



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Carrera Biología

**EGRESO Y AISLAMIENTO DE *HELICOBACTER*
PYLORI DESDE LA VACUOLA DE *CANDIDA*
ALBICANS TRAS LA EXPOSICIÓN A
ANTIFÚNGICOS**

**Seminario de Título presentado a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al título de Bióloga**

POR FRANCISCA JAVIERA GACITÚA FUENTES

Profesor Guía Apolinaria del Rosario García Cancino

Abril 2023

Concepción, Chile

© 2023, Francisca Javiera Gacitúa Fuentes

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento



Este Seminario de Título ha sido desarrollado en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesora guía

Dra. Apolinaria García Cancino

Universidad de Concepción

Concepción

Co-evaluador

**Dr. Víctor Campos
Araneda**

Universidad de Concepción

Co-evaluadora

Dra. Kimberly Sánchez Alonzo

Universidad de Concepción

Universidad San Sebastián

Concepción

Coordinador seminario de título

Dr. Víctor Hernández Santander

Universidad de Concepción

Concepción

I. DEDICATORIA

A todas las personas que padecen infección crónica por *Helicobacter pylori*, este trabajo es para todos ellos, el deseo más profundo es mejorar la calidad de vida, mediante la ciencia.

II. AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser un pilar fundamental en mi día a día, que contribuyeron a la nutrida riqueza de conocimiento y experiencias durante los cinco años de carrera que llevarán a convertirme en la profesional que tanto he anhelado. A mi Profesora Pola, que desde que la conocí, se abrió una luz en mi camino, y desde ese momento supe que estaba en el lugar correcto, muchas gracias por creer en mí, por darme siempre lo mejor en cada encuentro, por sobre todo la sabiduría científica y humana, y dejar en mí, una referencia increíble a llegar hacer como futura profesional. Gracias por su paciencia y por la libertad entregada en cada ensayo realizado en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana. A todo el equipo del laboratorio, que fue clave para llevar a cabo mi trabajo práctico y teórico. A mi pareja un compañero excepcional que aclaró tormentos y decoró con grandes ilusiones el viaje a lo increíble, a todo el personal de la facultad por brindarme completo apoyo en los que haceres

presenciales, al profe Víctor que siempre estuvo ahí, creando espacios de reflexión e intercambio de ideas. Su sabiduría mejoró el proceso del hacer, al igual que los espacios de trabajo compartidos para realizar ciencia, y por último y no menos importante a Michelle, por todo su tiempo entregado a mi aprendizaje que fue el mejor para que me desarrollara en el laboratorio, me dio las herramientas claves para que me desarrollara de forma independiente con autocrítica y constante reflexión por todo lo nuevo que fui adquiriendo en mi aprendizaje y a la vez ayudar a mis compañeros en el laboratorio. Aprendí de la mejor, que orgullo.

III. RESUMEN

H. pylori es una bacteria patógena que infecta el epitelio gástrico de humanos. Posee una alta prevalencia en la población. Desencadena lesiones gástricas de distinta gravedad, desde gastritis superficial hasta cáncer gástrico. Presentando resistencia a diversos antibióticos, siendo clave para la eficacia de su tratamiento la claritromicina. Debido a esto, la OMS la incluyó en la categoría de prioridad 2 (elevada), en la lista de bacterias para las que necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Es una bacteria de cultivo complejo y que se aísla desde el ser humano, la cual no se ha logrado recuperar o cultivar desde el medio ambiente. Las vías de transmisión no están del todo claras, lo que genera incertidumbre considerando su alta prevalencia en la población mundial, desde un 50%. Esto hace pensar que *H. pylori* pueda ocupar otro microorganismo como refugio transitorio para resistir el estrés ambiental. Se propone al género *Candida*, en particular a *Candida albicans*, levadura comensal que comparte varios nichos de colonización en el cuerpo humano junto a *H. pylori*. La vacuola de *C. albicans* ofrecería un sitio de refugio y nutrientes para *H. pylori* cuando ésta se encuentre bajo condiciones desfavorables. En este estudio expusimos

cultivos de levaduras *C. albicans* con *H. pylori* al interior de su vacuola a distintos antifúngicos como fluconazol, clotrimazol y ketoconazol en concentraciones subletales de 0,5ug/ml y 1µg/ml para inducir el egreso de *H. pylori* debido al estrés generado. Luego se filtró a los microorganismos, se aisló *H. pylori* y cultivó en placas con agar columbia. Este fenómeno se analizó mediante microscopia óptica y de epifluorescencia, (FISH, PCR), por tinción de Gram y test de ureasa. La exposición por clotrimazol al 1µg/ml fue el mejor candidato para el egreso de *H. pylori* y la exposición por fluconazol al 1µg/ml mantuvo en mayor cantidad la interacción *C. albicans-H. pylori*. Con esto se buscó evidenciar el rol que presenta *C. albicans* como vehículo de propagación y recolonización de *H. pylori*, al demostrar el cultivo de *H. pylori* tras su egreso de la vacuola de *C. albicans*. Además, aportar información para contribuir a terapias efectivas en la erradicación de esta bacteria patógena de interés mundial.

Palabras claves: Interacción Bacteria-levadura, concentración subletal antifúngica, egreso bacteria intracelular

Abstract

H. pylori is a pathogenic bacterium that infects the gastric epithelium of humans. It has a high prevalence in the population. It triggers gastric lesions of varying severity, from superficial gastritis to gastric cancer. It presents resistance to several antibiotics, being clarithromycin the key to its treatment efficacy. Because of this, the WHO included it in priority category 2 (high), in the list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. It is a bacterium of complex culture and is isolated from humans, which has not been recovered or cultured from the environment. The routes of transmission are not entirely clear, which generates uncertainty considering its high prevalence of 50% in the world population. This suggests that *H. pylori* may occupy another microorganism as a transient refuge to resist environmental stress. The genus *Candida* is proposed, in particular *Candida albicans*, a commensal yeast that shares several colonization niches in the human body together with *H. pylori*. The vacuole of *C. albicans* would provide a site of refuge and nutrients for *H. pylori* when it is under unfavorable conditions. In this study, we exposed yeast cultures with *H. pylori* in their vacuole to different antifungals such as fluconazole, clotrimazole and ketoconazole at sub-lethal concentrations of 0.5ug/ml, which causes stimulation of *H. pylori*

egress by stressing the yeast cells. The microorganisms are then filtered to isolate *H. pylori* and cultured. This phenomenon is analyzed by optical and epifluorescence microscopy, molecular FISH, PCR, Gram staining and urease test. The aim is to demonstrate the role of *C. albicans* as a vehicle for the propagation and recolonization of *H. pylori*, as well as to provide information to contribute to effective therapies for the eradication of this pathogenic bacterium of worldwide interest.

Tabla de Contenido	
<i>I. DEDICATORIA</i> _____	4
<i>II. AGRADECIMIENTOS</i> _____	4
<i>III. RESUMEN</i> _____	6
Abstract _____	8
<i>Índice de Figuras</i> _____	14
<i>Índice de tablas</i> _____	17
<i>Capítulo 1. Introducción</i> _____	18
1.1 Helicobacter pylori _____	19
1.2 Biología _____	19
1.2 Morfología y estructura _____	21
1.3 Condiciones de cultivo _____	23
1.4 Historia _____	23
1.5 Filogeografía _____	26
1.6 Ecología _____	29
1.7 Patogenicidad _____	31
1.7.1 Factores de virulencia _____	33
1.8 Epidemiología _____	34
1.8.1 Detección _____	35

1.8.2 Transmisión	36
1. 2 <i>Candida albicans</i>	36
1.3 Interacción bacteria levadura	38
1.4 <i>Candida albicans</i> y <i>Helicobacter pylori</i>	39
1.5 Acción antifúngica	41
1.6 Hipótesis de Trabajo	42
1.6.1 Objetivo general	44
1.6.2 Objetivos específicos	44
Capítulo 2. Materiales y Métodos	45
2.1 Cepas de estudio	45
2.1.2 Cultivo de microorganismos	45
2.1.3 Condiciones de Cocultivo entre <i>H. pylori</i> y <i>C. albicans</i>	46
2.2 Detección de la entrada de <i>H. pylori</i> J99 a <i>C. albicans</i> 10231 por inmunofluorescencia (FISH)	47
2.3 Extracción de ADN de cultivos puros de <i>C. albicans</i> 1023, <i>H. pylori</i> J99 y de cocultivo entre 10231 y J99.	49
2.3.1 Amplificación del ADN de cultivos puros de <i>C. albicans</i> 1023, <i>H. pylori</i> J99 y de cocultivo entre 10231 y J99	50

2.4 Determinación de la viabilidad de las bacterias intracelulares	51
2.5 Preparación de antifúngicos	51
2.5.1 Determinación de los perfiles de susceptibilidad a antifúngicos mediante el método de microdilución en caldo	53
2.5.2 Incubación en presencia de compuestos antifúngicos	54
2.6 Detección mediante microscopía óptica y cultivo de células de <i>H. pylori</i> J99 liberadas	55
2.7 Filtración y aislamiento de colonias de <i>H. pylori</i> a partir de <i>C. albicans</i> 10231ATCC expuestas a estrés por antifúngicos.	55
Capítulo 3. Resultados	57
Cultivo de microorganismos	57
Resultados Moleculares	58
Evaluación de la viabilidad	60
Ensayo a Cocultivo <i>C. albicans-H. pylori</i> tras exposición por antifúngicos	62
Capítulo 4. Discusión	69
Conclusión	81
Referencias	82
Anexo 1: Preparación de antifúngicos solubles en agua (fluconazol)	95

<i>Anexo 2: preparación de antifúngicos insolubles en agua (ketoconazol, clotrimazol</i>	<u>96</u>
<i>Anexo 3: Preparación del inóculo de levaduras</i>	<u>97</u>
<i>Anexo 5: Egreso de H. pylori desde C. albicans tras exposición por Clotrimazol</i>	<u>98</u>
<i>Anexo 6: Desplazamiento de H. pylori en cocultivo con C. albicans expuestas a clotrimazol</i>	<u>98</u>
<i>Anexo 7: H. pylori- C. albicans</i>	<u>99</u>

Índice de Figuras

UdeC logo	1
Logo Facultad de Ciencias biológicas, Universidad de Concepción	2
Figura 1. Tres tipos de espiroquetas (fig. 1-3) (Kasai y Kobayashi, 1919).	16
Figura 2. Fotografía mediante microscopia electrónica de <i>H. pylori</i> (Montes Valles, M. 2016)	19
Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión. <i>Helicobacter pylori</i> aislado a partir de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico, mostrando una bacteria curva, con extremos romos y en uno de los cuales se observan tres flagelos fuente: Rivas-Traverso, F., & Hernández, F. (2000)	19
Figura 4: Momias precolombinas mexicanas. Recuadro amarillo muestra la momia que dio positivo a <i>Helicobacter pylori</i> (Castillo Rojas G, 2008).	22
Figura 5. Migración humana moderna fuera de África (H. Suzuki <i>et al.</i> 2016)	23
Figura 6. Siete tipos de población basados en asociaciones geográficas. Los círculos de color ilustran la distribución putativa de <i>H. pylori</i> antes de "la era de la exploración". Seis ascendencias derivadas a siete poblaciones: hpEuropa, hpAsia oriental, hpÁfrica1, hpÁfrica2, hpAsia2, hpNEAfrica y hpSahul (H. Suzuki <i>et al.</i> , 2016).	26
Fotografía 1. <i>Candida albicans</i> vista a 100X con aceite de inmersión a las 48h y 72h de incubación en aerobiosis en medio Sabouraud (elaboración propia)	34
Fotografía 2. Crecimiento de la cepa <i>H. pylori</i> J99 conservada a -80°C tras 120h de incubación en condiciones de microaerobiosis, medio agar columbia suplementado con suero fetal bovino al 7%	54
Fotografía 3. Resiembra de la cepa <i>H. pylori</i> J99 proveniente de -80°C luego de 72 h de incubación en condiciones de microaerobiosis, medio agar columbia suplementado con suero fetal bovino al 7%	54
Fotografía 4. Cultivo de <i>C. albicans</i> tras 48h en medio de cultivo cromogénico CHROMagar TM Candida.....	54

Fotografía 5. Cultivo puro de <i>C. albicans</i> tras 48h en medio de cultivo agar Sabouraud.....	54
Fotografía 6. Cultivo mixto de <i>C. albicans</i> y <i>H. pylori</i> tras 48h en medio de cultivo cromogénico CHROMagar™Candida.....	54
Fotografía 7. Cultivo mixto de <i>C. albicans</i> y <i>H. pylori</i> tras 48h en medio de cultivo agar Sabouraud.....	54
Fotografía 8. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales anti- <i>H. pylori</i> IgG marcados con isotiocinato de fluoresceína (FITC). (A) <i>C. albicans</i> 10231 con cuerpos similares a bacterias en su vacuola (control negativo) observado por filtro TRITC (B) ausencia de fluorescencia en el control negativo observado con filtro DAPI (C) presencia de fluorescencia emitida por <i>H. pylori</i> j99 (control positivo) fuera de <i>C. albicans</i> 10231 (D) ausencia de fluorescencia observado en contraste por filtro DAPI.....	55
Figura 7. Detección, en gel de agarosa al 2%, del gen 16S r DNA de <i>H. pylori</i> J99 en el ADN total extraído de <i>C. albicans</i> 10231 previamente coincubado con la bacteria durante 72h antes del ensayo por exposición a estrés antifúngico. (M) Marcador de peso molecular; (C+) control positivo (<i>H. pylori</i> J99); (C-) Control negativo como <i>C. albicans</i> 10231 como control puro (B) blanco (agua con grado de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (1) (control puro <i>H. pylori</i> J99) (2) cocultivo <i>C. albicans</i> 10231 y <i>H. pylori</i> J99.....	56
Fotografía 9. <i>C. albicans</i> y <i>H. pylori</i> teñidas con el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD de color verde que nos indica que las células están vivas.....	56
Fotografía 10. Capturas de pantalla cada 1 segundo de video donde se encuentra <i>C. albicans</i> portando en su vacuola a <i>H. pylori</i> , demuestra el cambio de posición de J99.....	57
Fotografía 11. Método de las diluciones dobles seriadas aditivas, 200µl de solución antifúngicos más 200µl de inóculo de levaduras. Se realizó lectura espectrofotométrica a las 48h de cultivo en condiciones de aerobiosis.....	58
Figura 8. Curva de visualización de levaduras portadoras de cuerpos similares a bacterias en su vacuola expuesta a concentraciones de 0,5µg/ml y 1µg/ml de antifúngicos: fluconazol, ketoconazol y clotrimazol.....	62

Figura 9. Curva de visualización de bacterias extracelulares egresadas de levaduras a concentraciones de 0,5µg/ml y 1µg/ml de antifúngicos: fluconazol, ketoconazol y clotrimazol.....63

Fotografía 12. Test de ureasa. **A** test de ureasa negativo en presencia de *C. albicans* 10231, **(B)** Test de ureasa positivo para *H. pylori* J99, **(C)** Test de ureasa positivo tras egreso de *H. pylori* J99 por la exposición a antifúngicos después de 72 h de incubación.....64

Fotografía 13. Filtración de *H. pylori* tras su egreso de *C. albicans*. **(A)** la suspensión con bacterias egresadas se extrajo con jeringa estéril. **(B)** la suspensión se filtró con papel filtro de 0,8µm con adaptadores reutilizables, una vez ocupados se dejan sumergidos en alcohol 70° para desinfectar.....64

Fotografía 14. Crecimiento de colonias de *H. pylori* J99 a una dilución 1:1 (5ml de la suspensión egresada, 5ml de caldo brucella.....65

Fotografía 15. Test Ureasa positivo a suspensión filtrada con *H. pylori*.....65

Fotografía 16. Tinción de Gram a suspensión de egreso de *H. pylori* vista a 100x con aceite de inmersión. Flecha indicada presencia de *H. pylori*.....65

Fotografía 17. *C. albicans* expuesta a fluconazol al 1µg/ml a las 72h de incubación.....71

Índice de tablas

Tabla 1. Puntos de Corte Según el CLSI M27 A3.....	58
Tabla 2. placas well con suspensión de cocultivo expuestas a sustancias antifúngicas.....	59
Tabla 3. Tinción de Gram a cultivos puros, cocultivo y cocultivos expuesto a sustancias antifúngica	60
Tabla 4. Examen en fresco a controles puros, cocultivo y cocultivo expuesto a antifúngicos.....	61
Tabla 5. Cantidad de bacterias intracelulares y extracelulares provenientes de levaduras expuesta a distintas concentraciones de antifúngicos (0,5µg/ml y 1µg/ml) de las cuales se calculó el valor p por cada tiempo (h) transcurrido.....	63

Capítulo 1. Introducción

Las bacterias patógenas con resistencia antibiótica ocupan gran atención en el área de la salud e investigación científica, por otro lado, la globalización y el aumento exponencial de la población mundial resulta un escenario desalentador, lo que se vuelve de suma importancia la ejecución de nuevos ensayos que delaten comportamientos ante diferentes situaciones de estrés en bacterias patógenas de interés mundial y de alta prevalencia como *H. pylori*. Los últimos informes científicos han demostrado que esta bacteria presenta cierta interacción con células de levaduras, la cual aún está en desarrollo ya que no está del todo esclarecida, la que se cree ocupa como vehículo de propagación y recolonización. Esto nos resulta de gran relevancia al conocer una ruta de escape que presenta la bacteria *H. pylori* e identificar su localización en condiciones de estrés, lo que entrega por desafío, buscar la manera de intervenir estratégicamente en la interacción bacteria-levadura que tiene como propósito minimizar la patogenicidad de *H. pylori*.

A continuación, se hará un análisis detallado de los microorganismos de interés presentados en esta tesis.

1.1 *Helicobacter pylori*

Es una bacteria Gran negativa, microaerófila y neutrófila, cuyo hábitat es la mucosa gástrica humana (Marshall y Warren, 1982). Identificada por primera vez en 1983 por Warren y Marshall (Mandel GL, 2010).

1.2 Biología

H. pylori es una especie estrechamente relacionada con *Helicobacter acinonychis*, específica de los grandes felinos, como guepardos, leones y tigres. Mientras que huéspedes más emparentados con los humanos albergan especies de *Helicobacter* más lejanas. Esta observación sugiere un salto entre especies hospedadoras. En Japón estuvieron muy cerca de descubrir *H. pylori*. Kasai y Kobayashi en 1919 revelaron en un estudio espiroquetas en el estómago de mamíferos.

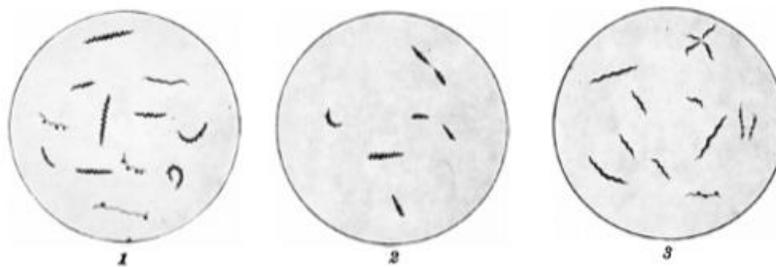


Figura 1. Tres tipos de espiroquetas (fig. 1-3) (Kasai y Kobayashi, 1919).

Alrededor de la misma época, el anatomista italiano Giulio Bizzozero informó la presencia de espiroquetas en la mucosa gástrica del perro (Bizzozero, G. 1993), también se observó la misma bacteria en espiral en el estómago de la mayoría de los gatos, aunque no la pudieron cultivar *in vitro*, fueron capaces de transmitirlos a ratones y de ahí a otros animales, como conejos y cobayas. En los conejos, a veces observaron erosiones e inflamación de la mucosa gástrica (Kasai K, Kobayashi R, 1919). las bacterias espirales parecían ser bastante comunes en los mamíferos, por lo que el avistamiento de la bacteria en muestras humanas de diferentes países no fue sorprendente (Asaka M, et al., 1995). Existe una importancia clínica de las helicobacterias gástricas no *H. pylori* (NHPH; también denominadas organismos similares a *H. heilmannii* y *H. heilmannii sensu lato*), la cual está aumentando gradualmente. Este grupo de bacterias puede habitar en el estómago de los animales domésticos y salvajes, incluidos gatos, perros, cerdos, primates, roedores, guepardos y conejos (Suzuki H, 2016). Los NHPH son microorganismos zoonóticos, lo que significa que pueden transmitirse entre animales y humanos. Pueden distinguirse de *H. pylori* por su microbiología que implica células más grandes con forma espiral y bipolaridad más marcadas, localización en la capa estomacal y distribución

regional (Stolte M, et al 1994). Un estudio de prevalencia realizado en China de más de 1.500 pacientes, todos ellos positivos para *H. pylori*, mostró que de los que estaban infectados por *H. pylori*, alrededor de la mitad estaban también infectados por *H. suis* (Liu J, et al., 2015). Esta última, es una bacteria presente en cerdos, personas al estar en contacto con cerdos vivos pudieron haberse infectado. Flahou y Haesebrouck, han demostrado que el NHPH puede detectarse en la carne picada de cerdo del supermercado, lo que sugiere que transmisión a través de la dieta también puede ser una posibilidad (De Cooman L, et al., 2013).

1.2 Morfología y estructura

Posee morfología helicoidal o curvada, de 2.5-5 x 0.5 μm , y posee 4-7 flagelos unipolares (Amieva 2008) esto le permite penetrar y anidarse bajo capa de mucus, donde la ureasa le crea un nicho neutro protector permitiéndole sobrevivir en el ambiente ácido del estómago, donde la ureasa convierte la urea presente en el jugo gástrico en amoníaco alcalino y dióxido de carbono (Marshall BJ, et al 1999) y la adhesión a las células epiteliales está mediada por distintas adhesinas como BabA, SabA, AlpaA, AlpaB, OipA, HopQ y HopZ (Kao, Sheu, & Wu, 2016).



Figura 2. Fotografía mediante microscopía electrónica de *H. pylori* (Montes Valles, M. 2016).

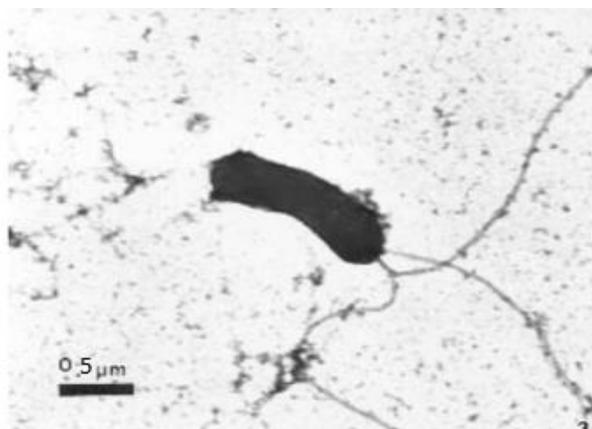


Figura 3. Micrografía electrónica de transmisión. *Helicobacter pylori* aislado a partir de una biopsia de antro gástrico de un paciente con gastritis crónica. Tinción negativa con ácido fosfotúngstico, mostrando una bacteria curva, con extremos romos y en uno de los cuales se observan tres flagelos fuente: Rivas-Traverso, F., & Hernández, F. (2000).

1.3 Condiciones de cultivo

Nutricionalmente *H. pylori* es una bacteria exigente, se le considera un microorganismo fastidioso pues requiere medios altamente enriquecidos (Kuster, 2006). Requiere un ambiente microaeróbico, con hasta 2-5% de O₂, 10% de CO₂ y humedad (Kuster, 2006).

1.4 Historia

La alta incidencia por infección provocada por *H. pylori* en la población fue descubierta entre las décadas 80 y 90 mediante estudios serológicos (H. Suzuki et al., 2016). Una bacteria con presencia en todos los continentes no así en todos los países, de los cuales presentan mayor incidencia los denominados países en vía de desarrollo y es menos común la infección en los países ricos. Se examinaron muestras de suero almacenadas desde 1960 (GD et al., 1991) donde se pudo demostrar que la infección disminuyó en la segunda mitad del siglo XX, a medida que aumentaba el nivel de vida, la calidad de agua y el tamaño de las familias. En países como Brasil y África el 80-90% de la población seguía infectada. En la década de los 90, a medida que disciplinas como la genómica y la proteómica se desarrollaron permitieron diferenciar entre cepas de *H. pylori* de distintos lugares

geográficos; así se descubrió que la población de América del sur estaba infectada con cepas españolas de *H. pylori*, que por la toxina VacA se designaron como cepas “Europa 1” (Van Doorn *et al.*, 1999). Lo que gatilló que en los científicos surgieran preguntas tales como: ¿Europa infectó con *H. pylori* a los habitantes de América del sur? ¿las personas en Sudamérica estaban libres de la infección por *H. pylori*? Una respuesta se encontraba en un examen realizado a momias andinas deshidratadas de Perú las que presentaron el antígeno de *H. pylori* en las heces (Castillo-Rojas G, 2008), esto fue anterior a la colonización lo que demuestra que la población del Perú también fue colonizada por *H. pylori* hace cientos de años, lo que demuestra ser *H. pylori* una bacteria bastante antigua.



Figura 4: Momias precolombinas mexicanas. El recuadro amarillo muestra la momia que dio positivo a *Helicobacter pylori* (Castillo Rojas G, 2008).

Estudios genómicos posteriores demostraron que *H. pylori* en América del sur era de origen asiático y que probablemente llegó allí con las migraciones humanas (Ghose *et al.*, 2002).

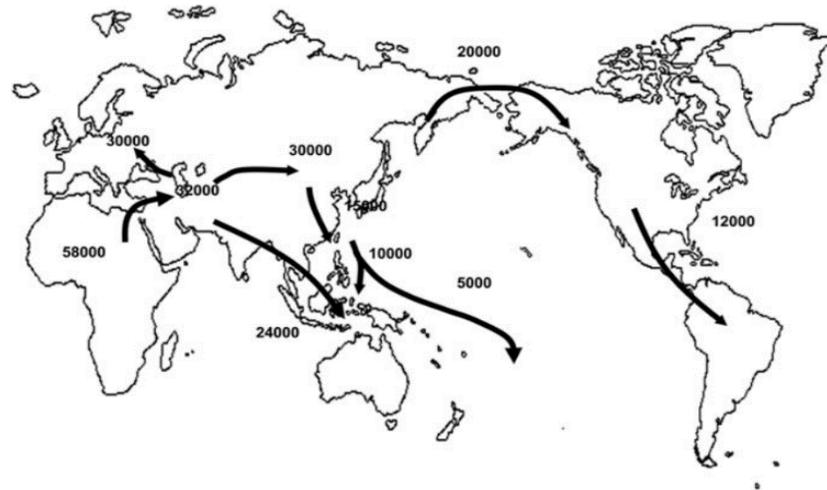


Figura 5. Migración humana moderna fuera de África. Las flechas negras y los números representan rutas y tiempos de migración (Suzuki *et al.*, 2016).

1.5 Filogeografía

Así, *H. pylori* ha colonizado a los humanos desde que salieron de África (Falush *et al.*, 2003) (Linz *et al.*, 2007). La evidencia de la colonización mucho antes de esto proviene de la cepa del león de *H. pylori*, que tuvo un ancestro común con la cepa humana hace 200.000 años (Eppinger *et al.*, 2006). Las cepas de *H. pylori* de distintas zonas geográficas muestran claras características filogeográficas. Lo que permitió suponer la migración de poblaciones humanas mediante análisis filogeográficos. La diversidad genética dentro de *H. pylori* es mayor que la de la mayoría de las bacterias

(Achtman *et al.*, 1999) y unas 50 veces mayor que la de la población humana (Li WH, Sdler LA, 1991). Lo más probable es que se transmita desde grandes felinos que contenían *H. acinonychis* a los pueblos San (hpAfrica2; muy distinto y solo ha sido aislado en Sudáfrica) y luego se extendió por todo el África (hpAfrica1 y hpNEAfrica) (Moodley Y, 2012). hpAfrica1 dividida en dos subpoblaciones, hspWAfrica (africanos occidentales, sudafricanos y afroamericanos) y hspSAfrica (sudafricanos). Por otro lado, hpNEAfrica es predominante en aislamientos del noreste de África (Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. 2012). Se cree que *H. pylori* se propagó desde África Oriental durante el mismo período de tiempo que los humanos anatómicamente modernos (~58,000 años hace) y refleja el patrón humano de mayor distancia genética y disminución diversidad con la distancia desde África (Linz *et al.*, 2007). Utilizando MLST, las poblaciones modernas derivan de seis poblaciones ancestrales (ancestral Europea 1 (AE1), ancestral Europea 2 (AE2), ancestral Asia Oriental, África ancestral 1, África ancestral 2 (Falush *et al.*, 2003) y Sahul ancestral (Moodley *et al.*, 2009). Estos ancestros derivaron recientemente a siete tipos de población basados en asociaciones geográficas: hpEuropa, hpAsia Oriental, hpÁfrica1, hpÁfrica2, hpAsia2, hpNEAfrica y hpSahul (21, 22, 23). Por una ruta costera del sur, los ancestros

de los humanos modernos pasaron de la India al Sudeste y Australasia (Correa P, Piazuolo MB 2012) durante su primera migración “fuera de África”, que posteriormente dio lugar a los linajes asiáticos (hpAsia2). Recientemente hpAsia2 se han aislado cepas en el sur, sureste y centro de Asia (Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. 2012). El origen de *H. pylori* en la población india es más heterogéneo. La ruta de Asia se entendía a lo largo de la masa terrestre del pleistoceno como resultado del bajo nivel del mar durante la última edad de hielo, hace 12.000 -43.000 años atrás). Así como también otros sitios geográficos del planeta como Australia Nueva Guinea y Tasmania. Conectado en un continente llamado Sahul (Moodley Y, et al 2009) lo que hace un tiempo se han aislado cepas hpSahul de aborígenes de Australia y nueva guinea (Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. 2012). Nuevas migraciones de ancestros de africanos hpNEAfrica y/o poblaciones asiáticas hpAsia2 resultaron en la población hpEurope mezclada que luego se convirtió en la población predominante de *H. pylori* existente en Europa, Oriente Asia oriental y occidental.

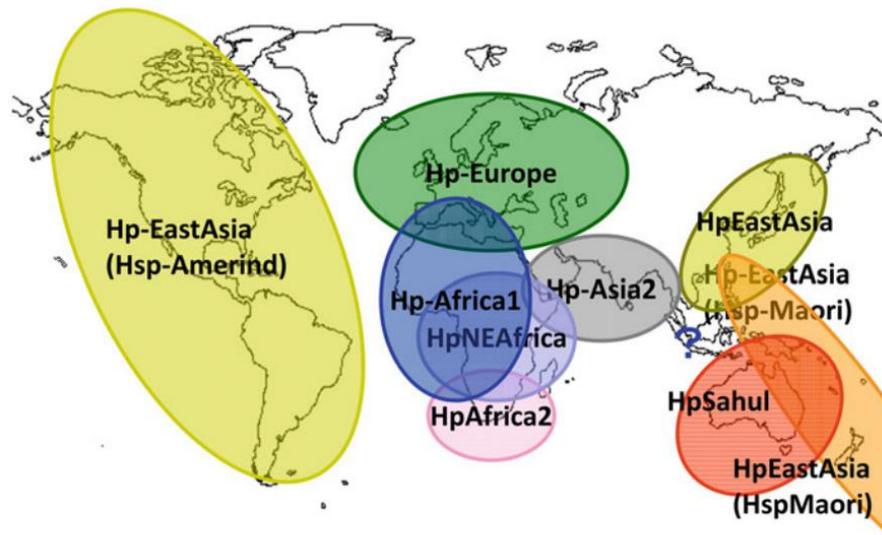


Figura 6. Siete tipos de población basados en asociaciones geográficas. Los círculos de color ilustran la distribución putativa de *H. pylori* antes de "la era de la exploración". Seis ascendencias derivadas a siete poblaciones: hpEuropa, hpAsia oriental, hpÁfrica1, hpÁfrica2, hpAsia2, hpNEAfrica y hpSahul (Suzuki *et al.*, 2016).

1.6 Ecología

Dado que aparentemente todas las razas humanas se infectaron con *H. pylori* y permanecieron colonizadas hasta ahora, se especula diferentes razones sobre por qué ha sido tan tenaz *H. pylori* que se encuentra infectando hasta hoy. Se propone que poblaciones humanas durante las migraciones de la edad de hielo, *H. pylori* llevó a producir ácido fólico, esto resulta beneficioso a humanos con nutrición limítrofe y con escaso acceso a verduras frescas

(Suzuki *et al.*, 2016). Hoy en día, estudios ecológicos mostraron una mayor incidencia acumulada de cáncer gástrico en países con mayor prevalencia de infección por *H. pylori*. Esta bacteria se asocia con un mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico de tipo difuso como de tipo intestinal. Un metaanálisis reciente de ensayos controlados aleatorizados mostró una reducción significativa del riesgo de cáncer gástrico en sujetos infectados por *H. pylori* que recibieron terapia de erradicación. Por lo que se espera que se realicen ensayos aleatorizados de gran tamaño y bien diseñados para evaluar la eficacia de la estrategia de detección y tratamiento, así como los cambios en la resistencia a los antibióticos y en el riesgo de cáncer gástrico. En Chile, un estudio realizado en la ciudad de Valdivia, donde el cáncer gástrico tiene una alta incidencia, trató de buscar la explicación del porqué la alta tasa de cáncer gástrico (Heise *et al.*, 2009). Se analizaron varios factores, tales como fumar, consumo de sal, condiciones sanitarias, consumo de alcohol, infección por *H. pylori*, sexo y grupo étnico (Mapuches). El estudio concluye que los gatillantes para un posterior desarrollo de cáncer gástrico es la alta infección por *H. pylori* desde la juventud, lo cual favorece aún más si se suma un rol genético como pertenecer o tener genes mapuches, ser hombre, fumar y o beber alcohol (Heise *et al.*, 2009).

1.7 Patogenicidad

H. pylori coloniza al estómago gracias a su gran movilidad flagelar y a la neutralización del pH ácido del estómago mediante la secreción de la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea a dióxido de carbono y amoníaco. (Levi *et al.*, 1989) propusieron originalmente que la condición alcalina generada localmente por *H. pylori* aumentaba la liberación de gastrina. La gastrina es una hormona secretada para la regulación de secreción de ácido. Las mediciones del pH en la capa gástrica han demostrado que la infección por *H. pylori* provoca un medio más alcalino, aunque la diferencia es solo de 0,3-0,8 puntos de pH (Moss S, Calamn J. 2012). También se registró que una exposición prolongada a niveles elevados de amoníaco en el jugo gástrico se induce una hiperfunción de las células G en ratas (Lichtenberger *et al.*, 1995). Lo que nos quiere decir, que es más perjudicial largos periodos de exposición al amoníaco producto de la ureasa, más que el pH neutro. Por otro lado, utiliza la enzima hidrogenasa para obtener energía del hidrógeno molecular. Estos mecanismos le permiten a la bacteria llegar a las células del epitelio gástrico, a las que se adhiere mediante diferentes adhesinas, como BabA, SabA, AlpaA, AlpaB, OipA, HopQ y HopZ (de Brito *et al.*, 2019; Kao, Sheu, & Wu, 2016). Una vez establecida la adhesión, *H. pylori* secreta citotoxinas

como CagA y VacA, que terminarán produciendo modificaciones de las células epiteliales y daño tisular. Esto llevará a la producción de citoquinas proinflamatorias, por lo que la mucosa gástrica es infiltrada por neutrófilos y células mononucleares, resultando en la producción de óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno. Esto lleva al desarrollo de dispepsia y úlceras. En casos más graves, o crónicos, lleva al desarrollo de cáncer gástrico o linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (de Brito *et al.*, 2019; Kao *et al.*, 2016). La mayoría de las personas infectadas por *H. pylori* presentan pocos o ningún síntoma. Sin embargo, algunos pueden experimentar síntomas de dispepsia crónica, aunque no padezca úlcera péptica ni cáncer gástrico, dispepsia es un término que incluye un grupo de síntomas, como dolor epigástrico, ardor epigástrico, sensación de plenitud postprandial y saciedad precoz, que se cree se originan en la región gastroduodenal. Según la definición de Roma III, se diagnostica dispepsia funcional (DF) cuando no se encuentra una explicación estructural o bioquímica para los de un paciente independientemente de la existencia de infección por *H. pylori* (Tack *et al.*, 2006). La DF es una de las enfermedades gastrointestinales más frecuentes, que repercute la calidad de vida.

1.7.1 Factores de virulencia

En la actualidad, los dos factores de virulencia de *H. pylori* más ampliamente estudiados son *cagA* y *vacA*, se utilizan como marcadores de la diversidad genómica dentro de poblaciones distintas (Yamaoka *et al.*, 2002). Sin embargo, estos enfoques se centran en un pequeño número de genes y puede pasar por alto información transmitida por el resto del genoma. Los análisis de todo el genoma que utilizan micromatrices de ADN o tecnología de secuenciación del genoma completo brindan una visión amplia del genoma de *H. pylori* (Suzuki H. 2016). La infección crónica por cepas *cagA* positivas de *H. pylori* es el factor de riesgo más fuerte para el cáncer gástrico. *H. pylori* inyecta la proteína CagA codificado por el gen *cagA* en las células epiteliales gástricas del huésped. Estudios recientes revelaron que CagA actúa como un andamio patogénico/oncogénico, que promueve la señalización oncogénica en células huésped. De hecho, CagA interactúa con una variedad de proteínas celulares y desregula sus funciones (Suzuki H. 2016). La citotoxina vacuolizante (VacA) de *H. pylori* es otro factor importante de virulencia, con acciones pleiotrópicas en las células diana que incluyen la vacuola, disfunción mitocondrial que conduce a la apoptosis, modulación de las vías de transducción de señales asociadas a la autofagia, inhibición de la

proliferación de células T y la producción de citoquinas inflamatorias. (Suzuki H. 2016). Curiosamente, se ha sugerido que CagA se degrada por la autofagia inducida por VacA y que la interacción entre estas dos moléculas está asociada a la patogénesis de las enfermedades gástricas (Suzuki H. 2016). Por lo tanto, una mejor comprensión de mecanismo de toxicidad de VacA puede proporcionar información valiosa sobre la atención médica adecuada de las enfermedades gastroduodenales causadas por la infección por *H. pylori* (Memon *et al.*, 2014; Telford *et al.*, 1994).

1.8 Epidemiología

El 50% de la población humana es seropositiva a *H. pylori*, tuvo la infección o la cursa. Este patógeno se adquiere a edades temprana. La frecuencia de la infección presenta una distribución bimodal, pues depende del nivel de desarrollo del país. En países en vía de desarrollo, más del 80% tiene serología positiva para *H. pylori*, mientras que en países industrializados este porcentaje disminuye a un 20% (Azevedo, 2009; Jones *et al.*, 2012). A nivel mundial, Europa ha bajado los niveles de población infectada por *H. pylori*, aunque de todas formas son porcentajes que no hay que dejar de considerar.

En América latina es un problema de salud pública, como en ciertos países de Asia y África (Porrás *et al.*, 2013, García *et al.*, 2014). En el caso de Chile, la seroprevalencia oscila entre 60- 79% (Martínez *et al.*, 1999; Ferreccio *et al.*, 2007; Gatta *et al.*, 2012, Porrás *et al.*, 2013). La infección en niños alcanza un 36,4%, donde los lactantes representan un 3,6% preescolares 5,7%, escolares 11,2% y adolescentes 34,8% (Martínez *et al.*, 1999). El cáncer gástrico en Chile ocupa el primer lugar como causa de mortalidad por tumores malignos, siendo la principal causa de mortalidad en hombres y la tercera en mujeres del país (Csendes & Figueroa, 2017).

1.8.1 Detección

La prueba del aliento con urea (UBT) y la prueba rápida de la ureasa (RUT) son los métodos de diagnóstico más utilizados para detectar la infección por *H. pylori*. Los que se basan en la detección de la presencia de ureasa producida por *H. pylori*. La sensibilidad de la UBT es excelente (a menudo superior al 95 %). La mayoría de los resultados falsos positivos tras la erradicación se producen cuando los resultados están cerca del valor de corte y son más frecuentes en zonas donde la gastritis atrófica es común y el ácido cítrico no se utiliza como coadyuvante. La sensibilidad de la RUT es ligeramente inferior (aproximadamente 80-95%) (Shiotani *et al.*, 2016).

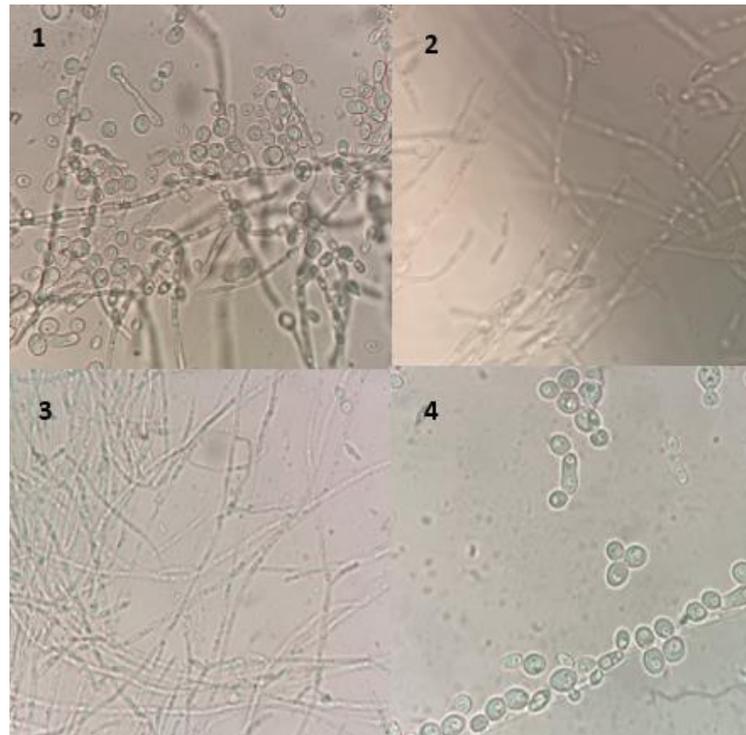
1.8.2 Transmisión

Dado a que sus mecanismos de transmisión no están del todo claros, se postula que los mecanismos de esta bacteria para propagarse serían de forma directa, la bacteria pasa de persona a persona de forma oral-oral, fecal-oral, o de forma indirecta, proveniente del medio ambiente, desde el agua hasta alimentos (Calvet *et al.*, 2013).

1. 2 Candida albicans

Es una levadura polimórfica diploide que forma parte de la microbiota humana, se puede encontrar en la piel, tractos gastrointestinal, respiratorio y genitourinario (Da Silva *et al.*, 2016; Dadar *et al.*, 2018). *C. albicans* puede sobrevivir en distintos nichos del cuerpo humano como comensal gracias a su plasticidad morfológica, pudiendo cambiarla de manera reversible entre levadura y forma filamentosa (hifas verdaderas) dependiendo de las condiciones ambientales. La transición entre la forma de levadura y la forma hifal puede permitirle evadir el sistema inmune del hospedador, y además puede formar biofilms (Liu, 2002; Mayer, Wilson, & Hube, 2013; Tscherner *et al.*, 2019; Verma-Gaur & Traven, 2016).

En superficies epiteliales, donde principalmente habita, puede adherirse mediante la expresión de adhesinas, y en su forma filamentosa puede producir enzimas hidrolíticas que le permiten penetrar epitelios.



Fotografía 1. *Candida albicans* vista a 100X con aceite de inmersión a las 48h y 72h de incubación en aerobiosis en medio Sabouraud (elaboración propia).

1.3 Interacción bacteria levadura

El establecimiento intracelular de bacterias en el interior de los hongos se considera un fenómeno evolutivo inusual, ya que la pared celular de los hongos restringe la endocitosis y la captación bacteriana (Gehring H, 1996). Aunque existe un número limitado de ejemplos de hongos que albergan bacterias intracelulares (Scannerini S, 1991). El ejemplo más estudiado es el del establecimiento evolutivo temprano de las endobacterias en los hongos micorrícicos arbusculares (MA), donde se propone que las vacuolas de los hongos proporcionan un nicho nutritivo y protector para la bacteria endosimbiótica, facilitando su replicación y transmisión a la siguiente generación (Bianciotto V, 2000). El ergosterol en los invertebrados unicelulares es similar al colesterol en los vertebrados, este componente lipídico de la membrana se encuentra implicado en varios procesos celulares fúngicos (Jin H, 2008) y justamente, *H. pylori* se destaca en la incorporación de una gran cantidad de ergosterol en su membrana celular hasta el 70%, mucho más que *Escherichia coli*, que es de un 17%, lo que sugiere que se haya desarrollado como consecuencia de la asociación simbiótica con huéspedes eucariotas (Haque M, 1996).

1.4 Candida Albicans y Helicobacter pylori

Se ha visto que *C. albicans* y *H. pylori* abundan en ciertos nichos humanos, como la pulpa necrótica del conducto radicular, el estómago, el duodeno y la vagina (Chu YT, 2010), lo que sugiere que *C. albicans* puede interactuar con *H. pylori* para promover el crecimiento, la propagación y la infección de *H. pylori* en condiciones que aún se desconocen en como persiste *H. pylori* en el medio ambiente. Por lo que esta interacción puede aumentar la resistencia al efecto destructor de los antibióticos y a un entorno desfavorable a través de la endosimbiosis, la adhesión o la formación de biopelículas mixtas (Chen *et al.*, 2021). *H. pylori* parece ser un invasor que se transmite verticalmente a las células hijas de *C. albicans*, manteniéndose y fabricando sus propias proteínas (Siavoshi F, 2014). Se han detectado peptidoglicanos en el interior de la levadura los que pueden pertenecer a *H. pylori*, *Staphylococcus* o cualquier otra bacteria intracelular que coexista en la levadura como su microbioma. La detección de sólo unas pocas bacterias intracelulares en las generaciones antiguas y nuevas de la levadura, así como de fragmentos de peptidoglucano en su exterior, sugirió que la levadura controla la abundancia de sus bacterias intracelulares a bajo ritmo mediante la hidrólisis y la exportación de peptidoglucano (Heydari, 2022). La frecuencia de *C. albicans*

invadida por *H. pylori* en la cavidad oral de los bebés nacidos normalmente es mayor que la de los nacidos por cesárea. Lo que indica que la vagina es un reservorio primordial para transmitir *H. pylori* a los recién nacidos a través de su cavidad oral (Siavoshi 2013, Sánchez-Alonzo *et al.*, 2020) Las vacuolas que contienen las bacterias son significativamente más grandes y contienen principalmente bacterias en lugar de los materiales citoplasmáticos (nakagawa *et al.*, 2014). Un estudio realizado con 50 levaduras del género *Candida* aisladas desde la cavidad oral, estómago y heces humanas fueron tratadas con concentraciones sub-letales de anfotericina B, compuesto antifúngico que forma poros en la membrana de los hongos al unirse a un componente, el ergosterol, lo que produce la salida de compuestos citoplasmáticos, llevando al microorganismo a la muerte. Dos de estas levaduras, ambas *C. albicans*, liberaron bacterias que resultaron ser cultivables, las cuales fueron identificadas como *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus haemolyticus*. En consecuencia, la vacuola de la levadura con todas estas propiedades favorables podría servir como refugio transitorio para *H. pylori* mejorando su sobrevivencia

1.5 Acción antifúngica

Actualmente existen 5 grupos de agentes antifúngicos utilizados contra infecciones micóticas, como candidiasis: azoles, polienos, equinocandinas, alilaminas y antimetabolitos (Gintjee, Donnelley, & Thompson, 2020; Howard, Dennis, Watt, & Garneau-Tsodikova, 2020). El grupo de los azoles como fluconazol, ketoconazol o voriconazol, son compuestos que interactúan con enzimas del sistema citocromo demetilasa de células fúngicas, como lanosterol 14- α -demetilasa, y bloquean la conversión de lanosterol en ergosterol. (Bellmann & Smuszkiewicz, 2017; Howard *et al.*, 2020). Los polienos, como anfotericina B, se unen a la molécula de ergosterol que compone la membrana citoplasmática fúngica y la sequestran, desestabilizando la membrana y llevando a la formación de poros, por los que saldrán componentes citoplasmáticos y iones, con la consecuente pérdida de gradiente eléctrico (Nami *et al.*, 2019). Ketoconazol y clotrimazol es un antifúngico del grupo de los imidazoles, éstos constituyeron un gran avance en el tratamiento de las micosis. Una substitución N de los imidazólicos creó la familia de los triazoles, que tienen el mismo mecanismo de acción que los imidazoles, similar o más amplio espectro, pero con menos efecto sobre la síntesis de esteroides humanos. Tanto imidazoles como triazoles inhiben la C-

14 demetilación del lanosterol de la membrana citoplasmática fúngica al unirse a una de las enzimas del citocromo P-450 (C-14 α desmetilasa), que lleva a la acumulación de C-14 α metil esteroides y reducen la concentración de ergosterol, un esteroide esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica. Su efecto es fungistático. Los antimicóticos pueden ser fungistáticos o fungicidas según inhiban el crecimiento o produzcan lisis de los hongos. Los más utilizados son los derivados imidazólicos que actúan en un componente importante de la membrana del hongo, el ergosterol, el cual es un lípido de la familia de los esteroides que actúa dándole fluidez, simetría e integridad; además de contribuir en funciones propias de muchas enzimas como la quitina sintetasa, que es importante para el crecimiento y división de la propia célula (Bellmann & Smuszkiewicz, 2017).

1.6 Hipótesis de Trabajo

Tavakolian *et al.*, 2018 buscaron determinar si se produce la liberación de células de *H. pylori* cultivables y/o VNC (viable no cultivables) desde células de *C. albicans* tratadas con distintos agentes antifúngicos (fluconazol, ketoconazol y voriconazol) que atacan la membrana de *C. albicans*, lo que

resultaron positivas para la presencia de ADN de *H. pylori* en su interior, pero no liberaron bacterias viables. Estos resultados, nos resultan relevantes para indagar en la interacción bacteria-levadura. Por lo tanto, se decide ampliar este estudio con respecto a la administración de antifúngicos.

¿De qué forma se puede recuperar a las bacterias *H. pylori* egresadas tras exposición a concentraciones subletales de antifúngicos? ¿demostrar la salida viable y cultivable de *H. pylori*, sería importante para entender la alta tasa de reinfección por esta bacteria patógena? ¿acaso, la adición de fármacos antimicóticos en concentraciones subletales acompañado de antibióticos resultaría más efectivo como terapia de erradicación de *H. pylori*, bacteria la cual que presenta alta resistencia antibiótica?

Entonces, se formula la siguiente hipótesis:

La exposición a concentraciones subletales de 0,5µg/ml y 1µ/ml de sustancias antifúngicas como fluconazol, ketoconazol y clotrimazol provoca el egreso de *H. pylori* viable del interior de la vacuola de *C. albicans*.

1.6.1 Objetivo general

Determinar si los compuestos antifúngicos estimulan el egreso de la bacteria *H. pylori* J99 desde la vacuola de *C. albicans* ATCC 10231.

1.6.2 Objetivos específicos

1. Determinar las condiciones necesarias para obtener colonias de *C. albicans* 10231 ATCC portadoras de *H. pylori* J99 en su interior.
2. Exponer a sustancias antifúngicas colonias de levaduras de *C. albicans* ATCC10231 portando a *H. pylori* J99 en su vacuola como factor de estrés que permite la liberación de *H. pylori*.
3. Demostrar la salida de *H. pylori* J99 viable desde *C. albicans* ATCC10231 mediante ensayos microbiológicos.
4. Realizar técnicas adecuadas a la suspensión de microorganismos expuesta a estrés por antifúngicos para aislar células de *H. pylori* J99.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

Objetivo específico 1

2.1 Cepas de estudio

Se utilizó la cepa de colección *H. pylori* J99 disponible en el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del departamento de Microbiología, Universidad de Concepción. Esta cepa fue aislada originalmente desde un paciente con úlcera duodenal y se caracteriza por tener un genotipo *cagA+*, *dup A+*. La cepa se mantuvo almacenada a -80°C en caldo BHI (infusión cerebro corazón) suplementado con glicerol al 20% VN (Kusters *et al.*, 2006)

2.1.2 Cultivo de microorganismos

El cultivo de *H. pylori* se realizó en placas de agar Columbia suplementado con 7% de suero fetal bovino. Se incubó a 37°C por 5 días en microaerobiosis (10% CO_2) en estufa (Thermo scientific 3429). Pasado el tiempo de incubación, se tomó un inóculo y se realizó un traspaso a placa bajo las mismas condiciones señaladas, pero esta vez por 3 días de incubación.

El cultivo de *C. albicans* se realizó en placa de agar dextrosa Sabouraud (Difco™) suplementado con cloranfenicol para eliminar cualquier bacteria extracelular. Se incubó en aerobiosis a 37°C por 24 h en estufa (Zhicheng ZDP-2160).

En ambos casos se verificaron los cultivos por observación en fresco mediante microscopía de luz, para determinar la morfología característica de *C. albicans* y por tinción de Gram para la morfología de *H. pylori*. Adicionalmente, se realizó prueba de ureasa a *H. pylori*.

2.1.3 Condiciones de Cocultivo entre *H. pylori* y *C. albicans*

Según protocolo señalado por Sánchez-Alonzo *et al.* (2020), se realizó un cocultivo entre células de levaduras y bacterias. En una placa well de 6 pocillos se agregan 8ml de suero fisiológico al 0,89%, 1ml de suspensión de levaduras *C. albicans* ATCC10231 que se llevó a una turbidez similar a 3 a la escala de McFarland, y 1ml de suspensión de *H. pylori* J99 a una turbidez similar 3 a la escala de McFarland, a cada pocillo, con un volumen total de 10ml por pocillo. La suspensión resultante se incubó a 37°C en microaerobiosis (10% CO₂) en estufa (Thermo scientific 3429). Se midió el crecimiento de los microorganismos cada 3 horas durante 72 horas tomando alícuotas de 25 µL que fueron depositadas en portaobjetos y observadas mediante microscopía óptica a 100X con aceite de inmersión. Una vez transcurrida las 72h, con una tórula estéril se sumerge en la suspensión y se

siembra en placas de Agar Saubouraud mediante diseminación en césped a 37°C por 48h a 72h. Para confirmar que las placas sembradas estén libres de bacterias extracelulares, se realizan pruebas de verificación: examen en fresco mediante microscopio óptico vista a 100x con aceite de inmersión, también tinción de Gram con el objetivo de observar la morfología celular y su clasificación en su coloración.

2.2 Detección de la entrada de *H. pylori* J99 a *C. albicans* 10231 por inmunofluorescencia (FISH)

Luego se procedió a comprobar si *H. pylori* ingresó a *C. albicans*. Se tomó una alícuota de 1ml de la suspensión tratada por estrés con suero fisiológico del cocultivo entre las cepas *H. pylori* J99 y *C. albicans* 10231. Los tubos eppendorf con las suspensiones de células de levaduras y bacterias fueron centrifugados a 6700g durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadió 2ml de PBS 1X al pellet, se agitó en vortex hasta resuspender todo el pellet. Se extrajeron 100 µL de cada suspensión y se depositaron sobre un portaobjeto, se dejó secar durante 30 min aproximadamente a temperatura ambiente. Una vez seco, se flameo el portaobjeto en el mechero tres veces, de forma rápida, para adherir el frotis al vidrio. Una vez secas, las muestras se fijaron con 200 µL de solución formaldehído al 37% a 4°C dentro de una

cámara húmeda por 3h. Luego se retiró el formaldehído y se dejó a las muestras secar a temperatura ambiente. Una vez realizada lo anterior, se incubó durante 3 min cada frotis por cada una de las concentraciones de etanol al 50%, 80%, 96% a temperatura ambiente. Cada vez se retiraba el etanol restante. Al finalizar, se dejó secar a temperatura ambiente. Se agregó 100 μ L de la solución de hibridación (270 μ L de NaCl 5M; 30 μ L de TRIS-HCl 1 M; 525 μ L de formamida desionizada al 37,7%; 675 μ L de agua MiliQ; y 15 μ L de SDS al 10%) al frotis que se fijó, luego se añadió sobre la alícuota a cada uno de los frotis 6ul de la sonda Hoy 5'-CACACCTGACGACTATCCCG-3' marcada con Cy 3 a una concentración de 5 ng/ μ l. La solución se mezcló cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta de 0.1 a 10ul en el mismo portaobjeto en contacto con la alícuota sin tocar el vidrio. Se incubó en cámara húmeda a 46°C a 48°C durante 90 minutos en baño termorregulado (Elma, Singen, Alemania) en la oscuridad. Tras la hibridación, cada frotis fue lavado 2 veces con el tampón de lavado (700 μ L de NaCl 5M, 1 mL de TRIS-HCl, 48,25 mL de agua destilada estéril y 50 μ L de SDS al 10%), 1 ml por cada vez. Se utilizó 1ml de tampón de lavado y se dejó incubar en una cámara húmeda en un baño termorregulado a 46°C 48°C durante 20 min, la primera vez y la segunda 5 min de incubación,

desechamos el tampón restante cada vez. Se dejó secar y se añadieron 200 μ L de anilina azul a una razón 1:10 en PBS 1X y incubar durante 10 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se lavó 2 veces con 1 ml de PBS 1X, se dejó secar a temperatura ambiente en la oscuridad. Por último, las muestras fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Motic, Viking Way, Richmond, BC, Canadá) con los filtros FITC (AT480/535) y TRIC (AT540/605).

2.3 Extracción de ADN de cultivos puros de *C. albicans* 1023, *H. pylori* J99 y de cocultivo entre 10231 y J99.

Del cultivo bacteriano obtenido se centrifugó, y se resuspendió el pellet con 50 μ L buffer de lisis (50 mM TrisHCl, 50 mM EDTA pH 8,1% SDS y 50mM NaCl). Se adicionó 50 μ L de SDS al 10%, y 50 μ L de lisozima (10 mg/ml). La mezcla obtenida se incubó a 37°C durante 10 minutos. Luego los tubos eppendorf se llevaron a un termo-bloque durante 30 minutos a 100°C. Al terminar, se dejó enfriar a temperatura ambiente (entre 10 a 15 minutos) y se agregaron 2 volúmenes (de 300 μ L) de fenol-cloroformo-alcoholisoamilico (25:24:1) a cada tubo. Se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos y se transfirió la fase acuosa (superior) a un nuevo tubo (aprox. 100 μ L). Se adicionó 1,0 volumen (aprox 100 μ L) de isopropanol frio. Se centrifugó

durante 10 minutos a 13.000 rpm y se descartó el sobrenadante. Por último, se resuspendió el pellet con 50 µL de buffer TE para cuantificar el ADN, previa dilución en razón 1:10 en agua PCR.

2.3.1 Amplificación del ADN de cultivos puros de *C. albicans* 1023, *H. pylori* J99 y de cocultivo entre 10231 y J99

Para cada muestra, se añadieron 6.25 µl de Mix takara, 1 µl del cebador F-5`CTC GAG AGA CTA AGC CCT CC3`, 1 µl del cebador inverso R-5` ATT ACT GAC GCT GAT GTG C3`, 3.25 µl de agua PCR para obtener un volumen final de 12.5 µl de la mezcla PCR. Al final se añadió 1ul de ADN por cada muestra. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C/1min, temperatura de desnaturalización a 98° C/30s, temperatura de hibridación a 53° C/5s, temperatura de extensión a 72°C/40s, temperatura de extensión final a 72° C/10 min. Se programaron 30 ciclos para cada reacción de PCR utilizando un termociclador (Eppendorf, USA). La amplificación del gen del ADNr 16S de *H. pylori* se confirmó tras la electroforesis en gel de agarosa al 2% (lonza, Walkersville, USA) realizada

a 70 V durante 90 minutos. El gel de agarosa se visualizó bajo luz UV utilizando un transiluminador modelo Enduro (Labnet, New Jersey, USA).

2.4 Determinación de la viabilidad de las bacterias intracelulares

Para corroborar la viabilidad de los CSB dentro de las vacuolas de *C. albicans* ATCC10231, se tomó una alícuota de 20 µL de cultivo de *C. albicans* ATCC10231 post ensayo de internalización de *H. pylori* J99 y se depositó en un portaobjetos de vidrio, para luego teñir utilizando el kit de viabilidad bacteriana BacLight LIVE/DEAD (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La preparación se observó utilizando un microscopio de fluorescencia para observar las células bacterianas existentes dentro de las células de *C. albicans* ATCC10231 y registrar su movimiento. Las células bacterianas vivas deberían observarse de color verde y las muertas de color rojo (Siavoshi *et al.*, 2019).

Objetivo específico 2

2.5 Preparación de antifúngicos

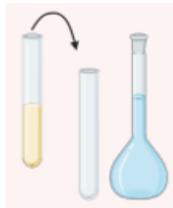
Se prepararon soluciones stock de fluconazol diluidas en agua destilada, clotrimazol y ketoconazol en dimetilsulfóxido (DMSO), las cuales fueron

filtradas a través de poros de 0.22 μm estériles y llevadas a un rango de concentración entre 16000 a 3.13 $\mu\text{g/ml}$, y luego diluidas en RPMI para alcanzar concentraciones finales en un rango entre 0.0313 hasta 16 $\mu\text{g/ml}$ en microplacas de cultivo de 96 pocillos, en un volumen total de 200 μL por pocillo, según se recomienda en la metodología de referencia del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, CLSI M27-A2 (CLSI, 2002).

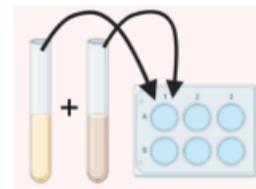
Ilustración 1. Preparación antifúngicos



Solución 1
Stock: 1000 $\mu\text{g/ml}$
0,001g de fluconazol en 1ml de Agua destilada.



Solución 2 Stock:
100 $\mu\text{g/ml}$
100 μl de la solución 1 stock + 900 μl de agua destilada o DMSO.



4ml de suspensión de cocultivo 10231 y J99 a escala mcfarland 3 en caldo Brucella + 20ul de solución stock 2 de antifúngicos. concentración final de 0,5ug/ml.

2.5.1 Determinación de los perfiles de susceptibilidad a antifúngicos mediante el método de microdilución en caldo

Se utilizaron microplacas de cultivo de 96 pocillos estériles en las que se depositó 100 μ l de las diluciones seriadas de los antifúngicos insolubles, disueltos en DMSO y solubles en agua, en el rango de concentraciones expuesto anteriormente. Los pocillos de la fila n°1 tenían la menor concentración de antifúngico, 0.013 μ g/ml, y los de la fila n°10 tenían la mayor concentración de antifúngico, 16 μ g/mL. Posteriormente, se agregaron 100 μ l de la suspensión de inóculo, ajustando las densidades de inóculo (0.5x10³ – 2.5x10³ céls./mL) desde el pocillo 2 hasta el 12, la columna n°1 (1^a-1H) que contenía 200 μ l de RPMI, se utilizó para el control de esterilidad del medio. También sirvió para leer la absorvancia del medio. La columna n°12 no contiene antifúngico, pero debe tener la misma concentración de disolvente que los pocillos con antifúngico. Es el control de crecimiento. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 48 horas en condiciones de aerobiosis *C. albicans* ATCC10231. Una vez concluido el período de incubación, se procedió a realizar la lectura de los pocillos de la microplaca a 490 nm y 510 nm para medir el crecimiento microbiano. Se define la concentración mínima inhibitoria como la concentración de agente

antifúngico en la que no se registre crecimiento (CLSI, 2002). También se determinó la concentración mínima fungicida cultivando alícuotas de los pocillos en los que no se registró crecimiento microbiano, en los medios de cultivo y en las condiciones que corresponda según el microorganismo.

2.5.2 Incubación en presencia de compuestos antifúngicos

Mediante la obtención de inóculos de colonias de *C. albicans* 10231ATCC portando cuerpos similares a bacterias en su vacuola incubados a 37°C durante 120 horas en condiciones de microaerobiosis, suplementado con concentraciones de fluconazol, clotrimazol, ketoconazol, a 0,5 ug/ml y a 1ug/ml concentraciones, las que fueron determinadas en función de los resultados de la actividad de determinación de perfiles de susceptibilidad a antifúngicos en *C. albicans* ATCC10231.

Objetivo específico 3

2.6 Detección mediante microscopía óptica y cultivo de células de *H. pylori* J99 liberadas

Las suspensiones tratadas por antifúngicos se examinaron mediante observación en fresco y tinción de Gram mediante un microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión, para demostrar el egreso de células de *H. pylori* J99 mediante su movilidad y morfología. Además, se realizó un ensayo de PCR utilizando partidores específicos para la amplificación del gen que codifica el ARNr 16S de *H. pylori*, bajo el procedimiento descrito anteriormente y además, se hizo un examen molecular por inmunofluorescencia FISH para buscar la evidencia de la salida de *H. pylori* J99.

Objetivo específico 4

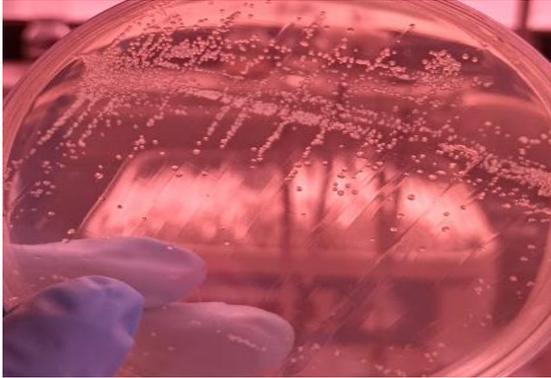
2.7 Filtración y aislamiento de colonias de *H. pylori* a partir de *C. albicans* 10231ATCC expuestas a estrés por antifúngicos.

Se llevó parte de la suspensión tratada previamente por antifúngicos a un tubo falcon de 15ml, se dejó al azar llenado con Brucella al 1% de extracto de

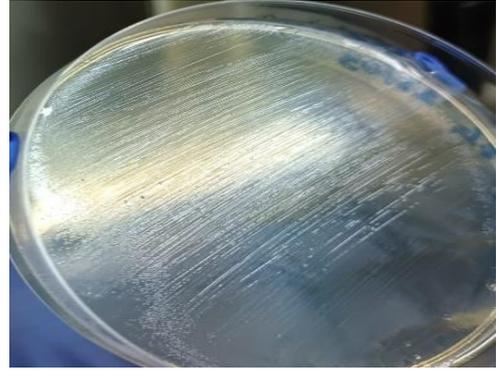
levadura, se centrifugó por 3 min a 3.000rpm, se tomó el sobrenadante y se llevó a otro tubo falcon de 15ml y se rellenó con medio liquido brucella más 1% de extracto de levadura y se repitió el paso anterior. Una vez descartado el pellet que se forma producto de la levadura, se filtra la suspensión con filtro de poro 0.8ul con una jeringa de 10ml, lo recuperado se dejó en tubo eppendorf de 1.5ml incubado por 48h a 37°C en microaerobiosis para acondicionar a la bacteria. Luego se extrajeron 100ul y se depositó en una placa medio Casman al 7% de suero fetal equino, con un asa se diseminó por estría, se dejó incubando de 3 a 5 días, hasta notar su crecimiento en placas formando las típicas colonias en forma de gotitas de rocío. Se hizo test de ureasa para confirmar la presencia de *H. pylori*, así como tinción de Gram y examen en fresco.

Capítulo 3. Resultados

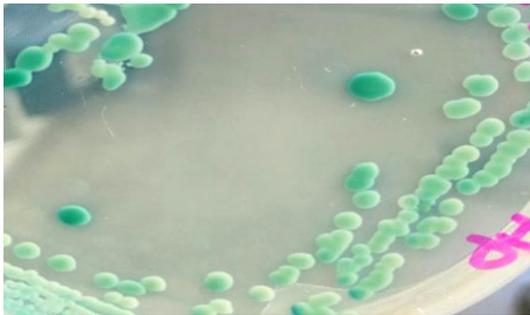
Cultivo de microorganismos



Fotografía 2. Crecimiento de la cepa *H. pylori* J99 conservada a -80°C tras 120h de incubación en condiciones de microaerobiosis, medio agar columbia suplementado con suero fetal bovino al 7%



Fotografía 3. Resiembra de la cepa *H. pylori* J99 proveniente de -80°C luego de 72 h de incubación en condiciones de microaerobiosis, medio agar columbia suplementado con suero fetal bovino al 7%



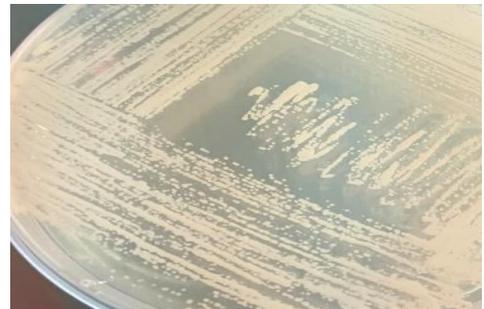
Fotografía 4. Cultivo de *C. albicans* tras 48h en medio de cultivo cromogénico CHROMagar™ Candida



Fotografía 5. Cultivo puro de *C. albicans* tras 48h en medio de cultivo agar Sabouraud.

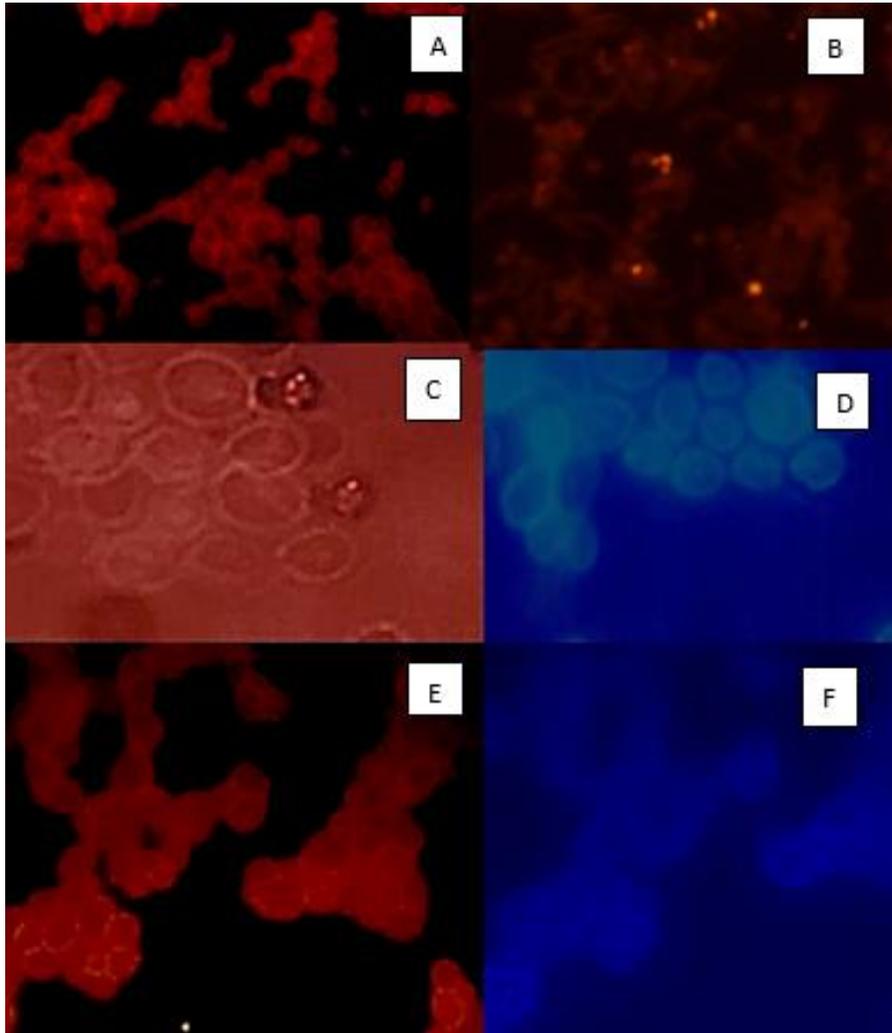


Fotografía 6. Cultivo mixto de *C. albicans* y *H. pylori* tras 48h en medio de cultivo cromogénico CHROMagar™ Candida.



Fotografía 7. Cultivo mixto de *C. albicans* y *H. pylori* tras 48h en medio de cultivo agar Sabouraud.

Resultados Moleculares



Fotografía 8. Ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales anti-*H. pylori* IgG marcados con isotiocinato de fluoresceína (FITC) vista a 100X con aceite de inmersión. (A) Cultivo puro *C. albicans* 10231 (B) Cultivo puro de *H. pylori* (C) *C. albicans* 10231 con cuerpos similares a bacterias en su vacuola (control negativo) observado por filtro TRITC (D) ausencia de fluorescencia en el control negativo observado con filtro DAPI (E) presencia de fluorescencia emitida por *H. pylori* j99 (control positivo) fuera de *C. albicans* 10231 (F) ausencia de fluorescencia observado en contraste por filtro DAPI.

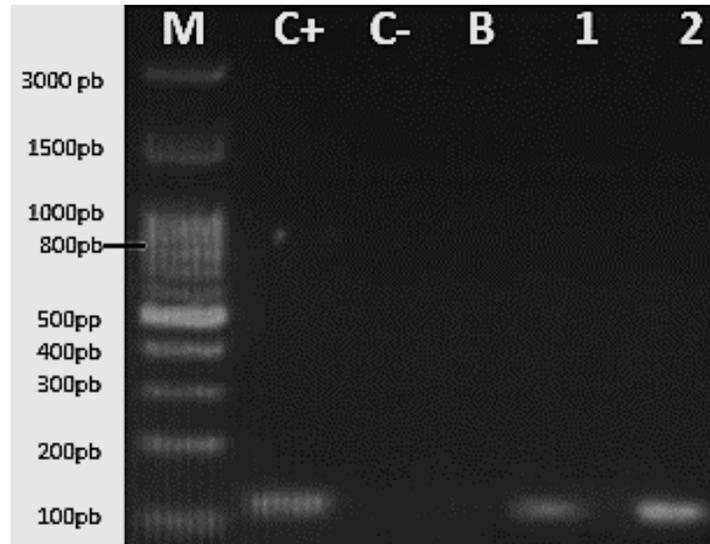
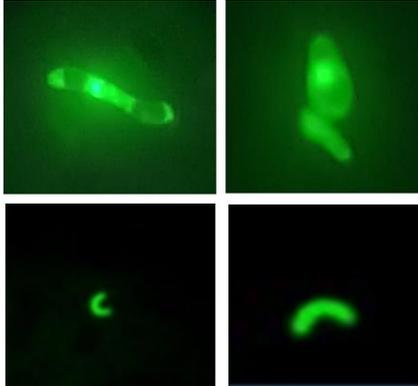
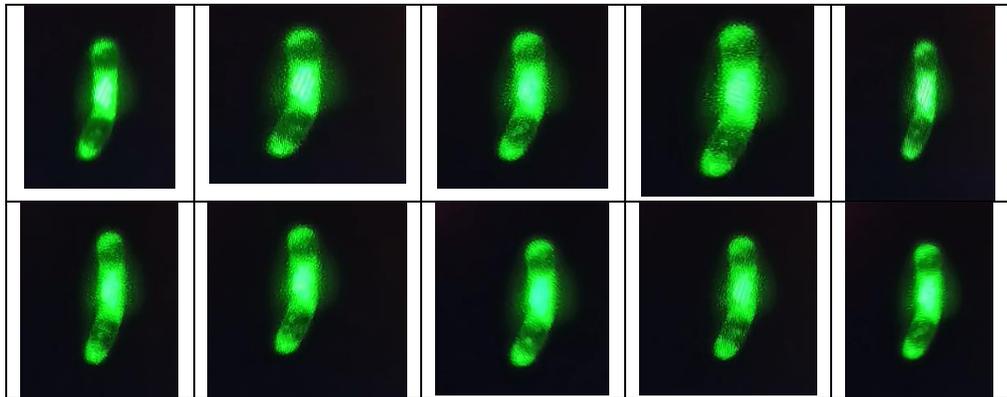


Figura 7. Detección, en gel de agarosa al 2%, del gen 16S r DNA de *H. pylori* J99 en el ADN total extraído de *C. albicans* 10231 previamente coincubado con la bacteria durante 72h antes del ensayo por exposición a estrés por antifúngicos. **(M)** Marcador de peso molecular; **(C+)** control positivo (*H. pylori* J99); **(C-)** Control negativo como *C. albicans* 10231 como control puro **(B)** blanco (agua con grado de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)); **(1)** cocultivo entre *C. albicans* 10231 y *H. pylori* J99 **(2)** cocultivo *C. albicans* 10231 y *H. pylori* J99 tras exposición por clotrimazol a 1µg/ml

Evaluación de la viabilidad



Fotografía 9. *C. albicans* y *H. pylori* teñidas con el kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD de color verde que nos indica que las células están vivas.



Fotografía 10. Capturas de pantalla cada 1 segundo de video donde se encuentra *C. albicans* portando en su vacuola a *H. pylori*, demuestra el cambio de posición de J99.

Dirección web del video que muestra la fotografía 10.

<https://youtube.com/shorts/3EisQyGJ9LE?feature=share>

https://youtu.be/owcbyfB_D9o

CMI



Fotografía 11. Método de las diluciones dobles seriadas aditivas, 200 μ l de solución antifúngicos más 200 μ l de inóculo de levaduras. Se realizó lectura espectrofotométrica a las 48h de cultivo en condiciones de aerobiosis.

Tabla 1. Puntos de Corte Según el CLSI M27-A3.

Antifúngico	CMI (μg/ml)	Interpretación
Fluconazol	0,124	Sensible
Ketoconazol	0,08	Sensible
Clotrimazol	0,06	Sensible

CMI expresada en μ g/ml

Ensayo a Cocultivo *C. albicans*-*H. pylori* tras exposición por antifúngicos

Tabla 2. placas well con suspensión de cocultivo expuestas a sustancias antifúngicas.

Vista macro

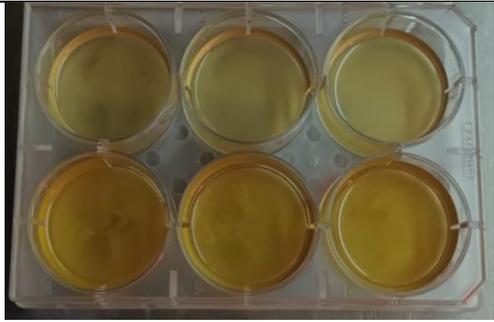
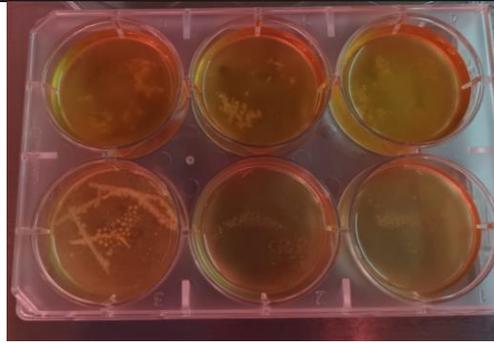
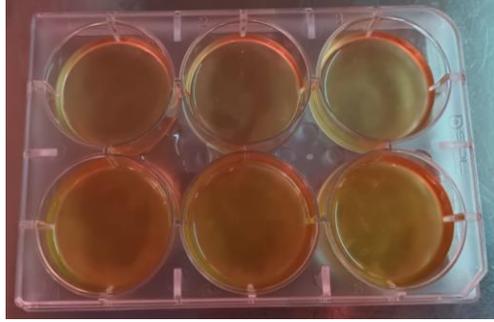
Fluconazol		Exposición al antifúngico del cocultivo 10231 y J99 a las 72h de incubación en microaerobiosis.
clotrimazol		Exposición al antifúngico del cocultivo 10231 y J99 a las 72h de incubación en microaerobiosis .
Ketoconazol		Exposición al antifúngico del cocultivo entre 10231 y J99 a las 72h de incubación en microaerobiosis.

Tabla 3. Tinción de Gram a cultivos puros, cocultivo y cocultivos expuesto a sustancias antifúngicas vista a 100X con aceite de inmersión.

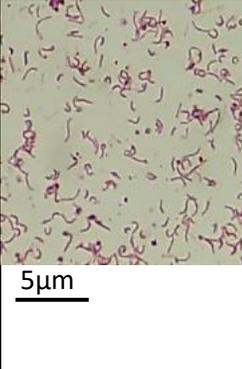
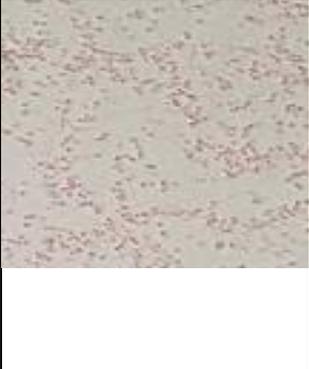
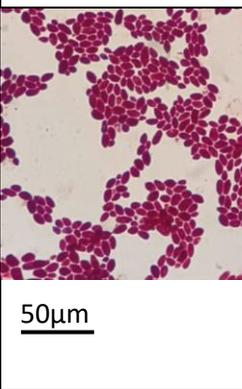
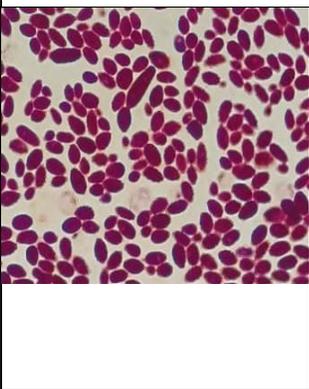
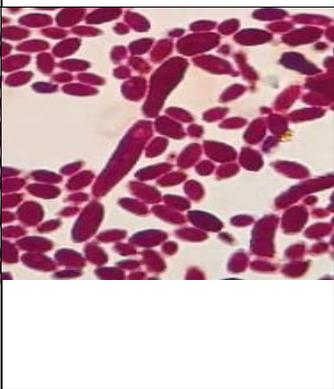
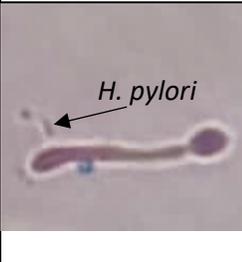
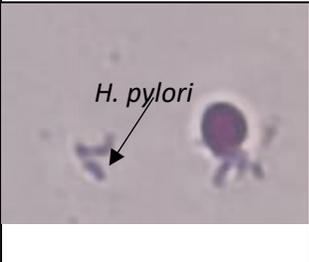
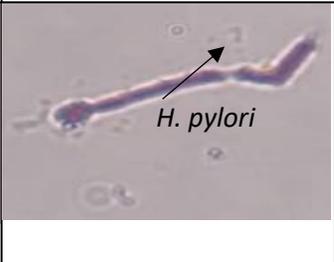
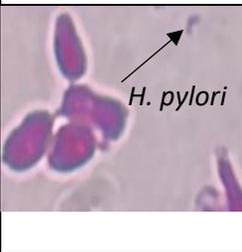
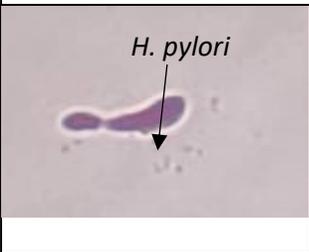
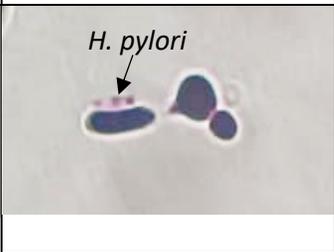
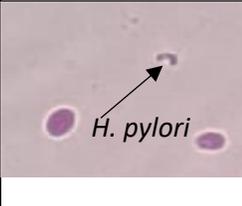
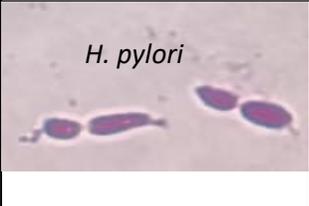
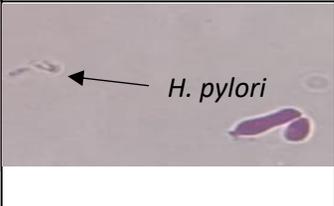
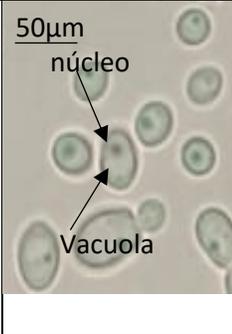
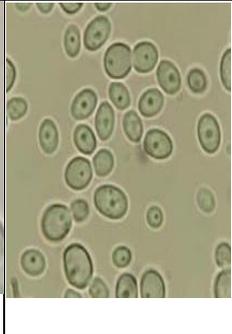
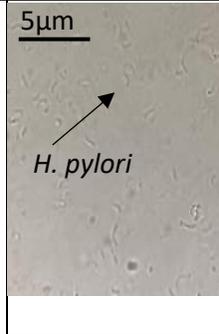
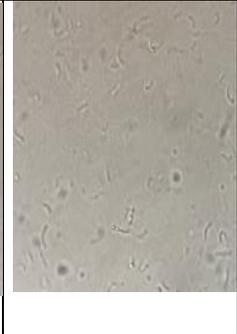
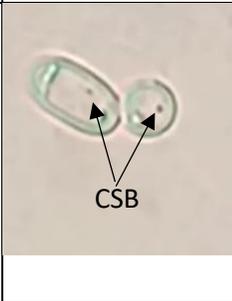
<p>Tincion de Gram <i>H. pylori</i> Control (+)</p>			
<p>Tincion de Gram <i>C. albicans</i> Control (-)</p>			
<p>Egreso por fluconazol</p>			
<p>Egreso por ketoconazol</p>			
<p>Egreso por clotrimazol</p>			

Tabla 4. Examen en fresco a controles puros, cocultivo y cocultivo expuesto a antifúngico visto a 100X con aceite de inmersión

<p><i>C. albicans</i> (1,2) <i>H. pylori</i> (3,4)</p>	<p>50µm núcleo Vacuola</p> 		<p>5µm <i>H. pylori</i></p> 	
<p><i>C. albicans</i> con <i>H. pylori</i></p>	<p>CSB</p> 	<p>CSB</p> 	<p>CSB</p> 	<p>CSB</p> 
<p>Cocultivo expuesto a fluconazol</p>				
<p>Cocultivo expuesto a ketoconazol</p>				

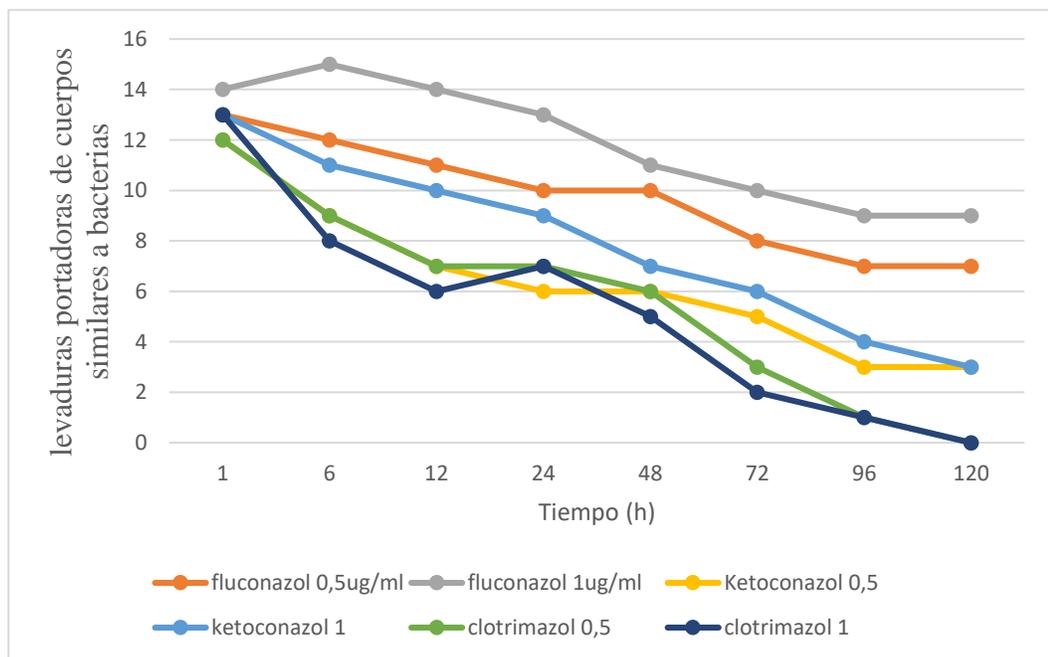


Figura 8. Curva de visualización de levaduras portadoras de cuerpos similares a bacterias en su vacuola expuesta a concentraciones de 0,5 μ g/ml y 1 μ g/ml de antifúngicos: fluconazol, ketoconazol y clotrimazol.

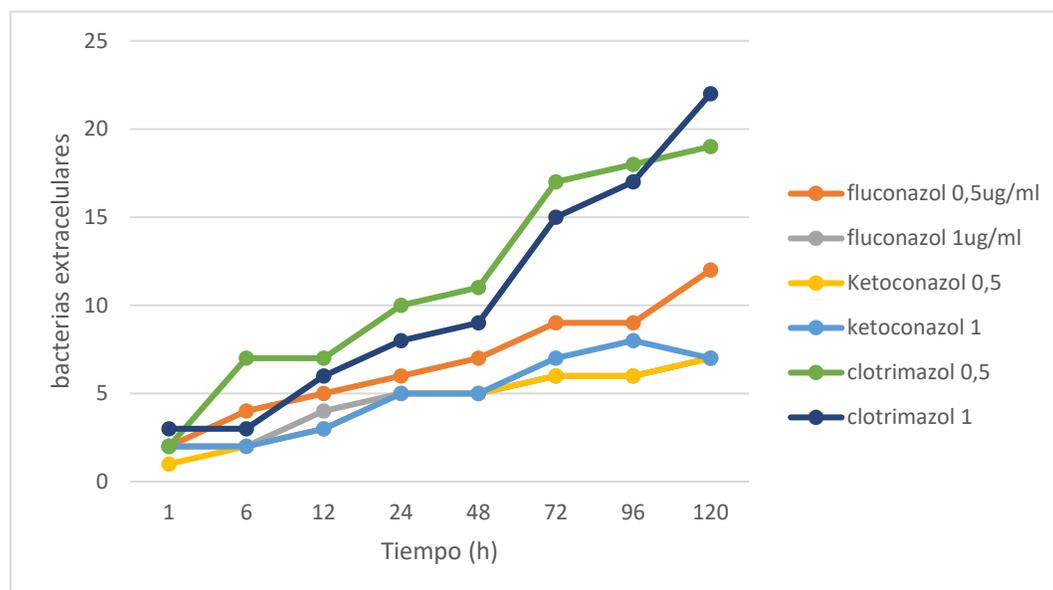
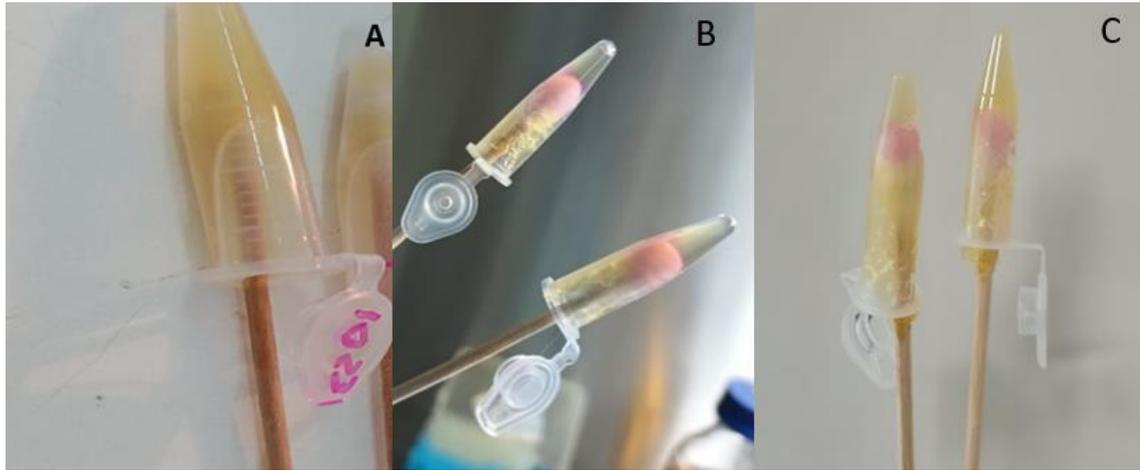


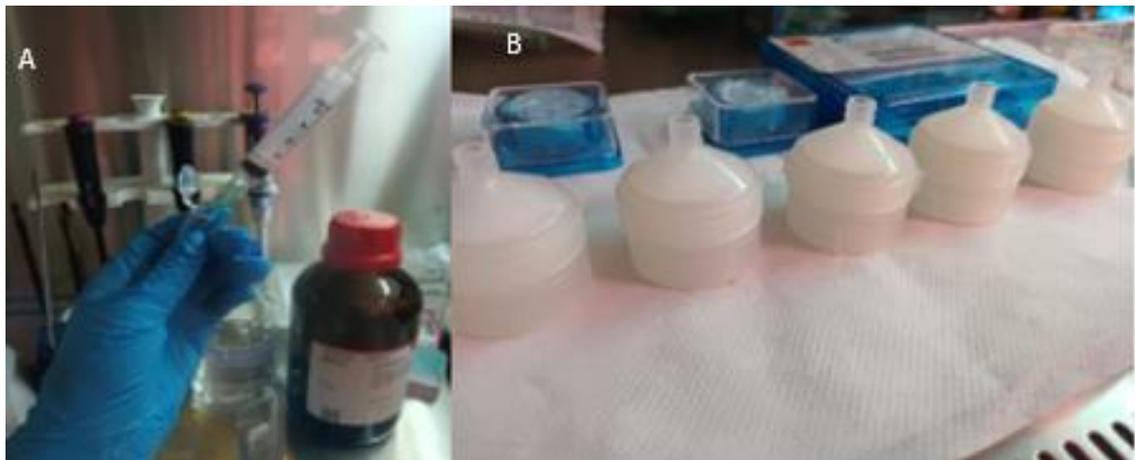
Figura 9. Curva de visualización de bacterias extracelulares egresadas de levaduras a concentraciones de 0,5 μ g/ml y 1 μ g/ml de antifúngicos: fluconazol, ketoconazol y clotrimazol.

Tiempo (h)	Bacterias Intracelulares		Bacterias Extracelulares		Valor p
	Fluconazol 1 μ g/ml	Clotrimazol 1 μ g/ml	Fluconazol 1 μ g/ml	Clotrimazol 1 μ g/ml	
1	14	13	2	3	0,626354361
6	15	11	2	3	0,466595989
12	14	6	4	6	0,113846298
24	13	7	5	8	0,134648349
48	11	5	5	9	0,070382582
72	10	2	6	15	0,002462039
96	9	1	6	17	0,00070234
120	9	0	7	22	5,65292E-05

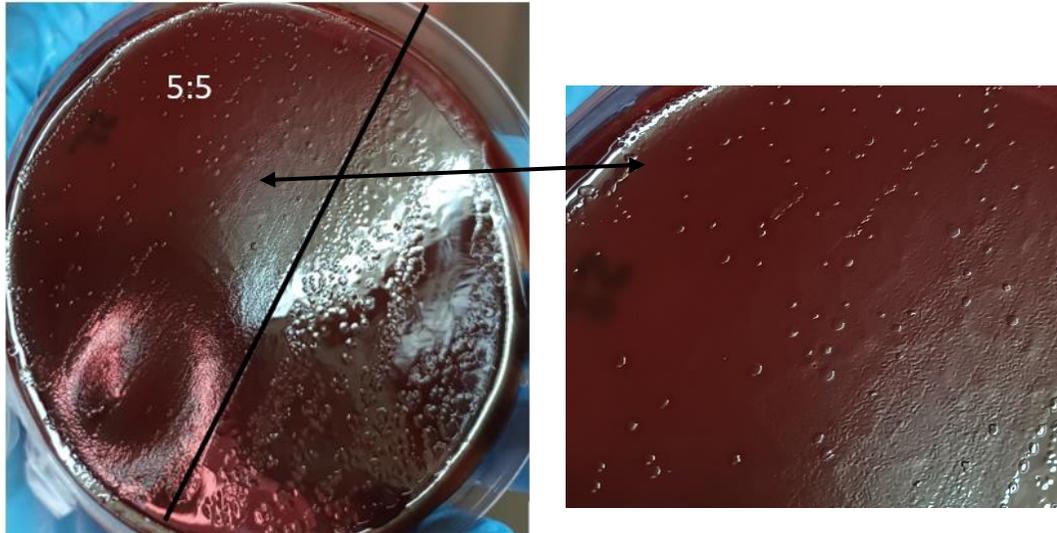
Tabla 5. Cantidad de bacterias intracelulares y extracelulares provenientes de levaduras expuesta a distintas concentraciones de antifúngicos (0,5 μ g/ml y 1 μ g/ml) de las cuales se calculó el valor p por cada tiempo (h) transcurrido.



Fotografía 12. Test de ureasa. **A** test de ureasa negativo en presencia de *C. albicans* 10231, **(B)** Test de ureasa positivo para *H. pylori* J99, **(C)** Test de ureasa positivo tras egreso de *H. pylori* J99 por la exposición a antifungicos después de 72 h de incubación.



Fotografía 13. Filtración de *H. pylori* tras su egreso de *C. albicans*. **(A)** la suspensión con bacterias egresadas se extrajo con jeringa estéril. **(B)** la suspensión se filtró con papel filtro de 0,8µm con adaptadores reutilizables, una vez ocupados se dejan sumergidos en alcohol 70° para desinfectar.



Fotografía 14. Crecimiento de colonias de *H. pylori* J99 a una dilución 1:1 (5ml de la suspensión egresada, 5ml de caldo brucella).



Fotografía 15. Test Ureasa positivo a suspensión filtrada con *H. pylori*



Fotografía 16. Tinción de Gram a suspensión de egreso de *H. pylori* vista a 100x con aceite de inmersión. Flecha indicada presencia de *H. pylori*.

Capítulo 4. Discusión

El cultivo de *C. albicans* es sencillo, a las 24h presenta un crecimiento suficiente para comenzar a hacer exámenes, por lo mismo, se deben hacer traspaso periódicamente para no estresar a las levaduras e influir en los resultados experimentales. El medio de cultivo cromogénico CHROMagar es muy efectivo para el reconocimiento de la especie *C. albicans* la que al ser sembrado presenta una coloración verde. El cultivo de *H. pylori* es complejo ya que su medio de siembra debe ser siempre suplementado con suero fetal bovino o equino al 7% o con sangre al 5%, además, resembrar sus colonias cada 72h antes de volverse cocoides. Con respecto al cultivo entre *C. albicans* portando a *H. pylori* en su vacuola ocupa el mismo método de siembra que cuando se ocupa para controles puros de levaduras. Es interesante señalar que placas en medio Sabouraud que se sembró colonias de cocultivos de levaduras y bacterias intracelulares, entre mayor tiempo transcurra las placas incubando en microaerobiosis, se registró un mayor porcentaje de levaduras portadoras de cuerpos bacterianos. Esto nos hace preguntarnos, acaso con el paso de los días la disminución de nutrientes potencia la interacción bacteria levadura o es que la bacteria dentro de levaduras es capaz de reproducirse y

emigrar a otras levaduras. O bien, las bacterias aprovechan la diploidía que presenta la levadura para reproducirse y propagarse en el ambiente que lo habitan. La placa seleccionada que presentó mayor porcentaje de levaduras portadoras de cuerpos similares a bacteria estuvo sembrada en microaerobiosis por 6 días, y se revisaron placas con crecimiento a las 24h, 48h, 72h, 96, 120h. Es importante destacar que el cocultivo se debe mantener en condiciones de microaerobiosis a pesar de que la bacteria se encuentre dentro de la levadura y que las levaduras necesiten condiciones de aerobiosis, es más perjudicial el estrés a *H. pylori*, ya que un ambiente así la estresaría por el alto nivel de oxígeno, en cambio *Candida* presenta crecimiento en placas en ambas condiciones de crecimiento, microaerobiosis y aerobiosis. Esto es importante de manejar para no alterar los parámetros de estrés de los microorganismos y generar cambios en su fisiología los que podrían alterar la veracidad de nuestros resultados y posterior análisis.

La técnica FISH es un ensayo que detecta y localiza secuencias de ADN específica en un cromosoma. (Cerqueira *et al.*, 2011) En esta técnica, el conjunto total de cromosomas de *H. pylori* se fija a un portaobjetos de vidrio y luego se expone a una “sonda”, una pequeña cantidad de ADN purificado marcado con fluorocromo (Rodriguez Martinez, R., Suescun Otero, G. 2013),

y que emite fluorescencia lo que permitió detectar fácilmente la posición de *H. pylori* mediante un microscopio de epifluorescencia. Esto ayuda enormemente a la visualización del fenómeno interacción bacteria-levadura, ya que *H. pylori* es una bacteria muy pequeña ($0,45\mu\text{m}$) por lo que no es sencillo diferenciarla con los demás organelos de la levadura cuando la habita al interior de su vacuola. Además, cuando se realizan los ensayos para que ocurra el cocultivo entre estos microorganismos y la bacteria emigre hacia la levadura, tan solo ocurre que alrededor del 30% de las levaduras son portadoras de *H. pylori* en su interior, por lo tanto, es de suma importancia identificar de forma significativa el fenómeno. Se sugiere que FISH es un examen altamente específico en conjunto con la PCR para detectar la interacción bacteria-levadura en alimentos de uso cotidiano humano que contengan levaduras de forma natural, alimentos que se ingieran con abundancia tales como, pan, carnes, bebidas alcohólicas, jugos frutales, salsa de tomates, productos lácteos. Ya que donde se ha registro esta coexistencia en flores y frutos, miel, (Siavioshi F. Siavoshi, 2018). Donde la incidencia de *H. pylori* en alimentos no está totalmente aclarada, considerando su alta incidencia de la infección por *H. pylori* en la sociedad humana. Donde la

bacteria puede sobrevivir y propagarse mediante levaduras, como lo es *C. albicans* (Hiengrach *et al.*, 2022).

El kit de citotoxicidad/viabilidad LIVE/DEAD nos arrojó resultados con una coloración verde total de las colonias de cocultivo entre *C. albicans* y *H. pylori*, además, se registró en imágenes y video un movimiento bacteriano rápido de *H. pylori* dentro de la vacuola de *C. albicans* la cual fue también de coloración verde. Con este ensayo se pudo iniciar la exposición a antifúngicos.

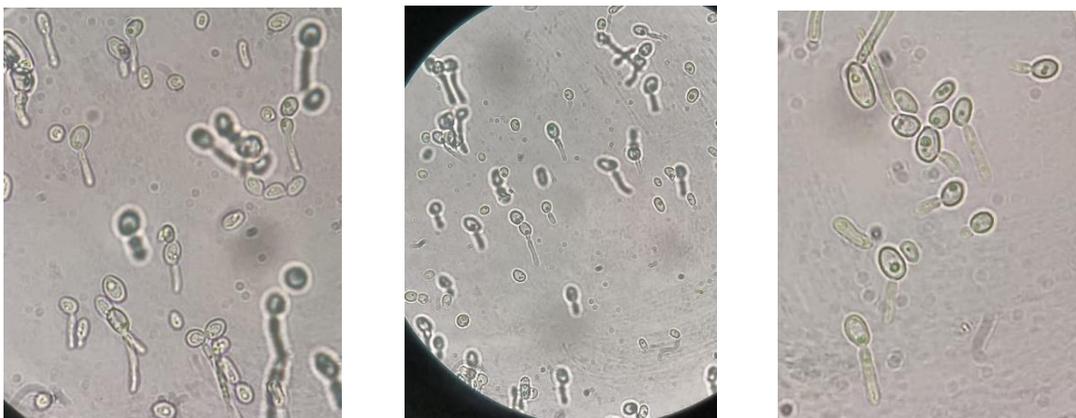
La preparación de antifúngicos a las concentraciones subletales que se deseó llegar generó mayor atención al momento de calcular su peso, ya que el gramaje era muy pequeño, lo que llevó a preparar una solución stock 1 mil veces más concentrada, a una solución 2 que bajó a ser 100 veces concentrada, la cual, de ella, se seleccionó el volumen exacto para cuando sea incorporada a la suspensión de cocultivo entre bacterias y levaduras se cumpla la concentración deseada a 0,5µg/ml y 1µg/ml. Según las recomendaciones del documento (CLSI, M27-A3, M38A y M44-A) que se siguió para la administración de antifúngicos, no es necesario autoclavar las soluciones madres antifúngicas a ensayar, lo que sí, con antifúngicos

insolubles en agua fue necesario filtrar la solución con poros de $0,22\mu\text{m}$. El antifúngico insoluble en agua, se diluyó en DMSO, esta sustancia es sensible a la luz visible, por lo que en el experimento se manipuló los tubos de ensayo y Falcón envueltos en papel aluminio para impedir el paso de la luz expuesta al trabajar dentro de un gabinete de bioseguridad.

Los cálculos de la CMI fueron aplicados según los criterios del CLSI, el cual estableció diferentes categorías, donde resultó los tres antifúngicos en la categoría de sensible, lo cual no lleva implícito el éxito terapéutico. La lectura espectrofotométrica se realizó a las 48h. el método de macro dilución se utiliza bastante poco, pero resulta útil cuando se requiere un resultado rápido. También es útil en aquellas cepas de *C. albicans* en las que se duda en establecer la CMI por el método de microdilución, debido al crecimiento en las concentraciones superiores a la CMI (trailing growth).(Métodos estandarizados CLSI, M27). Con respecto a la exposición por fluconazol, el 100% fue sensible al fluconazol donde la CMI se registró a una concentración de $0,12\mu\text{g/ml}$, en ketoconazol el 100% fue sensible, el cual registró una CMI a la concentración 0,03 al igual que en el clotrimazol, este último también presentó 100% en categoría sensible.

Una vez transcurrido el ensayo de cocultivo entre la bacteria y levadura, se decide realizar el ensayo de la PCR, la cual tiene como objetivo confirmar la presencia de los microorganismos con los cuales se trabajó, *C. albicans* y *H. pylori*. Como la bacteria posee condiciones estrictas de cultivo es muy fácil que su cultivo se contamine con cualesquiera microorganismos oportunista del ambiente. Por lo tanto, fue importante como ensayo de control.

Cuando se registró las condiciones de cocultivo entre bacterias y levaduras tras la exposición a las 48h expuesta a fluconazol, se observaron levaduras con crecimiento inicial de hifas, esto se percibió por todo el campo objetivo, mediante la observación por microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión



Fotografía 17. *C. albicans* expuesta a fluconazol al 1µg/ml a las 72h de incubación

La producción de hifas se percibió en colonias expuestas al fluconazol. No se notó de forma significativa la aparición de hifas en colonias de levaduras expuestas a ketoconazol y clotrimazol. Con esto las levaduras con fluconazol persistían en tener la mayor cantidad de levaduras en el tiempo vista por campo mediante la observación por microscopio óptico. La resistencia de *Candida* al fluconazol no es prevalente, según la literatura mundial, existe un grupo de pacientes con patologías y condiciones predisponentes que deben ser de especial atención como aquellos con patologías neoplásicas de tipo hematológico (Gómez CH, 2010). Durante la exposición por ketoconazol, se percibió una reducción de hifas en las levaduras, y al transcurso de los días las levaduras se volvían cada vez más pequeñas con respecto a su tamaño en los controles sin exposición antifúngica, desde las 72h a las 120h, el cocultivo no presentó mayores cambios en el ingreso y egreso de *H. pylori*. Con respecto al clotrimazol, se notó una reducción considerable en el tamaño y cantidad de las levaduras vista por campo mediante la observación por microscopía óptica, las que no presentaron hifas. A las 120h no se presentaron levaduras portadoras de cuerpos bacterianos y se registró la mayor cantidad de *H. pylori* egresadas, las que presentaron el movimiento bacteriano característico de *H. pylori* que reveló el examen en fresco visto

por microscopia electrónica. En general, se han desarrollado pocas resistencias al clotrimazol. Este fármaco es eficaz frente a una amplia gama de microorganismos entre ellos que se incluyen *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cephalosporium*, *Cryptococcus*, *Epidermophyton rubrum*, y *T. mentagrophytes* (Vademecum IQB, 2009). El Clotrimazol al comportarse como un imidazol, además actúa, específicamente aumentando la porosidad de la membrana plasmática de esta levadura, pero las concentraciones específicas para ese fin quizá se logren sólo con el uso local (Brunton *et al.*, 2007).

La persistencia de cocultivos entre microorganismos patógenos como la interacción entre *C. albicans*-*H. pylori* es una condición importante para considerar, pues se debería tener en cuenta ante un diagnóstico de tratamiento por antifúngicos para pacientes infectados crónicamente con *H. pylori*, para evitar administrar cierto antifúngico que potencia la interacción *C. albicans*-*H. pylori*. En los resultados se observó que en presencia de fluconazol persistió el cocultivo entre *C. albicans* y *H. pylori* al igual que en las hifas de las levaduras. Por otra parte, en presencia de clotrimazol a los 5 días se muestra una disminución total levaduras portadoras de cuerpos similares a bacteria, lo que se percibió solamente *H. pylori* de forma extracelular. Esto

ayuda a aclarar un escenario de persistencia por infección por estos dos microorganismos. Resulta relevante para considerarlo en nuevos tratamientos de erradicación por *H. pylori*.

La morfología de *C. albicans* tabla 4, (1-2) vista mediante examen en fresco muestra su contrastante pared celular, un círculo denso pequeño de coloración oscura que representa el núcleo de la levadura y un compartimiento ovalado que corresponde a la vacuola, la que presenta un color claro en comparación al citoplasma de la levadura. Cuando *C. albicans* se encuentra invadida dentro de su vacuola por *H. pylori*, la vacuola aumenta de tamaño y ocupa un porcentaje significativo del total del espacio citoplasmático. Cuando se expuso a los 3 antifúngicos, en las levaduras se dejó de visualizar el núcleo y su vacuola. El espacio citoplasmático se mostró indefinido, turbio, a simple vista se podría considerar un estrés para la levadura ya que la apariencia interna cambió drásticamente. Aunque en presencia de clotrimazol esto no fue total, ya que se diferenció el núcleo del resto del material citoplasmático en algunas levaduras. Con respecto a su pared celular disminuyó su grosor de las levaduras expuesta a los 3 antifúngicos.

La figura 8. Muestra la curva de visualización de levaduras portadoras de cuerpos similares a bacterias desde el tiempo 1h a 120h, donde se destacó que colonias expuestas a fluconazol a $1\mu\text{g/ml}$ presentó mayor cantidad de levaduras portadoras de cuerpos similares a bacterias (CSB), y la cantidad descendió paulatinamente la cual no decayó a cero como lo fue en colonias expuesta a clotrimazol a $1\mu\text{g/ml}$ que no se observó levaduras portadoras de CSB a las 120h. Se seleccionó la curva que presentó mayor y menor cantidad de levaduras portadoras de CSB en el tiempo para realizar la prueba de Chi-cuadrado. En la figura 9 se ilustró la curva de visualización de bacterias extracelulares egresada desde las levaduras, la curva que presentó un mayor ascenso con respecto al número de bacterias egresadas correspondió a la exposición por clotrimazol a $1\mu\text{g/ml}$, la que justamente tiene relación con la figura anterior, ya que fueron las mismas condiciones que provocó un menor número de colonias de levaduras portadoras de CSB.

Se realizó la prueba de Chi-cuadrado para interpretar la relación entre dos variables categóricas, bacterias intracelulares (levaduras portadoras de CSB) y de bacterias extracelulares, con respecto a dos tipos de antifúngicos, fluconazol al $1\mu\text{g/ml}$ y clotrimazol al $1\mu\text{g/ml}$, donde se calculó mediante los datos observados los datos esperados, la que arrojó un valor p significativo

menor a 0,05 a las 72h, 96h y 120h. Las variables dejaron de ser independientes, creemos que el antifúngico está vinculado con el lugar donde se encuentra la bacteria, justamente se correlaciona con el comportamiento de las curvas en los últimos 3 puntos de tiempo de la figura 8 y 9, donde hay la mayor distancia entre los números de ambos antifúngicos con respecto a la media. Desde la hora 1 hasta las 48h el valor p es mayor que 0,05 por lo que las variables son independientes, es decir no están vinculadas entre sí, por lo tanto, no hay una preferencia diferente entre los antifúngicos, fueron solo diferencias aleatorias, mismas que se esperan al recopilar datos.

El test ureasa se realizó a las colonias de cocultivo *C. albicans-H. pylori* luego de que se expuso a concentraciones subletales de antifúngicos, se sumergió una tórula estéril a la suspensión del ensayo y se llevó al tubo eppendorf en el medio con urea a una incubadora por 24h a 37°C, el marcaje no fue inmediato ya que la carga bacteriana de *H. pylori* fue baja.

La filtración se realizó una vez confirmado el egreso de *H. pylori* mediante exámenes en fresco visto por microscopio óptico. La suspensión se tomó con una jeringa estéril la que luego se retiró la aguja y se fijó al filtro desechable con papel filtro de 0,8µm, lo filtrado se pasó a un tubo falcón nuevo, los que

se diluyeron con caldo brucella a distintas razones para disminuir la concentración de levaduras por ml, de esa forma menos levaduras quedaron atrapadas en el papel filtro obstaculizando el paso de *H. pylori* por los poros. La suspensión filtrada se dejó incubando por 5 días en incubadora de microaerobiosis a 37°C. A las 120h con la ayuda de un asa se sembró las colonias filtradas en placas con medio agar columbia suplementado con sangre humana al 5%. Se dejó incubando por 3 días. 1 de 6 placas mostró crecimiento de colonias similares a *H. pylori*, se realizó tinción de Gram, Test ureasa y examen en fresco. Las pruebas mostraron la presencia de *H. pylori*. En la tinción de Gram y examen en fresco se visualizaron bacterias alargadas y rectas de movimiento bacteriano rápido. Lo cual, no se asegura que solo haya crecido *H. pylori* en la placa Petri. No podemos afirmar el origen de la posible contaminación, ya que pudo ser producto de los traspasos que requiere *C. albicans* a nuevas placas con medio Saubouraud, o bien por una incorrecta manipulación del experimento, de igual forma, consideramos este resultado, ya que en otras ocasiones cuando se contaminó por completo el ensayo, los microorganismos fueron notoriamente superior en número a las colonias de *H. pylori*. Se colonizó por completo el medio volviéndose un desafío contar el total de bacterias vista por campo de observación a 100X.

Conclusiones

Se registró egreso de *H. pylori* en concentraciones subletales de antifúngicos fluconazol, ketoconazol y clotrimazol, la concentración que mayor egreso generó fue a 1µg/ml de clotrimazol.

La exposición a concentraciones subletales de antifúngicos para *C. albicans* con *H. pylori* en su vacuola no provocó el egreso de todas las *H. pylori* de su interior, en presencia de fluconazol a 1µg/ml fue donde se mantuvo en mayor cantidad la interacción *C. albicans*- *H. pylori*.

La filtración de *H. pylori* fue lo más difícil en llevar a cabo, ya que la cantidad de *H. pylori* egresadas eran muy pequeñas las cuales se perdían en los filtrados, fue importante, mantener a las colonias alejadas del estrés por oxígeno, nutricional, y dejarlas incubando en suspensión líquida fue clave antes de llevar a las colonias a incubación en placas de agar.

Referencias

Achtman M, Azuma T, Berg DE, Ito Y, Morelli G, Pan ZJ, Suerbaum S, Thompson SA, van der Ende A, van Doorn LJ. Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol Microbiol.* 1999;32(3):459–70

Amieva MR, El-Omar EM. Host bacterial interactions infection. *Gastroenterology.* 2008; 134: 306 – 23

Armstrong D. *Helicobacter pylori* infection and dyspepsia. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1996;215:38–47
Ford AC, Marwaha A, Sood R, Moayyedi P. Global prevalence of, and risk factors for, uninvestigated dyspepsia: a meta-analysis. *Gut.* 2014. doi:10.1136/gutjnl-2014-307843.

Asaka M, Kato M, Kudo M, Katagiri M, Nishikawa K, Yoshida J, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* infection, atrophic gastritis and gastric carcinoma in a Japanese population. *Eur J Gastroen Hepat.* 1995;7 Suppl 1:S7–10.

Azevedo N, Huntington J, Goodman K. (2009) The epidemiology of *Helicobacter pylori* and public health implications. *Helicobac*, 13 (suppl.1): 1-7
Jones N, Chiba N, Fallone C, Thompson A, Hunt R, Jacobson K, Goodman On Behalf Of Canadian *Helicobacter* Study Group Participants K. (2012) *Helicobacter pylori* in First Nations and recent immigrant populations in Canada. *Can J Gastroenterol.*, 26(2): 97-103

Bizzozero, G. (1893). Ueber die schlauchformigen drüsen des magendarmkanals und die beziehungen ihres epithels zu dem oberflächenepithel der schleimhaut. *Arch Mikr Anat* 1893; 42: 82. *Helicobacter pylori*. *Am*, 491-5.

Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Undécima edición. Editorial Mc Graw Hill. EUA. 2007

Calvet X, Ramirez- Lazaro Mj, Lehours P, and megraud F. (2013) Diagnosis and Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 18 (suppl. 1): 5-11. DOI 10.1111/hel. 12071

Castillo-Rojas G, Cerbon MA, Lopez-Vidal Y. Presence of *Helicobacter pylori* in a Mexican pre-Columbian mummy. *BMC Microbiol.* 2008;8. doi:10.1186/1471-2180-8-119

Cerqueira L, Fernandes RM, Ferreira RM, Carneiro F, Dinis-Ribeiro M, Figueiredo C, Keevil CW, Azevedo NF, Vieira MJ. PNA-FISH as a new diagnostic method for the determination of clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori*. *BMC Microbiol* 2011; 11:101

Chen J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, et al. Functional gastroduodenal disorders. *Gastroenterology.* 2006;130(5):1466 doi:10.1053/j.gastro.2005.11.059. S0016-5085(06)00508-7 [pii].

Correa P, Piazuelo MB. Evolutionary history of the *Helicobacter pylori* genome: implications for gastric carcinogenesis. *Gut Liver.* 2012;6(1):21–8.

Suzuki R, Shiota S, Yamaoka Y. Molecular epidemiology, population genetics, and pathogenic role of *Helicobacter pylori*. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):203–13.

Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rappuoli R. Helicobacter pylori virulence and genetic geography. *Science*. 1999;284(5418):1328–33.

De Cooman L, Flahou B, Houf K, Smet A, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F. Survival of Helicobacter suis bacteria in retail pig meat. *Int J Food Microbiol*. 2013;166(1):164–7. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.020.

Eppinger M, Baar C, Linz B, Raddatz G, Lanz C, Keller H, et al. Who ate whom? Adaptive Helicobacter genomic changes that accompanied a host jump from early humans to large felines. *PLOS Genet*. 2006;2(7):1097–110. doi:ARTN e120 DOI 10.1371/journal.pgen.0020120

Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M et al. Traces of human migrations in Helicobacter pylori populations. *Science*. 2003;299(5612):1582–5. doi:10.1126/science.1080857.

Ferreccio C, Rollán A, Harris P, Serrano C, Gederlini A, et al. (2007) Gastric Cancer is related to early Helicobacter pylori infection in a high-prevalence

country. *Cancer Epidem. Biomar prev*; 16(4): 662-667. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0514

García A, Salas-Jara MJ, Herrera C, Gonzales C. (2014) Biofilm and *Helicobacter pylori*. From environment to human host. *World J Gastroenterol*; 20(19): 5632-5638. DOI: 10.3748/wjg.v20.i19.5632

Gatta L., Vakil N. and Vaira D. (2012) Treatment Of *Helicobacter pylori* in Latin America. *Lancet*; (379):

Ghose C, Perez-Perez GI, Dominguez-Bello MG, Pride DT, Bravi CM, Blaser MJ. East Asian genotypes of *Helicobacter pylori* strains in Amerindians provide evidence for its ancient human carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(23):15107–11. doi:10.1073/pnas. 242574599

Gómez C. *Candida* Yeast resistance to fluconazol. *Infect*. 2010 dec; 14(2):172-180.

Heise, K., Bertran, E., Andia, M. E., & Ferreccio, C. (2009). Incidence and survival of stomach cancer in a high-risk population of Chile. *World journal of gastroenterology: WJG*, 15(15), 1854.

Hiengrach, P.; Panpetch, W.; Chindamporn, A.; Leelahavanichkul, A. Helicobacter pylori, Protected from Antibiotics and Stresses Inside Candida albicans Vacuoles, Cause Gastritis in Mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 8568. <https://doi.org/10.3390/ijms23158568>

Jung SW, Sugimoto M, Graham DY, Yamaoka Y: homB status of Helicobacter pylori as a novel marker to distinguish gastric cancer from duodenal ulcer. *J Clin Microbiol.* 2009;47 (10):3241–5.

Kao, C. Y., Sheu, B. S., & Wu, J. J. (2016). *Helicobacter pylori* infection: An overview of bacterial virulence factors and pathogenesis. *Biomedical Journal*, 39(1), 14-23.

Kasai K, Kobayashi R. Stomach spirochetes occurring in mammals. *J Parasitol.* 1919;6:1–11

Kusters J., Van Vliet A., Kuipers E: (2006) Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews*; 19: 449-490

Levi S, Beardshall K, Haddad G, Playford R, Ghosh P, Calam J. *Campylobacter pylori* and duodenal ulcers: the gastrin link. *Lancet*. 1989;1:1167-8.

Li WH, Sadler LA. Low nucleotide diversity in man. *Genetics*. 1991;129(2):513-23.

Lichtenberger LM, Dial EJ, Romero JJ, Lechago J, Jarboe LA, Wolfe MM. Role of luminal ammonia in the development of gastropathy and hypergastrinemia in the rat. *Gastroenterology*. 1995;108:320-9

Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, et al. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*. 2007;445(7130):915-8

Liu J, He L, Haesebrouck F, Gong Y, Flahou B, Cao Q, Zhang J. Prevalence of coinfection with gastric Non-*Helicobacter pylori* *Helicobacter* (NHPH) species in *Helicobacter pylori* infected patients suffering from gastric disease in Beijing, China. *Helicobacter*. 2015;20:284–90. doi:10.1111/hel.12201

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases (PPID). Séptima Edición. Volúmenes 1 y 2. Philadelphia, PA. Churchill Livingstone: Elsevier; 2010. p. 4028. ISBN 978-0-443-06839-3. , 28(8), 1–. doi:10.1016/j.eimc.2010.07.006)

Marchildon, P.; Balaban, D. H.; Sue, M.; Charles, C.; Doobay, R.; Passaretti, N.; Peacock, J.; Marshall, B. J.; Peura, D. A. (1999). *Usefulness of serological IgG antibody determinations for confirming eradication of Helicobacter pylori infection. The American Journal of Gastroenterology*, 94(8), 2105–2108. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01285.x

Martinez A, Kawaguchi F, Madariaga J, Gonzales C, García A, Sanchez M. (1999) Estudio de infección por *H. pylori* en 200 pacientes de la octava región. *Gastroenterol Latinoam*; 10:316.

Memon AA, Hussein NR, Miendje Deyi VY, Burette A, Atherton JC. Vacuolating cytotoxin genotypes are strong markers of gastric cancer and duodenal ulcer-associated *Helicobacter pylori* strains: a matched case-control study. *J Clin Microbiol.* 2014;52:2984–9.

Montes Valles, M. (2016). *Helicobacter pylori* y Nutrición: actividad patogénica.

Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y, Windsor HM, Breurec S, Wu JY, Maady A, Bernhoft S, Thiberge JM, Phuanukoonnon S, et al. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science.* 2009;323(5913):527–30

Moodley Y, Linz B, Bond RP, Nieuwoudt M, Soodyall H, Schlebusch CM, Bernhoft S, Hale J, Suerbaum S, Mugisha L, et al. Age of the association between *Helicobacter pylori* and man. *PLoS Pathog.* 2012;8(5), e1002693

Moss S, Calam J. *Helicobacter pylori* and peptic ulcers: the present position. *Gut.* 1992;33:289–92.

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. N Engl J Med. 1991;325(16):1127–31. doi:10.1056/NEJM199110173251603.

Porras C, Nodora J, Sexton R, Ferreccio C, Jimenez S, Dominguez R.L, et al. (2013) Epidemiology of Helicobacter pylori infection in six Latin American countries (SWOG Trial S0701). Cancer cause control: CCC. DOI: 10.1007/s10552-012-0117-5

Rivas-Traverso, F., & Hernández, F. (2000). Helicobacter pylori: Factores de virulencia, patología y diagnóstico. *Revista Biomedica*, 11(3), 187-205.

Rodríguez Martínez, R., & Suescún Otero, G. (2013). Aplicaciones e inconvenientes de la técnica Hibridación in situ Fluorescente (FISH) en la identificación de microorganismos. *Revista Salud Uninorte*, 29(2), 327-340.

Sánchez-Alonzo, K; Parra-Sepúlveda C; Vergara, L; Bernasconi, H; and García-Cancino, A. 2020. Detection of Helicobacter pylori in oral yeasts

from students of a Chilean university. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 66 (11): 1509- 1514.

Siavoshi, Farideh; Sahraee, Marzieh; Ebrahimi, Hoda; Sarrafnejad, Abdolfatah; Saniee, Parastoo (2018). Natural fruits, flowers, honey, and honeybees harbor -positive yeasts. *Helicobacter*. doi:10.1111/hel.12471

Shiotani, A., Dore, M. P., & Graham, D. Y. (2016). Urea breath test and rapid urease test. *Helicobacter pylori*, 143-155. Csendes, A., & Figueroa, M. (2017). Situación del cáncer gástrico en el mundo y en Chile. *Revista chilena de cirugía*, 69(6), 502-507

Stolte M, Wellens E, Bethke B, Ritter M, Eidt H. *Helicobacter heilmannii* (formerly *Gastrospirillum hominis*) gastritis: an infection transmitted by animals? *Scand J Gastroenterol*. 1994;29:1061–4

Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002;347(15):1175–86

Suzuki, Hidekazu; Warren, Robin; Marshall, Barry (2016). *Helicobacter pylori* // *A Brief History of the Discovery of Helicobacter pylori.* , 10.1007/978-4-431-55705-0(Chapter 1), 3–15. doi:10.1007/978-4-431-55705-0_1

Tack J, Talley NJ, Camilleri M, Holtmann G, Hu P, Malagelada JR, et al. Functional gastro duodenal disorders. *Gastroenterology*. 2006;130(5):1466–79. doi:10.1053/j.gastro.2005.11. 059. S0016-5085(06)00508-7 [pii]

Telford JL, Ghiara P, Dell’Orco M, Comanducci M, Burroni D, Bugnoli M, et al. Gene structure of the *Helicobacter pylori* cytotoxin and evidence of its key role in gastric disease. *J Exp Med*. 1994;179:1653–8

Clotrimazol en Vademecum. Obtenido de INSTITUTO QUÍMICO BIOLÓGICO VADEMECUM

Van Doorn LJ, Figueiredo C, Megraud F, Pena S, Midolo P, Queiroz DM, et al. Geographic distribution of *vacA* allelic types of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 1999;116 (4):823–30.

Yamaoka Y, Orito E, Mizokami M, Gutierrez O, Saitou N, Kodama T, Osato MS, Kim JG, Ramirez FC, Mahachai V, et al. *Helicobacter pylori* in North and South America before Columbus. *FEBS Lett.* 2002;517(1-3):180-4

Anexo 1: Preparación de antifúngicos solubles en agua (fluconazol)

Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

Tabla 15a.1. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	nº 2
nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	nº 3
nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	nº 4
nº 4	160 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	nº 5
nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	nº 6
nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	nº 7
nº 7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	nº 8
nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	nº 9
nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	nº 10
nº 10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	nº 11

Observar que...

- Al terminar las diluciones todos los tubos contienen 1 ml, excepto el tubo nº 11 (2 ml). De este último se desechará 1 ml.
- En los tubos nº 2 al nº 11 la concentración del antifúngico es 10 veces superior a la concentración final deseada.

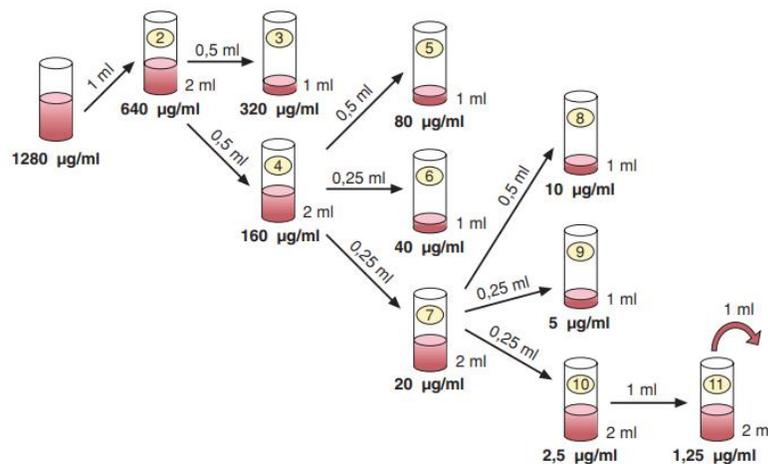


Figura 15a.1. Esquema para las diluciones de antifúngicos solubles en agua. Diluyente RPMI 1640.

Anexo 2: preparación de antifúngicos insolubles en agua (ketoconazol, clotrimazol)

Tabla 15a.2. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
nº 2	1600 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 µg/ml	nº 3
nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 µg/ml	nº 4
nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 µg/ml	nº 5
nº 5	200 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 µg/ml	nº 6
nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 µg/ml	nº 7
nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 µg/ml	nº 8
nº 8	25 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 µg/ml	nº 9
nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 µg/ml	nº 10
nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 µg/ml	nº 11

Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

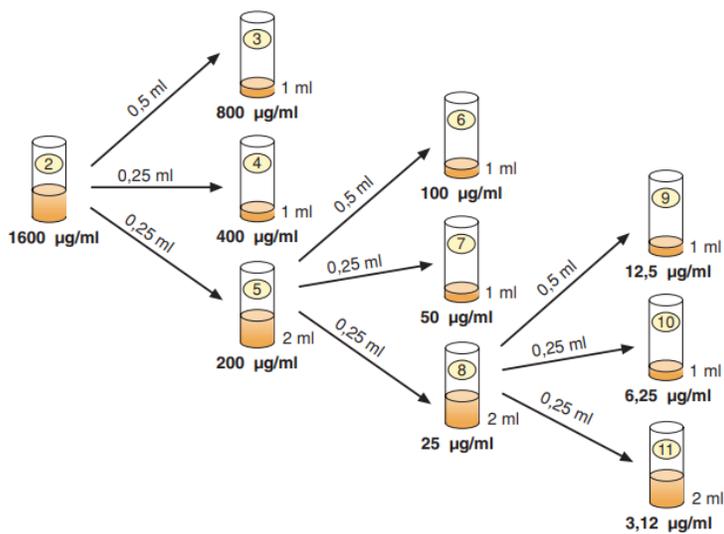


Figura 15a.3. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfóxido (DMSO).

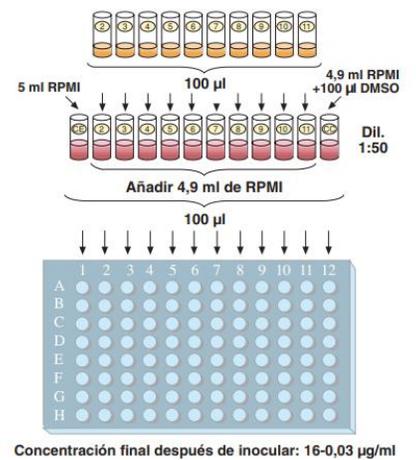


Figura 15a.4. Segundo paso de las diluciones de antifúngicos insolubles en agua (método de microdilución). Diluyente RPMI 1640.

Anexo 3: Preparación del inóculo de levaduras

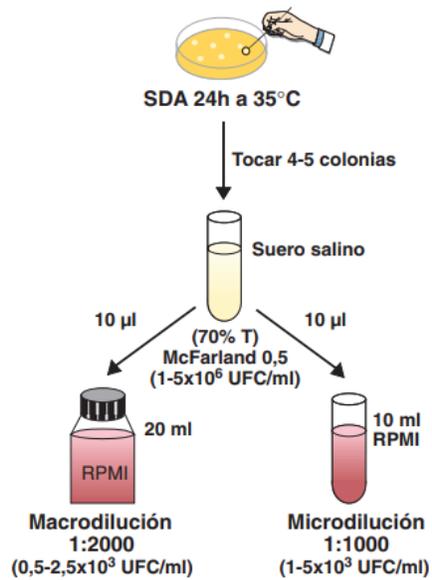


Figura 15a.5. Preparación del inóculo de levaduras.

Anexo 4: Video de la suspension filtrada con *H. pylori* tras exposicion por antifúngicos, Clotrimazol.

<https://youtube.com/shorts/lwEI5XQf-30?feature=share>



Anexo 5: Egreso de *H. pylori* desde *C. albicans* tras exposición por Clotrimazol

Dirección web: <https://youtu.be/HQRNxVuEQH0>



egreso de *H. pylori* desde *C. albicans* tras exposición por clotrimazol

Anexo 6: Desplazamiento de *H. pylori* en cocultivo con *C. albicans* expuestas a clotrimazol



Dirección web: <https://youtu.be/CVHhldtoAqs>

Anexo 7: *H. pylori*- *C. albicans*

Dirección web: <https://youtu.be/KhXEH91ZqZ8>

