócicos y mostró una tasa de supervivencia del 90-50 % [176].

Varios estudios han utilizado combinaciones de antibióticos y han mostrado sinergia cuando se administran a larvas de *G. mellonella* infectadas. En 2014 Luther *et al.* evaluaron la actividad *in vivo* de daptomicina y linezolid solos y en combinación con gentamicina o rifampicina contra *Enterococcus faecalis* o *E. faecium* utilizando larvas de *G. mellonella*. El modelo demostró que la gentamicina y la daptomicina inyectadas 1 hora después de la infección con *E. faecalis* o *E. faecium* fueron significativamente más efectivas que cualquier antibiótico administrado solo en las mismas dosis [177]. Krezdorn *et al.* en 2014 realizaron un estudio donde *G. mellonella* se usó para evaluar la eficacia de múltiples combinaciones de antibióticos *in vivo* contra la infección por *Pseudomonas aeruginosa* y se comparó con el efecto inhibidor de las mismas combinaciones en un ensayo *in vitro*. Hubo poca correlación entre las combinaciones de antibióticos que mostraron sinergia en las pruebas *in vitro* y las que mostraron efectos mejorados en el modelo de *G. mellonella*. Esto enfatiza aún más el papel del modelo de *G. mellonella* como una herramienta útil para la detección a gran escala de la eficacia antibiótica en un modelo *in vivo* [178].

11. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

1. *H. pylori* es una bacteria helicoidal Gram-negativa que coloniza la mucosa gástrica constituyendo un factor de riesgo bien conocido para el desarrollo de enfermedades gástricas en el estómago humano. *H. pylori* se considera la infección crónica bacteriana de mayor prevalencia en humanos, por ello, en 2017 la OMS hizo un llamamiento a la comunidad científica para que centrase sus estudios en la búsqueda de nuevos antimicrobianos contra este patógeno.
2. *H. pylori* ha desarrollado numerosas estrategias de supervivencia y persistencia dentro de la mucosa gástrica, así como diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped existiendo una gran variedad de factores de virulencia que le permiten infectar, permanecer y dañar la mucosa gástrica.
3. Existen actualmente diferentes pautas de tratamiento. Las diversas cepas de *H. pylori* circulantes han desarrollado distintos mecanismos de defensa frente a numerosos antimicrobianos, por lo que es imprescindible seguir buscando nuevas dianas terapéuticas.
4. Se han realizado múltiples investigaciones para el estudio de infecciones por *H. pylori* utilizando diferentes modelos animales vertebrados ya que no hay un único modelo idóneo. La elección de un modelo animal vertebrado depende de los objetivos experimentales siendo complicado mantener el principio 3R por lo que se buscan modelos alternativos.
5. El modelo *G. mellonella* es un modelo *in vivo* utilizado para identificar factores de virulencia y mecanismos patogénicos de *H. pylori*. Aunque no puede reemplazar totalmente modelos experimentales en mamíferos, puede reducir su utilización. *G. mellonella* ha mostrado ser un modelo muy útil debido a sus bajos costos, corto ciclo de vida y a la facilidad de manejo en el laboratorio. Además, puede incubarse a una temperatura de 37 °C, temperatura óptima de crecimiento de la mayoría de los patógenos humanos.
6. El modelo de *G. mellonella* es un modelo exitoso para la evaluación de la efectividad de fármacos antimicrobianos *in vivo*. Una vez seleccionados los nuevos antimicrobianos *in vitro*, se debe evaluar *in vivo* la dosis, actividad y efectos colaterales. Dado que los experimentos con mamíferos requieren mucho tiempo, son

caros y a menudo se consideran éticamente objetables, este modelo se está empleando en la actualidad como un experimento de preselección para reducir el número de fármacos antimicrobianos que se someten a pruebas en modelos de mamíferos.

1. *H. pylori* is a Gram-negative helical bacterium that colonizes the gastric mucosa, constituting a well-known risk factor for the development of gastric diseases in the human stomach. *H. pylori* is considered the chronic bacterial infection with the highest prevalence in humans, therefore, in 2017, WHO called on the scientific community to focus on the search for new antimicrobials against this pathogen.
2. *H. pylori* has developed numerous survival and persistence strategies within the gastric mucosa, as well as various mechanisms to evade the host's immune response, with a wide variety of virulence factors that allow it to infect, remain and damage the gastric mucosa.
3. There are currently several treatment guidelines. The various circulating strains of *H. pylori* have developed different defense mechanisms against numerous antimicrobials, making it essential to continue searching for new therapeutic targets.
4. Multiple research has been conducted for the study of *H. pylori* infections using different vertebrate animal models as there is not a single suitable model that completely mimics infection in humans. The choice of a vertebrate animal model depends on the experimental objectives, since it's difficult to maintain the 3R principle, so alternative models are sought.
5. The *G. mellonella* model is an *in vivo* model used to identify virulence factors and pathogenic mechanisms of *H. pylori*. Although it cannot completely replace mammalian animal models, it can reduce their use. *G. mellonella* has been shown to be a very useful model due to its low costs, short life cycle and ease of handling in the laboratory. It can also be incubated at a temperature of 37 °C, which is the optimal growth temperature for most human pathogens.
6. The *G. mellonella* model is a successful model for evaluating the effectiveness of antimicrobial drugs *in vivo*. After the *in vitro* evaluation of the new antimicrobial drug, an *in vivo* study has to be conducted in order to elucidate the effective dosage,

activity and potential side effects of the drug. Since mammalian experiments are time-consuming, expensive and often considered ethically objectionable, this model is now being used as a screening experiment to reduce the number of antimicrobial drugs tested in mammalian models.

12. PERSPECTIVAS FUTURAS

El uso de modelos de animales en el laboratorio ha sido imprescindible para los avances científicos, especialmente biomédicos. El estudio de muchas enfermedades, las causas que las originan, el diagnóstico y tratamientos efectivos han sido posibles gracias a la experimentación con animales. Diversos modelos animales han sido utilizados en investigación, sobre todo los modelos de mamíferos, debido a la gran cantidad de semejanzas que presentan con los humanos. Pero la utilización de animales en investigación debe estar sujeta a una serie de reglas y leyes. Por ello, se han generado comités nacionales e internacionales que regulan la manipulación de organismos vivos, para establecer medidas adecuadas de manejo e intervención. La sociedad está cada vez más preocupada por el bienestar y la protección animal, por lo que con el tiempo se han tenido que mejorar los métodos de investigación para su utilización en investigación. Además, estos métodos deben cumplir la regla de las 3R: reducción, refinamiento y reemplazo, las cuales representan los principios fundamentales para seleccionar el modelo animal evitando el dolor y el estrés, y minimizar el número de animales de estudio siempre que se obtengan resultados estadísticamente significativos. Actualmente se están implementando numerosos métodos alternativos que sustituyen el uso de animales mamíferos en experimentación y poseen otras ventajas ya que son más rápidos, reproducibles y económicos, reduciendo los costes de implementación y mantenimiento. Una de las alternativas a la experimentación con animales superiores es el uso de animales invertebrados como *D. melanogaster*, *C. elegans* o *G. mellonella*. Es importante que se siga trabajando en la búsqueda de nuevos métodos para refining los experimentos con animales superiores hasta eliminarlos totalmente ya que no solo será un beneficio hacia los animales, sino que también una mejora en la manera de hacer ciencia.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984;1(8390):1311–1315.
2. Fox JG. The non-H pylori Helicobacters: their expanding role in gastrointestinal and systemic diseases. *Gut*. 2002;50(2):273–283.
3. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(3):449–490.
4. Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CM. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of cell death. *Infect Immun*. 1997;65(9):3672–3679.
5. O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect*. 2000;2(10):1207–1214.
6. Lertsethtakarn P, Ottemann KM, Hendrixson DR. Motility and chemotaxis in *Campylobacter* and *Helicobacter*. *Annu Rev Microbiol*. 2011;65:389–410.
7. Tannaes T, Bukholm IK, Bukholm G. High relative content of lysophospholipids of *Helicobacter pylori* mediates increased risk for ulcer disease. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(1):17–23.
8. Rendón Huerta EP, Chavarría Velázquez CO, Montaño Estrada LP. El lipopolisacárido de *Helicobacter pylori* como modulador de la expresión de claudinas en células epiteliales. Mensaje Bioquímico, Facultad de Medicina. 2016;Vol. XL 257-280.
9. Moran, A. P. Lipopolysaccharide in bacterial chronic infection: insights from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and lipid. A. *International Journal of Medical Microbiology*. 2016;297,307-319.
10. Appelmelk BJ, Negrini R, Moran AP, Kuipers EJ. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* and the host. *Trends Microbiol*. 1997;5(2):70-73.
11. Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*. 1999;284(5418):1328–1333.
12. Mendz GL, Shepley AJ, Hazell SL, Smith MA. Purine metabolism and the microaerophily of *Helicobacter pylori*. *Arch. Microbiol*. 1997;168:448-456
13. Merrell DS, Goodrich ML, Otto G, Tompkins LS, Falkow S. pH-regulated gene expression of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun*. 2003;71:3529-3539
14. Mobley HL, Garner RM, Bauerfeind P. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixA: synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. *Mol. Microbiol*. 1995;16:97-109
15. López-Brea M, Alarcón T, Baquero M, Domingo D, Royo G. Diagnóstico microbiológico de la infección por *Helicobacter pylori*. Procedimientos en Microbiología Clínica. 2004. SEIMC.

16. Taneera J, Moran AP, Hynes SO, Nilsson HO, Al-Soud WA, Wadström T. Influence of activated charcoal, porcine gastric mucin and beta-cyclodextrin on the morphology and growth of intestinal and gastric Helicobacter spp. *Microbiology*. 2002;148(Pt 3):677–684.
17. Mégraud F. Diagnosis of Helicobacter pylori. *Clin Gastroenterology*. 1995;9:507-18.
18. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of Helicobacter pylori. *Gastroenterology*. 2002;123(1):187–195.
19. Dent JC, McNulty CA. Evaluation of a new selective medium for Campylobacter pylori. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1988;7(4):555–558.
20. Cervantes-García E. Helicobacter pylori: mecanismos de patogenicidad. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y medicina de laboratorio*. 2016;63(2):100-109.
21. Dunne C, Dolan B, Clyne M. Factors that mediate colonization of the human stomach by Helicobacter pylori. *World J Gastroenterol*. 2014;20(19):5610-5624.
22. Iwańczak BM, Buchner AM, Iwańczak F. Clinical differences of Helicobacter pylori infection in children. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(7):1131–1136.
23. Pérez-Pérez G. Infección por Helicobacter pylori: mecanismos de contagio y prevención. *Gastroenterol. Latinoam.* 2018;29(1):13-20.
24. Malfertheiner P, Venerito M, Schulz C. Helicobacter pylori Infection: New Facts in Clinical Management. *Curr Treat Options Gastroenterol*. 2018;16(4):605-615.
25. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Helicobacter pylori infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann. Intern. Med.* 1994;120:977-981.
26. Moss S. F. The Clinical Evidence Linking Helicobacter pylori to Gastric Cancer. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. 2017;3(2),183-191.
27. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*; 2012;100(Pt B):1-441.
28. Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade. *Journal of digestive diseases*. 2012;13(1):2-9..x
29. Salar, A. Gastric MALT Lymphoma and Helicobacter Pylori. *Medicina Clínica*. 2019;152(2):65-71.
30. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. Helicobacter pylori associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*. 1991;338:1175–6.
31. Yokota S, Konno M, Mino E, Sato K, Takahashi M, Fujii N. Enhanced Fe ion-uptake activity in Helicobacter pylori strains isolated from patients with iron-deficiency anemia. *Clin Infect Dis*. 2008;46(4):e31-e33.
32. Urrego Díaz JA, Otero Regino W, Gómez Zuleta M. Helicobacter pylori and hematologic diseases. *Rev Col Gastroenterol*. 2013;28(4):329-337.

33. Dierkes J, Ebert M, Malfertheiner P, Luley C. Helicobacter pylori infection, vitamin B12 and homocysteine. A review. *Dig Dis.* 2003;21(3):237-244.
34. Frías Ordoñez JS, Otero Regino W. Aspectos prácticos en métodos diagnósticos para la infección por Helicobacter pylori: una revisión narrativa. *Revista de Gastroenterología.* 2017;37(3):246-253.
35. Uotani T, Graham DY. Diagnosis of Helicobacter pylori using the rapid urease test. *Annals of translational medicine.* 2015;3(1):9.
36. Lopes AI, Vale FF, Oleastro M. Helicobacter pylori infection - recent developments in diagnosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9299-9313.
37. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, et al. Management of Helicobacter pylori infection – The Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut.* 2012;61:646-664.
38. Kao CY, Sheu BS, Wu JJ. Helicobacter pylori infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomed J.* 2016;39(1):14-23.
39. Allen LA. Rate and extend of Helicobacter pylori phagocytosis. *Methods Mol Biol.* 2008;431:147-57.
40. Stingl K, Altendorf K, Bakker EP. Acid survival of Helicobacter pylori: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis?. *Trends Microbiol.* 2002;10(2):70–74.
41. Scott DR, Marcus EA, Wen Y, Singh S, Feng J, Sachs G. Cytoplasmic histidine kinase (HP0244)-regulated assembly of urease with Urel, a channel for urea and its metabolites, CO₂, NH₃, and NH₄(β), is necessary for acid survival of Helicobacter pylori. *J Bacteriol.* 2010;192:94e103.
42. Mégraud F, Neman-Simha V, Brügmann D. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by Helicobacter pylori urease on human epithelial cells. *Infect Immun.* 1992;60(5):1858–1863.
43. Boyanova L, Yordanov D, Gergova G, Markovska R, Mitov I. Benefits of Helicobacter pylori cagE genotyping in addition to cagA genotyping: a Bulgarian study. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011;100(4):529-535.
44. Torres Jiménez F, Torres Bayona C. Molecular pathophysiology in infection by Helicobacter pylori. Salud Uninorte. *Barranquilla.* 2016;32(3):500-512.
45. Arévalo A, Trespalacios AA, Otero W. Importancia de la proteína CagA en infección por Helicobacter pylori. *Revista Colombiana de Gastroenterología.* 2009;24(4):388-395.
46. Yuan XY, Yan JJ, Yang YC, Wu CM, Hu Y, Geng JL. Helicobacter pylori with East Asian-type cagPAI genes is more virulent than strains with Western-type in some cagPAI genes. *Braz J Microbiol.* 2017;48(2):218–224.
47. Lima VP, Rabenhorst SHB. Genes associados à virulência de Helicobacter pylori. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2009;55:389–389.

48. Douraghi M, Mohammadi M, Shirazi M, et al. Simultaneous detection of cagA and cagE of Helicobacter pylori strains recovered from Iranian patients with different gastroduodenal diseases. *Iran J Public Health*. 2009;38:98–98.
49. GholizadeTobnagh Sh, Bakhti SZ, Latifi Navid S, Zahri S, Sadat Bakhti F. Role of Plasticity Region Genes and cagE gene of cagPAI of Helicobacter pylori in Development of Gastrointestinal (GI) Diseases. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017;18(1):43-49.
50. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for Helicobacter pylori pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:92.
51. Peek RM, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ, Miller GG. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a Helicobacter pylori gene, iceA, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians*. 1998;110:531–544.
52. Shiota S., Suzuki R., Yamaoka Y. The significance of virulence factors in Helicobacter pylori. *Journal of Digestive Diseases*. 2013;14(7):341–349.
53. Abu-Taleb AMF, Abdelatif RS, Abdel-Hady AA, et al. Prevalence of Helicobacter pylori cagA and iceA Genes and Their Association with Gastrointestinal Diseases. *Int J Microbiol*. 2018;2018:4809093.
54. Shiota S, Matsunari O, Watada M, Hanada K, Yamaoka Y. Systematic review and meta-analysis: the relationship between the Helicobacter pylori dupA gene and clinical outcomes. *Gut Pathog*. 2010;2(1):13.
55. Hemmatinezhad B, Momtaz H, Rahimi E. VacA, cagA, iceA and oipA genotypes status and antimicrobial resistance properties of Helicobacter pylori isolated from various types of ready to eat foods. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016;15:2.
56. Braga LLBC, Batista MHR, de Azevedo OGR, et al. oipA "on" status of Helicobacter pylori is associated with gastric cancer in North-Eastern Brazil. *BMC Cancer*. 2019;19(1):48.
57. Wirth HP, Yang M, Sanabria-Valentín E, Berg DE, Dubois A, Blaser MJ. Host Lewis phenotype-dependent Helicobacter pylori Lewis antigen expression in rhesus monkeys. *FASEB J*. 2006;20(9):1534–1536-
58. Olfat F, Zheng Q, Oleastro M, et al. Correlation of the Helicobacter pylori adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005; 44: 151-156.
59. Rugge M, Genta RM, Di Mario F, et al. Gastric Cancer as Preventable Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017;15(12):1833-1843.
60. De Falco M, Lucariello A, Iaquito S, Esposito V, Guerra G, De Luca A. Molecular mechanisms of Helicobacter pylori patogénesis. *J Cell Physiol*. 2015;29:1702-7
61. Hooi JK, Lai WY, Ng WK, et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017;153(2):420–429.

62. Gisbert JP, Molina-Infante J, Amador J, et al. IV Spanish Consensus Conference on Helicobacter pylori infection treatment. *Gastroenterol Hepatol*. 2016;39(10):697–721.
63. Morilla Morilla A, Álvarez-Argüelles ME, Duque JM, Armesto E, et al. Primary antimicrobial resistance rates and prevalence of Helicobacter pylori infection in the north of Spain. A 13-year retrospective study. *Gastroenterol Hepatol*. 2019;42(8):476-485.
64. Flores-Treviño S, Mendoza-Olazarán S, Bocanegra-Ibarias P, Maldonado-Garza HJ, Garza-González E. Helicobacter pylori drug resistance: therapy changes and challenges. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;12(8):819-827.
65. Molina-Infante J, Corti R, Doweck J, McNicholl AG, Gisbert JP. Avances recientes en el tratamiento de la infección por Helicobacter pylori. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2017;47:75-85.
66. Yoon K, Kim N, Nam RH, Suh JH, et al. Ultimate eradication rate of Helicobacter pylori after first, second, or third-line therapy in Korea. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015;30:490-495.
67. Ince AT, Tozlu M, Baysal B, et al. Yields of dual therapy containing high-dose proton pump inhibitor in eradication of *H. pylori* positive dyspeptic patients. *Hepatogastroenterology* 2014;61:1454–8.
68. Molina-Infante J, Romano M, Fernandez-Bermejo M, et al. Optimized nonbismuth quadruple therapies cure most patients with Helicobacter pylori infection in populations with high rates of antibiotic resistance. *Gastroenterology*. 2013;145:121–128.e1.
69. Nishizawa T, Maekawa T, Watanabe N, et al. Clarithromycin versus metronidazole as first-line Helicobacter pylori eradication: a multicenter, prospective, randomized controlled study in Japan. *J Clin Gastroenterol*. 2015;49:468–71.
70. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA on behalf of the European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel, et al Management of Helicobacter pylori infection—the Maastricht V/Florence Consensus ReportGut. 2017;66:6-30.
71. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26:343–57.
72. Gisbert JP. Enfermedades relacionadas con la infección por Helicobacter pylori. *Gastroenterol Hepatol*. 2016;39(1):36-46.
73. McNicholl AG, Marín AC, Molina-Infante J, Castro M, Barrio J, Ducons J, et al. Randomised clinical trial comparing sequential and concomitant therapies for Helicobacter pylori eradication in routine clinical practice. *Gut*. 2014;63:244-9.
74. Molina-Infante J, Pérez-Gallardo B, Fernández-Bermejo M, Hernández-Alonso M, Vinagre G, Dueñas C, et al. Clinical trial: clarithromycin vs. Levofloxacin in first-line triple and sequential regimens for Helicobacter pylori eradication. *Aliment Pharmacol Ther*. 2010;31:1077-84.
75. Otero RW, Martín Gómez Z, Lina Otero P, Trespalacios A. Helicobacter pylori: ¿cómo se trata en el 2018?. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 2018;38(1),54-63.

76. Cosme A, Lizasoan J, Montes M, Tamayo E, Alonso H, Mendarte U, et al. Antimicrobial susceptibility-guided therapy versus empirical concomitant therapy for eradication of Helicobacter pylori in a region with high rate of clarithromycin resistance. *Helicobacter*. 2016;21:29-34.
77. Vakil N. H. pylori treatment: new wine in old bottles? *Am J Gastroenterol* 2009;104:26-30.
78. McNicholl A, Molina-Infante J, Bermejo F, et al. Non-bismuth quadruple concomitant therapies in the eradication of Helicobacter pylori: standard vs. optimized (14 days, high-dose PPI) regimens in clinical practice. *Helicobacter*. 2014;19:11.
79. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:25-64.
80. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*. 2015;40(4):277-283.
81. Suzuki S, Esaki M, Kusano C, Ikebara H, Gotoda T. Development of Helicobacter pylori treatment: How do we manage antimicrobial resistance?. *World J Gastroenterol*. 2019;25(16):1907-1912.
82. Savoldi A, Carrara E, Graham D, Conti Y, et al. Prevalence of Antibiotic Resistance in Helicobacter pylori: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology*. 2018;155(5),1372-1382.e17.
83. Macías-García F, Llovo-Taboada J, Díaz-López M, Bastón-Rey I, Domínguez-Muñoz JE. High primary antibiotic resistance of Helicobacter Pylori strains isolated from dyspeptic patients: A prevalence cross-sectional study in Spain. *Helicobacter*. 2017;22(6):10.1111/hel.12440.
84. Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al. Helicobacter pylori resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2013;62(1):34-42.
85. Cuadrado-Lavín A, Salcines-Caviedes JR, Carrascosa MF, et al. Antimicrobial susceptibility of Helicobacter pylori to six antibiotics currently used in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:170-173.
86. Agudo S, Pérez-Pérez G, Alarcón T, López-Brea M. High prevalence of clarithromycin-resistant Helicobacter pylori strains and risk factors associated with resistance in Madrid, Spain. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3703-3707.
87. Navarro-Jarabo JM, Fernández-Sánchez F, Fernández-Moreno N, et al. Prevalence of primary resistance of Helicobacter pylori to Clarithromycin and levofloxacin in Southern Spain. *Digestion*. 2015;92:78-82.
88. Alarcón T, Urruzuno P, Martínez MJ, et al. Antimicrobial susceptibility of 6 antimicrobial agents in Helicobacter pylori clinical isolates by using EUCAST breakpoints compared with previously used breakpoints. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(5):278-282.
89. Hao H, Yuan Z, Shen Z, Han J, et al. Mutational and transcriptomic changes involved in the development of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57:1369-1378.

90. Hwang TJ, Kim N, Kim HB, Lee BH, et al. Change in antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains and the effect of A2143G point mutation of 23S rRNA on the eradication of *H. pylori* in a single center of Korea. *J Clin Gastroenterol.* 2010;44:536-543.
91. Mégraud F. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 2004;53:1374-1384.
92. Paulsen IT. Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6:446-451.
93. Smith MA, Edwards DI. Redox potential and oxygen concentration as factors in the susceptibility of *Helicobacter pylori* to nitroheterocyclic drugs. *J Antimicrob Chemother.* 1995;35:751-764
94. Seo JH, Jun JS, Yeom JS, Park JS, et al. Changing pattern of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in children during 20 years in Jinju, South Korea. *Pediatr Int.* 2013;55:332-336.
95. Van Amsterdam K, Bart A, Van der Ende A. A *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:1477-1482.
96. Nelson JM, Chiller TM, Powers JH, Angulo FJ. Especies de campylobacter resistentes a las fluoroquinolonas y la retirada de las fluoroquinolonas del uso en aves de corral: una historia de éxito de salud pública. *Clin Infect Dis.* 2007;44:977-980.
97. Drlica K, Zhao X. ADN girasa, topoisomerasa IV y las 4-quinolonas. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997;61:377-392
98. Glocker E, Kist M. Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:2241-2246.
99. Kuo YT, Liou JM, El-Omar EM, et al. Primary antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* in the Asia-Pacific region: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2017;2(10):707-715.
100. Contreras M, Benejat L, Mujica H, et al. Real-time PCR detection of a 16S rRNA single mutation of *Helicobacter pylori* isolates associated with reduced susceptibility and resistance to tetracycline in the gastroesophageal mucosa of individual hosts. *J Med Microbiol.* 2019;68(9):1287-1291.
101. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL. Discovery, research, and development of new anti-biotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:318-27
102. González A, Fillat MF, Lanas Á. Transcriptional regulators: valuable targets for novel antibacterial strategies. *Future Med Chem.* 2018;10(5):541-560.
103. Salillas S, Sancho J. Flavodoxins as Novel Therapeutic Targets against *Helicobacter pylori* and Other Gastric Pathogens. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5):1881.
104. González A , Casado J, Chueca E, Salillas S, et al. Small Molecule Inhibitors of the Response Regulator ArsR Exhibit Bactericidal Activity against *Helicobacter pylori*. *Microorganisms.* 2020; 8:503.

105. González, A., Salillas, S., Velázquez-Campoy, A. et al. Identifying potential novel drugs against *Helicobacter pylori* by targeting the essential response regulator HsrA. *Sci Rep.* 2019;9, 11294.
106. González A, Casado J, Chueca E, et al. Repurposing Dihydropyridines for Treatment of *Helicobacter pylori* Infection. *Pharmaceutics.* 2019;11(12):681.
107. Morales Briceño A, Méndez Sánchez A, Morales Briceño, M. Animal models for the study of infection of the genus *Helicobacter*. *AVFT.* 2014;33(3):76-78.
108. Palacios-Espinosa F, Escobedo-Hinojosa W, Romero I. Current outlook of the study of plants with anti-*Helicobacter pylori* activity. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas.* 2011;14(1):51-61.
109. Burkitt MD, Duckworth CA, Williams JM, Pritchard DM. *Helicobacter pylori* induced gastric pathology: insights from in vivo and ex vivo models. *Dis Model Mech.* 2017;10(2):89-104.
110. Bücker ., Azevedo-Vethacke M, Groll C, Garten D, Josenhans C, et al. *Helicobacter pylori* colonization critically depends on postprandial gastric conditions. *Sci. Rep.* 2012;2:994.
111. Barros R, da Costa LT, Pinto-de-Sousa J, Duluc I, Freund JN, David L, Almeida R. CDX2 autoregulation in human intestinal metaplasia of the stomach: impact on the stability of the phenotype. *Gut.* 2011;60:290-298.
112. Mishra KK, Srivastava S, Aayyagari A, Ghosh K. Development of an animal model of *Helicobacter pylori* (Indian strain) infection. *Indian J Gastroenterol.* 2019;38(2):167-172.
113. Haesebrouck F, Pasmans F, Flahou B, et al. Gastric helicobacters in domestic animals and nonhuman primates and their significance for human health. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):202-223.
114. O'Rourke JL, Lee A. Animal models of *Helicobacter pylori* infection and disease. *Microbes Infect.* 2003;5(8):741-748.
115. Morales A, Méndez-Sánchez A, Morales M. M. Animal models for the study of infection of the genus *Helicobacter*. *AVFT.* 2014;33(3):93-95.
116. D'Costa, K., Chonwerawong, M., Tran, L. S., Ferrero, R. L. Mouse models of *Helicobacter* infection and gastric pathologies. *J. Vis. Exp.* 2018;(140):e56985.
117. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology.* 1997;112(4):1386-1397.
118. Philpott DJ, Belaid D, Troubadour P, et al. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted *Helicobacter pylori* isolates. *Cell Microbiol.* 2002;4(5):285-296.
119. Haley KP, Blanz EJ, Gaddy JA. High Resolution Electron Microscopy of the *Helicobacter pylori* Cag Type IV Secretion System Pili Produced in Varying Conditions of Iron Availability. *J. Vis. Exp.* 2014;93:e52122.

120. Arnold IC, Lee JY, Amieva MR, Roers A, Flavell RA, Sparwasser T, et al. Tolerance rather than immunity protects from Helicobacter pylori induced gastric preneoplasia. *Gastroenterology*. 2011;140:199–209.
121. Dyer V, Brüggemann H, Sörensen M, et al. Genomic features of the Helicobacter pylori strain PMSS1 and its virulence attributes as deduced from its in vivo colonisation patterns. *Mol Microbiol*. 2018;110(5):761-776.
122. Díez Prieto en: Pérez García C.C., Díez Prieto M.I., García Partida P. Introducción a la Experimentación y Protección animal. Universidad de León, León. 1999;35:42-44.
123. Philpott DJ, Belaid D, Troubadour P, et al. Reduced activation of inflammatory responses in host cells by mouse-adapted Helicobacter pylori isolates. *Cell Microbiol*. 2002;4(5):285-296.
124. Rieder G, Merchant JL, Haas R. Helicobacter pylori cag-type IV secretion system facilitates corpus colonization to induce precancerous conditions in Mongolian gerbils. *Gastroenterology*. 2005;128(5):1229-1242.
125. Hirayama F, Takagi S, Kusuhara H, Iwao E, Yokoyama T, Ikeda Y. Induction of gastric ulcer and intestinal metaplasia in Mongolian gerbils infected with Helicobacter pylori. *J. Gastroenterol*. 1996;31:755-757.
126. Keto Y, Ebata M, Okabe S. Gastric mucosal changes induced by long term infection with Helicobacter pylori in Mongolian gerbils: effects of bacteria eradication. *J Physiol Paris*. 2001;95:429–36.
127. Lv X, Yang J, Song H, et al. Therapeutic efficacy of the multi-epitope vaccine CTB-UE against Helicobacter pylori infection in a Mongolian gerbil model and its microRNA-155-associated immuno-protective mechanism. *Vaccine*. 2014;32(41):5343-5352.
128. Guo L, Yang H, Tang F, et al. Oral Immunization with a Multivalent Epitope-Based Vaccine, Based on NAP, Urease, HSP60, and HpaA, Provides Therapeutic Effect on *H. pylori* Infection in Mongolian gerbils. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:349.
129. Dubois A. Animal Models of Helicobacter Infection. *Laboratory Animals Science*. 1998;48(6):596-603.
130. Krakowka S, Ellis J. Reproduction of severe Gastroesophageal Ulcers (GEU) in Gnotobiotic Swine Infected with Porcine Helicobacter pylori-like Bacteria. *Vet Pathol*. 2006;43:956-962.
131. Aske KC, Waugh CA. Expanding the 3R principles: More rigour and transparency in research using animals. *EMBO Rep*. 2017;18(9):1490-1492.
132. Sewell F, Doe J, Gellatly N, Ragan I, Burden N. Steps towards the international regulatory acceptance of non-animal methodology in safety assessment. *Reg Tox Pharm*. 2017;89:50-6
133. National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research (NC3Rs). The 3Rs. <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs#Impacts>. Accesado 22 mayo 2020.

134. Arck PC. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. *Journal of Reproductive Immunology*. 2019;132:54–59.
135. Törnqvist E, Annas A, Granath B, Jalkesten E, Cotgreave I, Öberg M. Strategic focus on 3R principles reveals major reductions in the use of animals in pharmaceutical toxicity testing. *PLoS One*. 2014;9(7):e101638.
136. De Angelis I, Ricceri L, Vitale A. The 3R principle: 60 years taken well. *Ann Ist Super Sanità*. 2019;55(4):398-399.
137. Vasbinder MA, Locke P. Introduction: Global Laws, Regulations, and Standards for Animals in Research. *ILAR Journal*. 2016;57(3):261–265.
138. Scoble M. Classification of the Lepidoptera Oxford University Press, 1995
139. Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci*. 2017;24(3):342-357.
140. Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*. 2017;8(2):61.
141. Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*. 2018;9(1):383-389.
142. Tsai CJ, Loh JM, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016;7(3):214-229.
143. Ellis J.D., Graham J.R., Mortensen A. Standard methods for wax moth research. *J. Apic. Res.* 2013;52:1-17.
144. Smith T. External morphology of the larva, pupa, and adult of the wax moth, *Galleria mellonella* L. *J. Kans. Entomol. Soc.* 1965;38:287-310.
145. Warren L., Huddleston P. Life history of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L., in arkansas. *J. Kans. Entomol. Soc.* 1962;35:212-216.
146. Krams I., Kecko S., Kangassalo K., Moore F.R., Jankevics E., Inashkina I., Krama T., Lietuvietis V., Meija L., Rantala M.J. Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci*. 2015;22:431-439.
147. Rodríguez Vega LC. Ciclo Biológico De *Galleria Mellonella Linnaeus* (Lepidoptera: Pyralidae). 2015
148. Spangler H.G. Sound and the moths that infest beehives. *Fla. Entomol.* 1988;71:467-477.
149. Williams J.L. Insects:Lepidoptera (moths) In: Morse R., Flottum K., editors. Honey Bee Pests, Predators, and Diseases. Al Root Company; Medina, OH, USA: 1997;121-141.
150. Yang, S.; Zhang, X.; Song, W.; Miao, C.; Zhao, H.; Jiang, Y. Review of the biological and control methods on *Galleria mellonella*. *L. Apicultr.* 2017;67:33-37.

151. Li Y, Jiang X, Wang Z, Zhang J, Klett K, Mehmood S, Qu Y, Tan K. Losing the Arms Race: Greater Wax Moths Sense but Ignore Bee Alarm Pheromones. *Insects*. 2019;10(3):81.
152. Harding, CR, Schroeder, GN, Collins, JW, Frankel, G. Uso de Galleria mellonella como organismo modelo para estudiar la infección por Legionella pneumophila . *J. Vis. Exp.* 2013;81:e50964.
153. Giannouli M, Palatucci AT, Rubino V, et al. Use of larvae of the wax moth Galleria mellonella as an in vivo model to study the virulence of Helicobacter pylori. *BMC Microbiol.* 2014;14:228.
154. Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM. Exploiting amoeboid and nonvertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog.* 2007;3:e101.
155. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect Galleria mellonella as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp.* 2012;(70):e4392.
156. Gao W, et al. Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000944.
157. Revijano-Contador N, Zaragoza O. Immune Response of Galleria mellonella against Human Fungal Pathogens. *J. Fungi*. 2019;5:3.
158. Pereira TC, de Barros PP, Fugisaki LRO, et al. Recent Advances in the Use of Galleria mellonella Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(4):128.
159. Sowa-Jasilek A, Zdybicka-Barabas A, Staczek S, Wydrych J, Mak P, Jakubowicz T, Cytrynska M. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: Galleria mellonella anionic peptide 2 and lysozyme. *Peptides*. 2014; 53:194-201.
160. Dziarski R, Gupta D. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 2006;7:232.
161. Shaik HA, Sehnal F. Hemolin expression in the silk glands of Galleria mellonella in response to bacterial challenge and prior to cell disintegration. *J Insect Physiol.* 2009; 55:781-7.
162. Kim CH, Shin YP, Noh MY, et al. An insect multiligand recognition protein functions as an opsonin for the phagocytosis of microorganisms. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25243-25250.
163. Cutuli MA, Petronio Petronio G, Vergalito F, et al. Galleria mellonella as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*. 2019;10(1):527-541.
164. Tsai CJ, Loh JMS, Proft T. The Use of Galleria mellonella (Wax Moth) as an Infection Model for Group A Streptococcus. *Methods Mol Biol.* 2020;2136:279-286.
165. Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O. The non-mammalian host Galleria mellonella can be used to study the virulence of the fungal pathogen Candida tropicalis and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Medical Mycology*. 2013;51(5):461-472.
166. Finney DJ. Probit analysis. Cambridge University Press; 1971.

167. Guillemet E, et al. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *J. Bacteriol.* 2010;192:286–294.
168. Nielsen-LeRoux C, Gaudriault S, Ramarao N, Lereclus D, Givaudan A. How the insect pathogen bacteria *Bacillus thuringiensis* and *Xenorhabdus/Photorhabdus* occupy their hosts. *Curr. Opin. Microbiol.* 2012;15:1–12.
169. Lange A, Beier S, Huson DH, Parusel R, Iglaue F, Frick JS. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). *Genome Announc.* 2018;6(2):e01220-17.
170. Fedhila S, Buisson C, Dussurget O, Serror P, Glomski IJ, Liehl P, Lereclus D, Nielsen-LeRoux C. Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol.* 2010;103:24–9.
171. Tharmalingam N, Port J, Castillo D, et al. Repurposing the anthelmintic drug niclosamide to combat *Helicobacter pylori*. *Sci Rep.* 2018;8:3701.
172. Di Lodovico S, Napoli E, Di Campli E, et al. Pistacia vera L. oleoresin and levofloxacin is a synergistic combination against resistant *Helicobacter pylori* strains. *Sci Rep.* 2019;9:4646.
173. Almeida Furquim de Camargo B, Soares Silva DE, Noronha da Silva A, et al. A new silver (I) coordination compound loaded into polymeric nanoparticles as a strategy to improve in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity [published online ahead of print, 2020 Jun 9]. *Mol Pharm.* 2020;10:1021.
174. Thomas RJ, Hamblin KA, Armstrong SJ, Muller CM, Bokori-Brown M, Goldman S, Atkins HS, Titball RW. *Galleria mellonella* as a model system to test the pharmacokinetics and efficacy of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41:330–6.
175. Leshkasheli L, Kutatelandze M, Balarjishvili N, et al. Efficacy of newly isolated and highly potent bacteriophages in a mouse model of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;19:255–261.
176. Greber KE, Roch M, Rosato MA, Martinez MP, Rosato AE. Efficacy of newly generated short antimicrobial cationic lipopeptides against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Int J Antimicrob Agents.* 2020;55(3):105827.
177. Luther MK, Arvanitis M, Mylonakis E, LaPlante KL. Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an in vitro pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an in vivo survival assay using *Galleria mellonella* larvae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4612–4620.
178. Krezdorn J, Adams S, Coote PJ. A *Galleria mellonella* infection model reveals double and triple antibiotic combination therapies with enhanced efficacy versus a multidrug-resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 7):945–955.