



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas -Programa de Magister en Ciencias
Mención Microbiología

**Estudio de la formación de biopelículas por la cepa
Lactobacillus salivarius UCO_979C de aislamiento
gástrico y su influencia en la colonización de
Helicobacter pylori, en un modelo “*in vitro*” de células
AGS y Caco-2.**

Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Mención Microbiología

MARÍA JOSÉ SALAS JARA
CONCEPCIÓN-CHILE
2015

Profesor Guía: Apolinaria García Cancino
Dpto. de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa y microaerofila, capaz de colonizar el ambiente ácido del estómago humano en aproximadamente un 50% de la población mundial. La bacteria es transmitida dentro de las familias y la infección ocurre tempranamente en la infancia, siendo capaz de establecer una infección persistente durante toda la vida. Además, *H. pylori* es el principal agente etiológico de úlcera péptica, linfoma gástrico y adenocarcinoma gástrico, la segunda causa de muerte de cáncer en el mundo.

La resistencia antibiótica por su uso indiscriminado y los efectos adversos que producen los antibióticos, son las principales causas de las fallas en el tratamiento convencional contra *H. pylori*. Debido a esto, es que en el último tiempo se han buscado nuevos tratamientos, dentro de los cuales se encuentra el uso de bacterias probióticas, siendo el género *Lactobacillus* el más estudiado. Estas bacterias probióticas son capaces de afectar a *H. pylori* "in vitro", a través de la producción de ácido láctico, bacteriocinas e inhibición de adherencia de *H. pylori*. Por otro lado, en los últimos años se ha estudiado la capacidad de diversas cepas de *Lactobacillus* para formar biopelículas "in vitro" sobre superficie abióticas, propiedad que es considerada benéfica, ya que puede promover la colonización y mayor permanencia a lo largo del tiempo en la mucosa gastrointestinal del hospedero, impidiendo la colonización por bacterias patógenas. Sin embargo, esto aún no ha sido estudiado sobre modelos celulares. Por lo tanto, el objetivo de esta tesis es establecer la capacidad de la cepa de *Lactobacillus salivarius* UCO_979C de aislamiento gástrico, para formar biopelículas "in vitro" sobre superficies abióticas y sobre células AGS y Caco-2, y de inhibir la colonización de estas células por *H. pylori*. Para el estudio sobre superficie abiótica se utilizó vidrio y poliestireno, en tres medios de cultivo (MRS + 2% Glucosa, BHI + 2% Glucosa y DMEM) y 2 inóculos de las cepas de *Lactobacillus* ($1,5 \times 10^8$ UFC ml⁻¹ y $1,5 \times 10^9$ UFC ml⁻¹), midiendo una cinética de formación de la biopelícula (0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas) por espectrofotometría

utilizando el método de retención de cristal violeta. Para el estudio sobre los modelos celulares, se utilizaron las líneas celulares AGS y Caco-2, sobre las cuales se evaluó la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* para formar biopelículas utilizando distintos inóculos ($1,5 \times 10^8$ UFC ml⁻¹ y $1,5 \times 10^9$ UFC ml⁻¹), distintos tiempos (0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas) y visualizando la biopelícula por microscopía electrónica de barrido. Finalmente, se determinó la capacidad de estas biopelículas formadas sobre los modelos celulares para inhibir la colonización por *H. pylori* ATCC 43504, mediante la medición de actividad ureasa por espectrofotometría utilizando el reactivo urea-rojo fenol y visualizando *H. pylori* ATCC 43504 marcadas con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) por microscopía de fluorescencia, además de cuantificar la intensidad de fluorescencia utilizando un fluorímetro. En todos los ensayos se utilizó la cepa comercial *L. casei* Shirota, para compararla con la cepa aislada en nuestro laboratorio *L. salivarius* 979C. Fue posible determinar que ambas cepas son capaces de formar biopelículas tanto en una superficie abiótica como en modelos celulares. Por otro lado, las imágenes obtenidas por microscopio electrónico mostraron que ambas cepas estudiadas son capaces de formar una estructura de biopelícula sobre células AGS y Caco-2. Finalmente, se demostró que la cepa aislada en nuestro laboratorio *L. salivarius* 979C es capaz de inhibir significativamente la capacidad de adhesión de *H. pylori* ATCC 43504 a monocapas de células AGS y Caco-2 *in vitro*.