



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA INTERACCIÓN  
ENTRE *Candida albicans* ATCC 10231 Y *Helicobacter  
pylori* CEPAS J99, G27 Y SS1, EN LA MORFOLOGÍA DE  
LA LEVADURA Y EN LA VIABILIDAD INTRACELULAR  
DE *Helicobacter pylori***

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención  
Microbiología

FABIOLA LIZBETH SILVA MIERES  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2022

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

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Apolinaria García Cancino  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Miguel Martínez Poblete  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Ítalo Fernández Fonseca  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

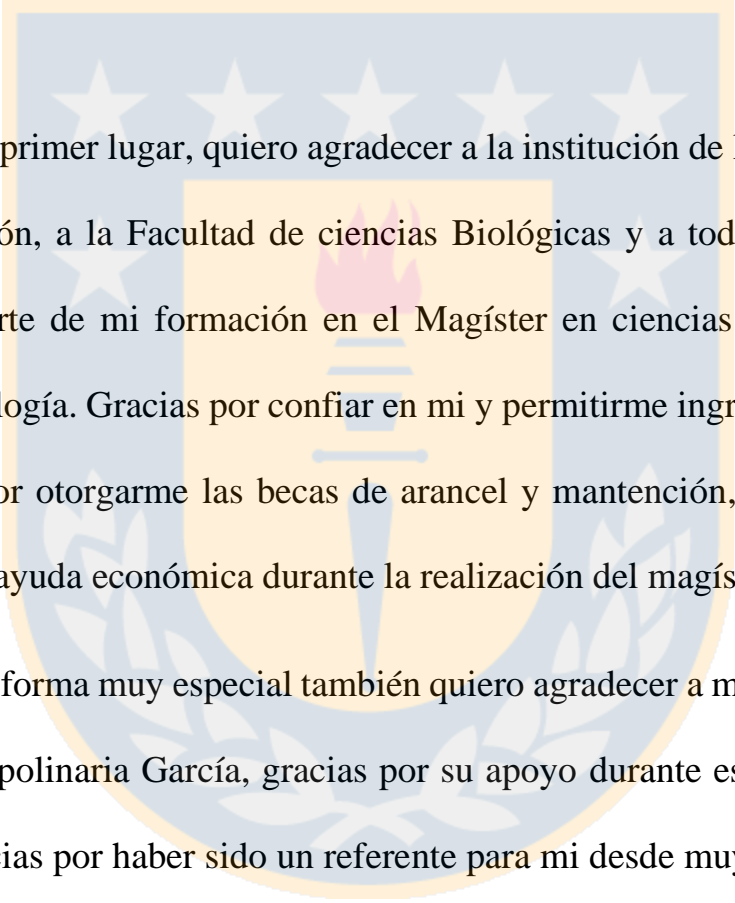
Dr. Patricio Godoy Martínez  
Facultad de Medicina  
Universidad Austral de Chile

Director de Programa

---

Dr. Gerardo González Rocha  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS



En primer lugar, quiero agradecer a la institución de la Universidad de Concepción, a la Facultad de ciencias Biológicas y a todo el claustro que formó parte de mi formación en el Magíster en ciencias con mención en Microbiología. Gracias por confiar en mi y permitirme ingresar al programa, gracias por otorgarme las becas de arancel y mantención, lo cuales fueron una gran ayuda económica durante la realización del magíster.

De forma muy especial también quiero agradecer a mi profesora tutora la Dra. Apolinaria García, gracias por su apoyo durante este periodo de mi vida, gracias por haber sido un referente para mi desde muy temprano en mi carrera en lo que respecta a hacer ciencia y gracias por ayudarme a encontrar lo que es para mi una pasión en la vida, el deseo de investigar y generar conocimiento en el área de la microbiología. Sin duda alguna no hubiese logrado terminar esta tesis sin su apoyo, confianza y la libertad que me dio

para crear este trabajo. También quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio por sus consejos y ayuda durante la realización de esta tesis.

Agradezco a mi familia por su compañía, a mi madre, a mi hermana, a mis abuelos y a mi pareja por estar ahí para mí, gracias por ser ese aliento que a veces escasea cuando la tarea se vuelve pesada, este logro es en gran parte gracias a lo que ustedes me han sabido entregar.

Gracias a todos, gracias a todas, gracias a las circunstancias, gracias a lo que pasó y a lo que no pasó es que hoy puedo decir lo logré.

*Cuando emprendas tu viaje a Itaca  
pide que el camino sea largo,  
lleno de aventuras, lleno de experiencias.  
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes  
ni al colérico Poseidón,  
seres tales jamás hallarás en tu camino,  
si tu pensar es elevado, si selecta  
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.  
(Itaca, Konstantino Kavafis)*

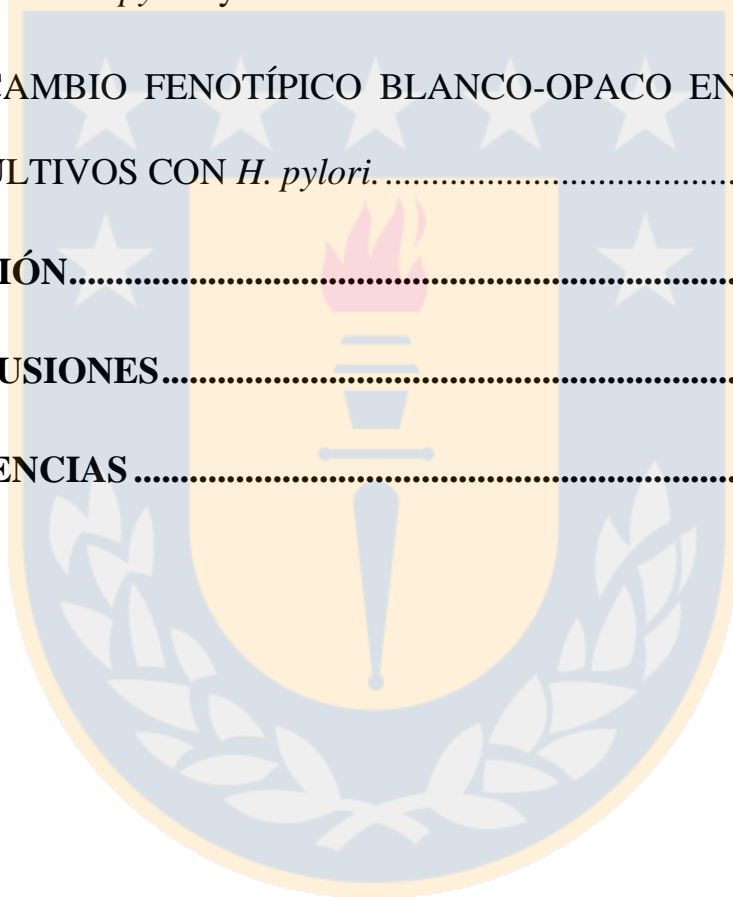
## TABLA DE CONTENIDO

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE ILUSTRACIONES</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>15</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
1.1 INTRODUCCIÓN.....	17
1.2 MORFOGÉNESIS EN <i>Candida albicans</i> .....	18
1.2.1 MORFOLOGÍA DE LEVADURAS .....	18
1.2.2 MORFOLOGÍA DE CLAMIDOSPORA .....	21
1.2.3 MORFOLOGÍA DE PSEUDOHIFA E HIFAS.....	22
1.3 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN <i>Candida albicans</i> E INTERACCIONES POLIMICROBIANAS.....	25

<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
2.1 HIPÓTESIS .....	34
2.2 OBJETIVO GENERAL .....	34
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3. MATERIALES Y METODOLOGÍA .....</b>	<b>35</b>
3.1 MATERIALES.....	35
3.1.1 CEPAS .....	35
3.1.2 REACTIVOS .....	36
3.1.3 MEDIOS DE CULTIVO .....	36
3.1.4 SOLUCIONES .....	36
3.1.5 MEDIOS DE CULTIVOS MODIFICADOS .....	37
3.2 METODOLOGÍA.....	38
3.2.1 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>H. pylori</i> .....	38
3.2.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE <i>C. albicans</i> .....	38
3.2.3 ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE <i>H. pylori</i> EN <i>C. albicans</i> .....	39

3.2.4	RECuento DE CUERPOS SIMILARES A BACTERIAS INTRA-LEVADURAS EN CO-CULTIVOS ENTRE <i>C. albicans</i> Y CEPAS DE <i>H. pylori</i> .....	39
3.2.5	DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE <i>H.</i> <i>pylori</i> AL INTERIOR DE <i>C. albicans</i> PORTADORA DE BACTERIAS .....	41
3.2.6	AMPLIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE <i>H. pylori</i> A PARTIR DEL ADN DE <i>C. albicans</i> PORTADORA DE BACTERIAS .....	41
3.2.7	ENSAYO DE FILAMENTACIÓN DE <i>C. albicans</i> EN CO- CULTIVOS CON <i>H. pylori</i> .....	44
3.2.8	DETECCIÓN DEL CAMBIO FENOTÍPICO BLANCO-OPACO EN <i>C. albicans</i> EN CO-CULTIVOS CON <i>H. pylori</i> .....	46
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
4.1.	CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS ENSAYADAS .....	48
4.2.	INTERNALIZACIÓN DE CEPAS DE <i>H. pylori</i> EN CÉLULAS DE <i>C. albicans</i> .....	50

4.2. VIABILIDAD Y DETECCIÓN DE CEPAS DE <i>H. pylori</i> EN CÉLULAS DE <i>C. albicans</i> .....	53
4.3. ENSAYO DE FILAMENTACIÓN EN CO-CULTIVOS ENTRE CEPAS DE <i>H. pylori</i> y <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	64
4.4. CAMBIO FENOTÍPICO BLANCO-OPACO EN <i>C. albicans</i> EN CO-CULTIVOS CON <i>H. pylori</i> .....	68
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>75</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>88</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>91</b>





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Partidores utilizados para detectar y genotipar <i>H. pylori</i> contenidos en <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	43
<b>Tabla 2.</b> Genotipificación de genes de <i>H. pylori</i> en levaduras portadoras de bacterias.....	63
<b>Tabla 3.</b> Frecuencia de cambio fenotípico Blanco-Opaco en co-cultivo entre <i>C. albicans</i> y cepas de <i>H. pylori</i> .....	71

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Figura 1.</b> Observación microscópica (tinción de Gram 100x) de las cepas de <i>H. pylori</i> y <i>C. albicans</i> utilizadas en este estudio.....	49
<b>Figura 2.</b> Internalización de cepas <i>H. pylori</i> en <i>C. albicans</i> .....	52
<b>Figura 3.</b> Observación en fresco de una célula de levadura portadora de bacteria en intervalos de un segundo .....	55
<b>Figura 4.</b> Viabilidad de cepas de <i>H. pylori</i> al interior de las vacuolas de la cepa ATCC 10231 de <i>C. albicans</i> .....	56
<b>Figura 5.</b> Detección gen 16S rRNA de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231. ....	57
<b>Figura 6.</b> Detección gen <i>cagA</i> de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	58
<b>Figura 7.</b> Detección gen <i>vacA</i> s1a de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231. ....	58

<b>Figura 8.</b> Detección gen <i>vacA s1b</i> de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231. ....	59
<b>Figura 9.</b> Detección gen <i>vacA s2</i> de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	60
<b>Figura 10.</b> Detección gen <i>vacA m1</i> de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	61
<b>Figura 11.</b> Detección gen <i>vacA m2</i> de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	62
<b>Figura 12.</b> Detección gen <i>dupA</i> de <i>H. pylori</i> en levaduras provenientes de cocultivos entre <i>C. albicans</i> ATCC 10231 .....	63
<b>Figura 13.</b> Desarrollo de hifas de <i>C. albicans</i> en PBS 1X suplementado con 10% de SFB.....	66
<b>Figura 14.</b> Ensayo de filamentación de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	67
<b>Figura 15.</b> Observación macroscópica y microscópica (montaje en fresco 100x) de cambio blanco opaco en la cepa de <i>C. albicans</i> ATCC 10231.....	69
<b>Figura 16.</b> Evolución de fenotipo de colonias de levaduras portadoras de cepas de <i>H. pylori</i> .....	72
<b>Figura 17.</b> Morfología celular de <i>C. albicans</i> portadora de cepas de <i>H. pylori</i> en diferentes fenotipos de colonias. ....	73

**Figura 18.** Viabilidad de *H. pylori* al interior de *C. albicans* proveniente de una colonia de morfotipo blanco..... 74



## ABSTRACT

*Candida albicans* is a pleimorphic fungus, that is part of the human microbiota and colonized mainly mucosa of the gastrointestinal tract. This fungus has the ability to interact with both pathogenic and commensal bacteria in the different environments in which it colonizes. This interaction with bacterial members can result in the induction or inhibition of morphological changes in the fungus. It has been reported that the interaction of *C. albicans* with members of the genus *Lactobacillus* inhibits hyphal formation, reducing the pathogenicity of the fungus, while *Streptococcus gordonii* causes the opposite effect when interacting with *C. albicans*. On the other hand, the interaction of this fungus with bacteria can also result in the internalization of the bacteria inside the vacuoles of *C. albicans*, which has been mainly studied with the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*, observing that this phenomenon occurs when these microorganisms are in

environmental conditions that are adverse to the bacteria, suggesting that the internalization of *H. pylori* in *C. albicans* is a survival mechanism for the bacteria.

Whether the interaction between *H. pylori* and *C. albicans* has any effect on the fungus morphology is still unknown, therefore, the aim of this work was to determine the effect of the interaction between *H. pylori* and *C. albicans* on the fungus morphology and to determine whether the intracellular viability of the bacterium is affected due to these morphological changes. It was found that the internalization rate of *H. pylori* in *C. albicans* is about 0.1% and that the viability of the bacterium inside the fungus was not affected by the fungus morphology. In addition, under conditions of nutrient starvation, an acceleration of the phenotypic change of *C. albicans* colonies from co-cultures with the bacteria was observed, which when observed under the microscope showed the appearance of large yeasts of about 10  $\mu\text{m}$ , while in media supplemented with fetal bovine serum, the inhibition of hyphal formation was observed in co-cultures with the bacteria. These results suggest that the presence of *H. pylori* induces changes in the morphology of the fungus and these changes depend on the nutrients available in the environment.

## RESUMEN

*Candida albicans* es un hongo pleimórfico que forma parte la microbiota humana colonizando principalmente mucosas del tracto gastrointestinal. Este hongo tiene la capacidad de interactuar con bacterias tanto patógenas como comensales en los distintos ambientes en los cuales coloniza. Esta interacción con miembros bacterianos puede dar como resultado la inducción o inhibición de cambios morfológicos en el hongo. Se ha reportado que la interacción de *C. albicans* con miembros del género *Lactobacillus* inhibe la formación de hifas, reduciendo la patogenicidad del hongo, mientras *Streptococcus gordonii* provoca el efecto contrario al interactuar con *C. albicans*. Por otro lado, la interacción de este hongo con bacterias también puede resultar en la internalización de la bacteria al interior de las vacuolas de *C. albicans*, lo que ha sido principalmente estudiado con la bacteria patógena *Helicobacter pylori*, observándose que este fenómeno sucede cuando estos microorganismos se encuentran frente a condiciones

ambientales que son adversas para la bacteria, sugiriendo que la internalización de *H. pylori* en *C. albicans* es un mecanismo de sobrevivencia para la bacteria.

Aún se desconoce si la interacción entre *H. pylori* y *C. albicans* tiene algún efecto en la morfología del hongo, por lo que, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la interacción entre *H. pylori* y *C. albicans* en la morfología del hongo y determinar si la viabilidad intracelular de la bacteria se ve afectada debido a estos cambios morfológicos. Se encontró que la tasa de internalización de *H. pylori* en *C. albicans* es de alrededor del 0.1% y que la viabilidad de la bacteria al interior del hongo no se veía afectada por la morfología de este. Además, se determinó que en condiciones de escasez de nutrientes se observó una aceleración del cambio fenotípico de las colonias de *C. albicans*, provenientes de los co-cultivos con la bacteria, las cuales al observarlas al microscopio se observaba la aparición de levaduras de gran tamaño de alrededor de los 10  $\mu\text{m}$ , mientras que en medios suplementados con suero fetal bovino se observó la inhibición de la formación de hifas en los co-cultivos con la bacteria. Estos resultados sugieren que la presencia de *H. pylori* induce cambios en la morfología del hongo y que estos dependen de los nutrientes disponibles en el ambiente.



# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* es un hongo diploide, polimórfico, miembro de la microbiota humana, el cual coloniza las superficies de las mucosas del tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario. Este hongo generalmente se encuentra como un hongo comensal inofensivo (Dadar et al., 2018). Sin embargo, alteraciones en el ambiente puede ocasionar un cambio en el microorganismo desde un estado comensal a un estado patógeno, es así como *C. albicans* se ha transformado en el mayor patógeno humano entre los hongos, con una tasa de mortalidad en infecciones sistémicas cercanas al 40%, además de ser el principal responsable de candidiasis invasiva entre las especies de *Candida* (Andes et al., 2016).

A nivel del huésped los principales factores de riesgos para las infecciones por *C. albicans* son las terapias antibióticas seguidas de accesos venosos central, procedimientos quirúrgicos, neutropenia, nutrición parenteral, catéter urinario,

enfermedades hematológicas, prematuridad, enfermedad cardíaca, trauma, enfermedad neurológica, enfermedad gastrointestinal, trasplante de órganos, enfermedad pulmonar, enfermedad vascular, VIH, enfermedad genética, malformación congénita, enfermedad renal, diabetes mellitus, enfermedad hepática y enfermedad pancreática (Dadar et al., 2018), reportándose como el principal rasgo que promueve la patogénesis en *C. albicans* su cambio morfológico de levadura a hifa.

## 1.2 MORFOGÉNESIS EN *Candida albicans*

En *Candida albicans* se han descrito ocho morfotipos distintos, cuatro morfologías de levaduras (blanca, opaca, gris y GUT), dos morfologías hifales (linear y sinusoidal), pseudohifa y clamidospora. Cada una de estas morfologías posee características tanto fenotípicas como genéticas particulares.

### 1.2.1 MORFOLOGÍA DE LEVADURAS

El morfotipo de levadura más conocido es la célula blanca, ésta se observa comúnmente en aislados clínicos y es ampliamente usada en estudios *in vitro*, se reconoce por su forma celular redonda a ovalada, que mide alrededor de 5-6  $\mu\text{m}$ , la

colonia es de aspecto blanco redondeada, además, posee una eficiente capacidad de diseminación y adhesión a superficies (Cottier & Hall, 2020; Perry et al., 2020).

El morfotipo de célula opaca, deriva de la célula blanca y es la forma competente de apareamiento de *C. albicans*, éstas tienen una forma elipsoidal de alrededor de 7  $\mu\text{m}$  de largo, con granos en la superficie y con vacuolas más pronunciadas, el aspecto de las colonias es opaco y aplanado (Cottier & Hall, 2020; Noble et al., 2017; Perry et al., 2020). Estas células son el resultado de la pérdida de la heterocigosidad en el locus MTL, lo que conlleva a la aparición de dos tipos de células opacas  $\alpha$  y  $\alpha$ , las segundas células MTL $\alpha$  son sexualmente competentes y producen una feromona que desencadena el fenómeno de “shmooing”, es decir, la formación de un tubo de conjugación en las células opacas MTL $\alpha$ . El cambio morfológico de células blancas a opacas puede ser inducido por diversos factores ambientales como el pH ácido, la hipercapnia y la exposición a la N-acetilglucosamina (Cottier & Hall, 2020); además, las células opacas, pueden ser inducidas a formar filamentos en respuesta a limitación de nitrógeno o fósforo, mientras que en las células blancas se puede inducir la formación de hifas en presencia de suero, pero no así con las células opacas, y se ha visto que vuelven al estado de células blancas a 37°C. Sin embargo, es posible estabilizar este morfotipo celular a 37°C, si se le suman otras señales ambientales como condiciones

anaeróbicas, niveles elevados de CO<sub>2</sub>, N-acetilglucosamina o limitaciones de nutrientes (Perry et al., 2020). También entre sus características se ha visto que poseen mayor resistencia a la fagocitosis por parte de macrófagos y neutrófilos, y que los cambios observables entre los morfotipos blanco y opaco se pueden deber al cambio de la expresión de más de 1.000 genes en el morfotipo opaco (Noble et al., 2017).

Otro morfotipo son las células grises, éstas son el resultado de una alteración genética, se ha visto que cepas de *C. albicans* hemizigotas EFG1, tienen morfología blanca, pero la pérdida funcional del alelo EFG1, da como resultado la formación de células grises, así se ha observado que, bajo ciertas condiciones como el paso a través del tracto gastrointestinal de mamíferos, puede provocar mutaciones en el factor de transcripción Efg1 en *C. albicans*, promoviendo la aparición de ciertos morfotipos en las células de levaduras (Liang et al., 2019). Estas células al igual que las opacas presentan forma elipsoidal, con un diámetro más pequeño que el de las células opacas y sin granos en la superficie, dentro de las características de esta morfología se sabe que son mil veces más eficientes que las células blancas en el apareamiento, pero cien veces menos eficientes que las células opacas (Cottier & Hall, 2020). Además, tanto en el morfotipo opaco como gris se ha informado que pueden colonizar la piel de manera más efectiva que las cepas blancas y presentan un tiempo

de duplicación más rápido en el epitelio de la lengua que las células blancas, por lo que se sugiere que este morfotipo tiene mayor capacidad de colonización de superficies epiteliales (Noble et al., 2017).

Por último, las células de transición inducida gastrointestinal o GUT por sus siglas en inglés, es un morfotipo que se asocia con la colonización gastrointestinal, son similares en forma y tamaño a las células opacas, pero sin granos en su superficie, y suelen ser un poco más anchas que las células grises, esta morfología es muy poco estable produciéndose la transición de GUT a células blancas fuera del entorno gastrointestinal (Cottier & Hall, 2020). Además, generan colonias más oscuras y aplanadas que se tiñen débilmente con floxina B (Noble et al., 2017).

### 1.2.2 MORFOLOGÍA DE CLAMIDOSPORA

Estas son células grandes redondas, las cuales poseen un diámetro de 7-8  $\mu\text{m}$ , cuya pared celular es gruesa, y es la forma más inusual que presenta *C. albicans*. Existen varios estímulos que desencadenan la transición a esta morfología como exposición a la luz, el hambre o la hipoxia, pero aún no está clara la función biológica, ya que este morfotipo no proporciona una resistencia significativa a estas condiciones. Sin embargo, se piensa que podría facilitar la supervivencia a

microambientes extremos, ya que, mientras el hongo se encuentre en esta forma el metabolismo se ve significativamente reducido (Böttcher et al., 2016; Cottier & Hall, 2020; Ingle et al., 2017). Los clamidosporos son generados por células suspensoras, que son aquellas que se encuentran en los extremos distales de los filamentos (Noble et al., 2017).

### 1.2.3 MORFOLOGÍA DE PSEUDOHIFA E HIFAS

Las pseudohifas poseen características tanto de la forma de levadura como de la forma de hifa, tanto así que aún existe una controversia con respecto a si las pseudohifas son un morfotipo celular o un estado que se produce durante la transición de levadura a hifa. Las pseudohifas al igual que las hifas, generan micelios después de múltiples divisiones, pero como las levaduras las uniones entre células madre e hija están delimitadas por hendiduras visibles (Noble et al., 2017).

Las células hifales, son células delgadas en forma de tubo, cuya división celular se produce dentro de las células hijas hifales, seguidas de la migración de un núcleo de regreso a la madre, éstas permanecen firmemente unidas de extremo a extremo después de la citocinesis, por lo que, constantes procesos de división producen estructuras filamentosas multicelulares, llamado micelio, esta estructura

permite la comunicación entre el citoplasma de las células interconectadas, de un diámetro menor al de la levadura, de aproximadamente 2.5 a 3.5  $\mu\text{m}$ , con un largo que puede superar los 100  $\mu\text{m}$  (Cottier & Hall, 2020; Noble et al., 2017). Esta morfología puede ser gatillada por múltiples señales ambientales presentes en el cuerpo humano como, temperatura de 37°C, cambios de pH, hipercapnia, bajos niveles de nitrógeno, N-acetilglucosamina, peptidoglicán, manitol o presencia de ciertos aminoácidos, la cuales a su vez tienen la capacidad de activar distintas vías que llevan a la expresión de genes relacionados con la forma hifal (Noble et al., 2017).

La transformación desde la morfología de levadura a hifa, está mediada por la activación de diferentes vías, una de ellas es la vía MAPK, cuya activación es inducida por factores como el entorno de la matriz de inclusión, daño en la pared celular y bajo nivel de nitrógeno, otra vía es la gatillada por estrés osmótico, donde bajo estas circunstancias se puede producir la polarización y despolarización del citoesqueleto y otras estructuras como el anillo de septina, lo que induce la formación de hifas. La vía AMPc-PKA también juega un rol en la morfogénesis de *C. albicans*, así como, en el crecimiento, síntesis de glucógeno, actividad mitocondrial y el metabolismo energético. El AMPc es necesario para la activación de la vía PKA en respuesta a estímulos como suero, N-acetilglucosamina, aminoácidos y dióxido de

carbono, como que desencadena la transformación hifal. La vía Rim101 es inducida por cambios en el pH, específicamente en este caso el pH alcalino activa la vía Rim101, la cual permite la expresión del factor de transcripción Efg1, el cual es el mayor responsable de la formación de hifas (Chen et al., 2020).

Las células de levadura e hifa son las morfologías más importantes que puede presentar *C. albicans*, ya que es determinante del estado comensal y patógeno del hongo, esta transición puede conducir a la infección de tejidos, evasión de macrófagos, adhesión a células huésped y desarrollo de comunidades de biopelículas clínicamente relevantes (Dadar et al., 2018), a través de la expresión de distintos factores de virulencia como el tigmotropismo que es la capacidad de “reconocer” irregularidades en la superficie del sustrato, adhesinas (Hwp1, Als3, Als10, Fav2, Pga55), enzimas que degradan tejidos (Sap4, Sap5 y Sap6), proteínas de defensa antioxidantes (Sod5) y una toxina peptídica citolítica (Ece1) (Noble et al., 2017). La filamentación protege a *C. albicans* de la muerte celular programada inducida por anfotericina B a través de un mecanismo que involucra la metacaspasa de levadura, MCA1, mientras que en el mantenimiento de la forma comensal de *C. albicans* juega un rol fundamental la interacción del hongo con la microbiota residente y la inmunidad del huésped (Dadar et al., 2018).



### 1.3 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN *Candida albicans* E INTERACCIONES POLIMICROBIANAS

Al ser *C. albicans* capaz de colonizar distintas zonas del cuerpo humano, ésta puede interactuar con diferentes especies de bacterias, promoviendo esta interacción cambios morfológicos en el hongo, esta respuesta puede conllevar a la inhibición de la filamentación o a la inducción de la formación de hifas. Dentro de aquellos microorganismos capaces de inhibir la morfogénesis en *C. albicans* se ha reportado que:

A nivel oral se han encontrado películas polimicrobianas entre *C. albicans* y distintas especies de *Streptococcus* como, *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. sanguinis* y *S. mitis*, donde estas bacterias tienen la capacidad de favorecer la adhesión del hongo a la placa dental. Sin embargo, el resultado de la interacción del hongo con miembros del género *Streptococcus* es variable, es así como ensayos entre *C. albicans* y cultivos libres de células de *S. mutans* pueden inhibir la formación de hifas en el hongo (Barbosa et al., 2016); por otro lado, se ha demostrado que el sistema de quorum sensing LuxS en *S. gordonii* induce el crecimiento de hifas en *C. albicans* y aumenta la biomasa en biopelículas polimicrobianas formadas por ambos microorganismos, al comparar estas mismas biopelículas, pero constituidas por *S. gordonii luxS* mutante (Lohse et al., 2018), mientras que en las biopelículas

polimicrobianas entre *C. albicans* y las especies *S. sanguinis* y *S. mitis*, se ha observado formación de hifas y mayor expresión de los genes *ALS1* y *ALS3*, donde la expresión de la adhesina *ALS1* se asocia a la maduración de las biopelículas de *C. albicans*, entre tanto, la expresión *ALS3* se asocia a la formación de hifas por parte del hongo (Fahim et al., 2019). En el caso de la interacción con *S. oralis*, la presencia de esta bacteria es un fuerte inductor de la expresión del factor de transcripción *EFG1*, el cual es uno de los reguladores de la filamentación en *C. albicans* (Xu et al., 2017), el aumento de la filamentación de *C. albicans* por *S. oralis* también se ha visto de biopelículas polimicrobianas en conjunto con *A. oris* (Cavalcanti et al., 2016).

Otro patógeno oral con el cual este hongo puede interactuar es *Porphyromonas gingivalis*, donde se ha visto que esta interacción actúa como un escudo para la bacteria, promoviendo un microambiente anaeróbico para *P. gingivalis* en biopelículas donde el hongo se encuentra principalmente en su forma hifal, además esta coexistencia influye en el huésped, atenuando la respuesta inflamatoria de macrófagos y fibroblastos, lo que favorece aún más la supervivencia de la bacteria (Bartnicka et al., 2019, 2020).

Desde el pulmón se suelen coaislar frecuentemente *C. albicans* junto a *Pseudomonas aeruginosa*, esta asociación se ha relacionado con infecciones de las

vías respiratorias en pacientes con patologías previas como la fibrosis quística, la interacción entre estos microorganismos es compleja pues por un lado se ha visto que el hongo es capaz de atenuar la virulencia de la bacteria al inhibir la expresión génica de los sideróforos Pyochelin y Pyoverdin, y por otro lado, esta interacción puede formar extensas biopelículas en el epitelio de mucosas y dispositivos médicos, favoreciendo la supervivencia de la bacteria al tratamiento con meropenem a la concentración clínicamente relevante (5 mg/L), además, se ha demostrado que *P. aeruginosa* es capaz de secretar N-acyl homoserin lactona, la cual puede inhibir el crecimiento hifal de *C. albicans*, a través de mecanismos de quorum sensing. A la vez, se ha observado que la producción de fenazina por *P. aeruginosa* promueve una mayor producción de productos de fermentación, como etanol en *C. albicans*, lo que ocasiona una retroalimentación positiva, donde *P. aeruginosa* en respuesta al aumento de los niveles de etanol, aumenta la producción de fenazina promoviendo la formación de su propia biopelícula (Alam et al., 2020; Lohse et al., 2018; Romo & Kumamoto, 2020).

En el epitelio vulvovaginal *C. albicans* y especies del género *Lactobacillus* se consideran parte de la microbiota normal de este nicho, así se ha observado la capacidad de cepas de distintas especies para inhibir la formación de hifas, se ha visto que una cepa de *L. paracasei* es capaz de reducir la filamentación de *C. albicans in*

*vitro* al regular negativamente los genes TEC1 y UME6 que son esenciales para la producción de hifas (de Barros et al., 2018), mientras que en otro estudio se encontró que cepas pertenecientes a las especies *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. paracasei* muestran una mayor actividad contra la formación de hifas de *Candida* en comparación con cepas de otras especies de *Lactobacillus*, y que la inhibición morfológica estaría dada por la actividad de la enzima peptidoglicano hidrolasa Msp1, producida por estas especies, la cual tiene la capacidad de descomponer la quitina, polímero principal en la pared celular hifal de *C. albicans* (Allonsius et al., 2019).

*C. albicans* también es capaz de interactuar con bacterias propias de la piel como *Staphylococcus aureus*, estos microorganismos se encuentran dentro de los patógenos nosocomiales más frecuentes, responsables de morbilidad y mortalidad severas, así se ha visto que el hongo es capaz de aumentar la virulencia de la bacteria, promoviendo la producción de toxinas y la actividad hemolítica de *S. aureus*, a través de la activación del sistema de detección de quorum sensing agr estafilocócico (Todd et al., 2019). Además, se ha identificado que el componente de la pared celular de  $\beta$ -1,3-glucano y la molécula de quorum sensing farnesol secretado por *C. albicans* proporciona mayor tolerancia a los antibióticos en *S. aureus* en la matriz de biopelículas formadas por estos microorganismos (Kong et al., 2016, 2017). Esta

relación entre *C. albicans* y bacterias comensales del humano podría ser mucho más íntima de lo que se piensa, esto debido a que un estudio identificó la existencia de *Staphylococcus hominis* y *Staphylococcus haemolyticus* al interior de la vacuola del hongo, y al tratar estas cepas de *C. albicans* portadoras de bacterias con concentraciones sub inhibitorias de anfotericina B, la levadura fue capaz de liberar estas bacterias al medio, las cuales son recuperable en cultivo (Tavakolian et al., 2018). Y no sólo eso, sino que este tipo de bacterias pueden estar presente en cultivos aparentemente puros de *C. albicans*, y no ser detectadas por métodos convencionales (cultivo, microscopía o PCR), necesitándose para la identificación de estas bacterias cultivos prolongados de al menos 8 días, de esta manera un grupo de investigadores determinó la presencia de *Staphylococcus epidermidis* y *Propionibacterium acnes* (ahora llamado *Cutibacterium acnes*) en cultivos aparentemente puros de cepas de *C. albicans*, además la presencia de estas bacterias se asoció con alteraciones de la resistencia antifúngica observadas en condiciones de crecimiento bajo hipoxia, por lo que, la asociación de bacterias con *C. albicans* podría tener implicancia directas en los procedimientos clínicos para el tratamiento de infecciones por la levadura (Bruno et al., 2018).

A nivel gastrointestinal se ha visto que *Enterococcus faecalis* secreta la bacteriocina EntV, que inhibe la formación de hifas y biopelículas de *C. albicans*,

además, altera las biopelículas maduras (Lohse et al., 2018), pero éste no es un caso aislado ya que también se ha visto que *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium tiene la capacidad de inhibir la filamentación y formación de biopelícula en *C. albicans* (Tampakakis et al., 2009). Además, existen reportes que al formarse biopelículas duales entre *C. albicans* y *Bacteroides fragilis* o *Clostridium perfringens*, especies bacterianas anaerobias presentes en el intestino humano, las biopelículas proporcionan el microambiente hipóxico que permite el crecimiento de estas bacterias dentro de la biopelícula, a pesar de que el ambiente externo sea aeróbico y cuando estos microorganismos se cultivan junto con *C. albicans* en condiciones planctónicas, estas bacterias tienen la capacidad de modular el comportamiento del hongo induciendo la formación de agregados celulares que flotan libremente, los cuales son semejantes a biopelículas, pero en una escala menor. Estos agregados de células de *C. albicans* incorporaron las bacterias dentro de estas estructuras permitiendo la sobrevivencia de *B. fragilis* y *C. perfringens* en condiciones aeróbicas (Lohse et al., 2018). En otro estudio, se observó que el crecimiento *B. fragilis* y *B. vulgatus* mejoró significativamente en presencia de *C. albicans*, además, la suplementación de monocultivos de *Bacteroides* con células muertas de *C. albicans*, que presentaban la capa de manano de la pared celular

intacta, resultó en un aumento de las concentraciones bacterianas (Valentine et al., 2019).

En este mismo nicho, pero en el ambiente estomacal, *C. albicans* también puede interactuar con el patógeno *Helicobacter pylori*. Ya en 1998 Ansorg y Schmid, hacían referencia a que la interacción entre esta bacteria y levaduras podría estar modulando el curso de las infecciones por *H. pylori*, así fue como estudió la capacidad de adhesión entre *H. pylori* y distintas especies de *Candida*, encontrando que esta capacidad es menor entre estos microorganismos comparado con la capacidad que poseen bacterias como *E. coli* y *S. aureus*, para adherirse a *Candida*, concluyendo que la adhesión entre estos microorganismos no juega un rol importante en las infecciones por *H. pylori* (Ansorg & Schmid, 1998). A pesar de este hallazgo, existe evidencia que permite pensar que, el postulado de que la interacción entre *H. pylori* y *C. albicans* podría modular el curso de las infecciones, es cierto. Observaciones a nivel clínico como la coexistencia de estos dos microorganismos en úlceras gástricas gigantes, donde biopsias revelan la formación de hifas y esporas por el hongo, coexistencia en pacientes con dispepsia y en su saliva, así como la capacidad de *H. pylori* para alterar tanto la microbiota gástrica e intestinal, existiendo una relación directamente proporcional entre la severidad de la patología asociada a *H. pylori* y la colonización por especies fúngicas (Dash et al.,

2019; Ince et al., 2014; Karthick B et al., 2019; Massarrat et al., 2016), hace preguntarse si existirá otro mecanismo de interacción entre estos microorganismos que pueda acrecentar la virulencia tanto de la bacteria como del hongo.

La presencia de cuerpos similares a bacterias al interior de vacuolas de levaduras parece contestar a este cuestionamiento, desde el 2005 se reporta en múltiples investigaciones la presencia de *H. pylori* al interior de las vacuolas de especies de *Candida*, pudiendo aislarse estas levaduras desde diferentes nichos como la cavidad oral de adultos y recién nacidos, biopsias gástricas, fluidos vaginales de embarazadas, frutas, flores, miel, jugos de frutas, yogurt, entre otros (Matamala-Valdés et al., 2018; Salmanian et al., 2008, 2012; Sánchez-Alonzo, Matamala-Valdés, et al., 2021; Saniee et al., 2013; Siavoshi et al., 2005, 2018). Con estos antecedentes se ha postulado que las vacuolas de *Candida* serían un nicho especializado para *H. pylori*, que podría mejorar la supervivencia de la bacteria, ya que, observaciones microscópicas demuestran que las levaduras hijas pueden heredar la bacteria, luego de divisiones consecutivas, permitiendo así la multiplicación y protección de *H. pylori* contra tensiones ambientales (Siavoshi et al., 2019; Siavoshi & Saniee, 2014).

Con estos antecedentes se desprende la siguiente pregunta de investigación:  
¿La interacción entre *H. pylori* y *C. albicans* podrá modular la morfología del hongo,



pudiendo promover de esta manera la capacidad de sobrevivencia, transmisión, colonización, persistencia y patogenicidad de estos dos microorganismos?



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESIS

La interacción entre las cepas de *Helicobacter pylori* J99, G27 y SS1 y *Candida albicans* ATCC 10231 induce cambios morfológicos en el hongo, sin afectar la viabilidad intracelular de la bacteria en las distintas morfologías.

### 2.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la interacción entre *Helicobacter pylori* y *Candida albicans* en la morfología del hongo y en la viabilidad intracelular de la bacteria.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar cambios morfológicos en *Candida albicans* en cocultivos con *Helicobacter pylori*.
- 2) Determinar en las distintas morfologías presentadas por el hongo la viabilidad de *Helicobacter pylori* intracelular en *Candida albicans*.

### 3. MATERIALES Y METODOLOGÍA

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 CEPAS

1) Cepas de referencia de *H. pylori* almacenadas en cepario a -80°C del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción:

- *H. pylori* G27
- *H. pylori* J99 también denominada ATCC 700824
- *H. pylori* SS1

2) Cepa de referencia de *C. albicans* ATCC 10231 almacenada en el cepario a -80°C del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

### 3.1.2 REACTIVOS

- Suero Fetal Equino (SFE)
- Suero Fetal Bovino
- Kit LIVE / DEAD BacLight
- DNeasy® UltraClean® Microbial Kit (QIAGEN)
- Kit Sapphire-Amp Fast PCR Master Mix (TAKARA BIO INC, Otsu, Japón).
- Agarosa (Lonza, Walkersville, MD, EE. UU.)
- RedGel (Biotium, San Francisco, CA, EE. UU.)

### 3.1.3 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Columbia (CA) (OXOID)
- Agar Sabouraud (SA)
- Agar CHROMagar Candida
- Caldo Brain Heart Infusion (BHI)

### 3.1.4 SOLUCIONES

- 1) Solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS):

- NaCl: 137 mM
- KCl: 2.7 mM
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 10 mM
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.8 mM

2) Glicerol

### 3.1.5 MEDIOS DE CULTIVOS MODIFICADOS

- 1) Agar Columbia suplementado con Suero Fetal Equino (CA-SFE). Se adicionó un 7% v/v de SFE inactivado al agar Columbia previamente esterilizado.
- 2) Medio de almacenamiento. Se adicionó 20% v/v de glicerol al caldo BHI antes del proceso de esterilización para la elaboración de medio de almacenamiento de las cepas utilizadas.

## 3.2 METODOLOGÍA

### 3.2.1 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE *H. pylori*

Las cepas de referencia de *H. pylori*, ATCC 43504, J99, G27 y SS1, se cultivaron en medio sólido, CA-SFE, en condiciones de microaerobiosis (10% de CO<sub>2</sub>) a 37°C, de 3 a 5 días, esto último según requerimientos de cada cepa.

### 3.2.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE *C. albicans*

La cepa de referencia *C. albicans* ATCC 10231 se cultivó en medio sólido SA en condiciones de microaerobiosis (10% de CO<sub>2</sub>) a 37°C de 18 a 24 horas.

### 3.2.3 ENSAYO DE INTERNALIZACIÓN DE *H. pylori* EN *C. albicans*

Se realizaron suspensiones de las cepas de bacterias y levaduras en PBS 1X hasta alcanzar una turbidez McFarland 4. Las suspensiones se mezclaron en partes iguales y se incubaron a 37°C por 48 h en condiciones de microaerobiosis (10% de CO<sub>2</sub>).

### 3.2.4 RECUENTO DE CUERPOS SIMILARES A BACTERIAS INTRA-LEVADURAS EN CO-CULTIVOS ENTRE *C. albicans* Y CEPAS DE *H. pylori*

El recuento de cuerpos similares a bacterias intra-levaduras se realizó haciendo seguimiento de los co-cultivos a las 0, 3, 6, 9, 24 y 48 h en cámara Improved Neubauer.

Se colocó el cubreobjetos en el hemocitómetro, encima de los dos soportes de cubreobjetos a los lados de las cámaras de llenado. Se homogenizó la muestra y se pipetearon 10 µL en el hemocitómetro.

El recuento se realizó en 80 de las cuadrículas centrales de 2500  $\mu\text{m}^3$  de volumen, para las levaduras totales y las levaduras portadoras de cuerpos similares a bacterias.

El resultado se expresó como células de levaduras totales (LT) o células de levaduras portadoras de cuerpos similares a bacterias (L-PB), la concentración para cada uno de los grupos se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Cells}}{\text{mL}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de levaduras por cuadrícula (LT o L - CSB)} \times \text{Factor de dilución}}{0,00000025 \text{ mL}}$$

Los resultados se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism 7 versión 7.03 y se expresaron como cells/mL.

Transcurridas las 48 h de incubación un inóculo del co-cultivo, se sembró en agar SA con el fin de eliminar las bacterias no internalizadas, y se incubó a 37°C por 24 h. Se realizaron trasposos de la muestra hasta no observar bacterias extra-*Candida*. Las cepas de *C. albicans* portadoras de *H. pylori* intracelular se almacenaron en medio de almacenamiento y se guardaron en cepario a -20°C hasta su uso.



### 3.2.5 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR DE *H. pylori* AL INTERIOR DE *C. albicans* PORTADORA DE BACTERIAS

Para la realización de este ensayo se tomaron muestras al final de las 48 h de co-cultivo (inciso 3.2.3). Las muestras se tiñeron con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se observó mediante microscopía fluorescente.

Las suspensiones celulares se marcaron con volúmenes iguales de SYTO 9 y yoduro de propidio, y se incubaron en oscuridad. Se tomaron imágenes del movimiento de los cuerpos similares a bacterias en intervalos de 1 s (Siavoshi et al., 2018).

### 3.2.6 AMPLIFICACIÓN DE GENES ESPECÍFICOS DE *H. pylori* A PARTIR DEL ADN DE *C. albicans* PORTADORA DE BACTERIAS

El ADN de las levaduras obtenidas en el apartado 3.2.4 y de cepas de control (*H. pylori* J99, G27 y SS1 como control positivo y *C. albicans* ATCC 10231 como control negativo) se extrajo mediante e DNeasy<sup>®</sup> UltraClean<sup>®</sup> Microbial Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los genes de *H. pylori* se amplificaron utilizando el kit Sapphire-Amp Fast PCR

Master Mix (TAKARA BIO INC, Otsu, Japón). Para cada ensayo, se agregaron 12,5 µL de Master Mix, 1 µL de cebadores específicos para los genes de *H. pylori*, 2 µL del ADN de la muestra y 8,5 µL de agua para PCR para obtener un volumen final de 25 µL de mezcla de PCR (Sánchez-Alonzo, Matamala-Valdés, et al., 2021).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C/1 min, temperatura de desnaturalización 98°C/5 s, temperatura de hibridación para cada cebador como se indica en la Tabla 1 y extensión a 72°C/40 s. Se realizaron treinta ciclos para cada reacción de PCR utilizando un termociclador Eppendorf (Hauppauge, Nueva York, NY, EE. UU.). La amplificación de los genes se confirmó después de una electroforesis en gel de agarosa al 2% (Lonza, Walkersville, MD, EE. UU.) Más 1,6 µL de RedGel (Biotium, San Francisco, CA, EE. UU.) a 100 V durante 80 min, los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta. utilizando un transiluminador modelo Enduro (Labnet, Edison, NJ, EE. UU.) (Sánchez-Alonzo, Matamala-Valdés, et al., 2021).

**Tabla 1.** Partidores utilizados para detectar y genotipar *H. pylori* contenidos en *C. albicans* ATCC 10231

Gene	Región	Secuencia	Tm °C	Amplicon (bp)	Ref.
<i>16S</i> <i>rna</i>		F: 5'CTCGAGAGACTAAGCCCTCC3' R: 5'ATTACTGACGCTGATGTGC3'	53	110	(Paredes-Osses et al., 2017)
<i>cagA</i>		F: 5'GATAACAGGCAAGCTTTTGAGG3' R: 5'CTGCAAAAGATTGTTTGGCAGA3'	55	349	(Matamala-Valdés et al., 2018)
<i>vacA</i>	<i>s1a</i>	F: 5'GTCAGCATCACACCGCAA3' R: 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	55	190	(Sánchez-Alonzo et al., 2020)
<i>vacA</i>	<i>s1b</i>	F: 5'AGCGCCATACCGCAAGAG3' R: 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	55	187	(Sánchez-Alonzo et al., 2020)
<i>vacA</i>	<i>s2</i>	F: 5'GCTAACACGCCAAATGATCC3' R: 5'CTGCTTGAATGCGCCAAAC3'	55	199	(Sánchez-Alonzo et al., 2020)
<i>vacA</i>	<i>m1</i>	F: 5'GGTCAAAATGCGGTCATGG3' R: 5'CCATTGGTACCTGTAGAAAC3'	50	290	(Sánchez-Alonzo et al., 2020)
<i>vacA</i>	<i>m2</i>	F: 5'GGAGCCCCAGGAAACATTG3' R: 5'CATAACTAGCGCCTTGCAC3'	55	352	(Sánchez-Alonzo et al., 2020)
<i>dupA</i>		F: 5'ACAAGGACGATTGAGCGATGG3' R: 5'TGGCTAGTTTGGAGGTCTTAGG3'	61	515	(Paredes-Osses et al., 2017)

### 3.2.7 ENSAYO DE FILAMENTACIÓN DE *C. albicans* EN CO-CULTIVOS CON *H. pylori*

Para determinar si la presencia de *H. pylori* induce la formación de hifas en *C. albicans* se realizó el siguiente ensayo descrito por Barbosa y col. (Barbosa et al., 2016), con algunas modificaciones.

Se preparó en PBS 1X, la suspensión de *C. albicans* McFarland 4 y suspensiones de las cepas de *H. pylori* utilizadas en los ensayos anteriores a una concentración McFarland 4. A una placa de 24 pocillos se le añadió 1 mL de PBS 1X suplementado con 10% de SFB para inducir el cambio morfológico de levadura a hifa en *C. albicans*.

En la placa 24 pocillos se evaluaron los siguientes grupos:

- Control negativo: 100  $\mu$ L de *C. albicans* ATCC10231 + 100  $\mu$ L de PBS 1X
- Grupo tratamiento 1: 100  $\mu$ L de *C. albicans* ATCC10231 + 100  $\mu$ L de *H. pylori* SS1

- Grupo tratamiento 2: 100  $\mu$ L de *C. albicans* ATCC10231 + 100  $\mu$ L de *H. pylori* J99
- Grupo tratamiento 3: 100  $\mu$ L de *C. albicans* ATCC10231 + 100  $\mu$ L de *H. pylori* G27

Se utilizaron 5 pocillos por grupo, en uno de los pocillos se añadió un portaobjeto de vidrio redondo para realizar tinción de Gram de las células adheridas al vidrio. Luego de las 24 h de cultivo en condiciones de microaerobiosis, se realizó el recuento del número de hifas en el sobrenadante de los pocillos sin portaobjeto utilizando cámara Neubauer, donde se contaron las 400 cuadrículas centrales. Para el análisis de resultados se utilizó el siguiente criterio de puntuación: 0, ausencia de hifas; 1, 1 a 10 hifas; 2, 11 a 20 hifas; 3, 21 a 30 hifas; 4, 31 a 40 hifas; 5, 41 hifas o más (dos Santos et al., 2020). Los resultados se expresaron como la media de la puntuación de hifas por grupo.

Por otra parte, los portaobjetos redondos luego de las 24 h de co-cultivo fueron teñidos utilizando la tinción de Gram. Las tinciones se observaron al microscopio óptico y se obtuvieron fotografías de 5 campos distintos. Se utilizó el programa ImageJ para realizar en análisis de las imágenes. Con el

programa se analizó el largo de las hifas, de 10 células de hifas por campo y el porcentaje de área ocupada por *C. albicans* en los campos, para determinar cambios en la morfología del hongo y en su capacidad de adhesión debido a la interacción con *H. pylori*.

Los resultados se graficaron utilizando el programa GraphPad Prism 7 versión 7.03.

### 3.2.8 DETECCIÓN DEL CAMBIO FENOTÍPICO BLANCO-OPACO EN *C. albicans* EN CO-CULTIVOS CON *H. pylori*

Se preparó una suspensión de *C. albicans* ATCC 10231 a una concentración  $10^3$  UFC/mL en PBS 1X, 100  $\mu$ L de la suspensión fue cultivado en SA por 5 días a 37°C en condiciones de aerobiosis.

Las células de colonias blancas homogéneas se resuspendieron en PBS 1X a una concentración McFarland 4, las cepas de *H. pylori* se suspendieron en PBS 1X a la misma concentración que la levadura. Cada una de las cepas de la bacteria se mezcló en partes iguales con la suspensión de la levadura y se realizó el co-cultivo en condiciones de microaerobiosis por 48 h.

Pasado las 48 h de cultivo las células de *C. albicans* se sembraron en placas de ChromoAgar Candida a baja densidad (50 a 100 células por placa) (G. Huang et al., 2009) el inóculo se homogenizó utilizando perlas de vidrio estériles. Las placas fueron incubadas a 37°C en condición de aerobiosis durante 6 días.

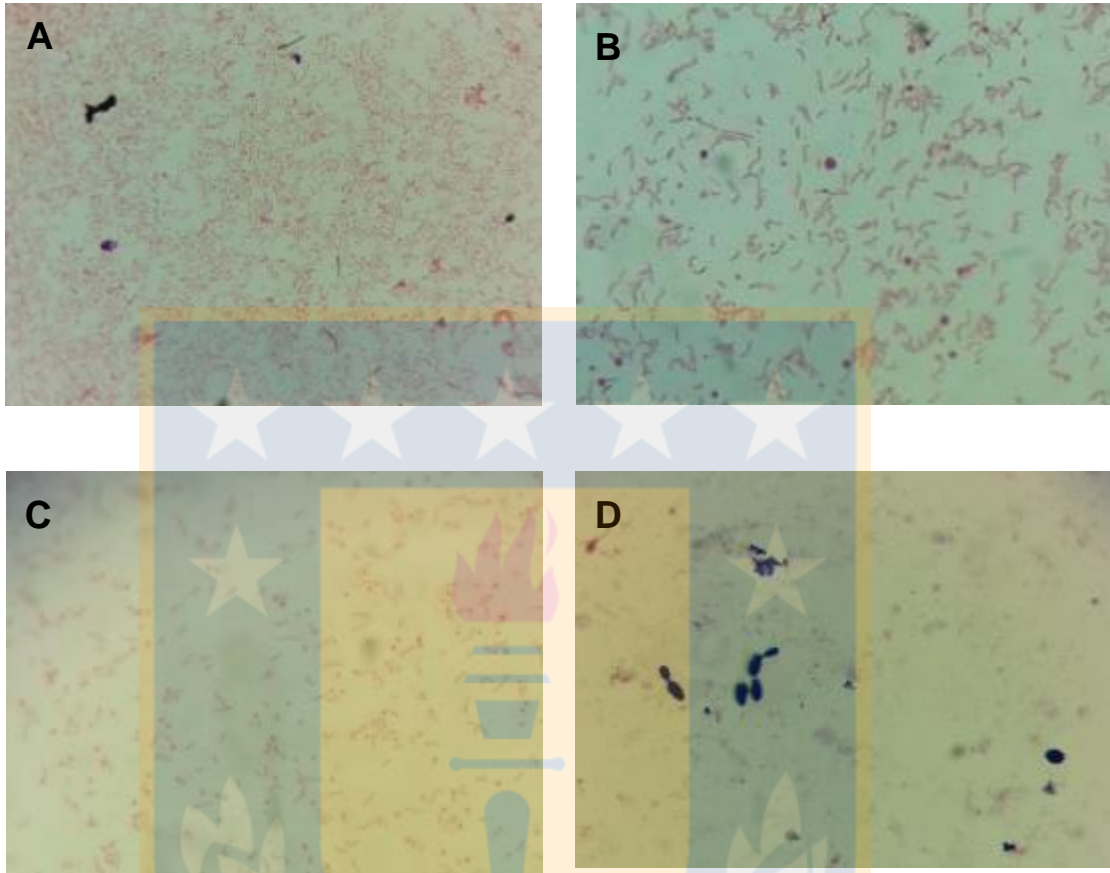
Se realizó el seguimiento del fenotipo de las colonias a través de análisis fotográfico los días 2, 3 y 5 de cultivo, al quinto día se realizó el recuento de las colonias totales (CT), de las colonias que mostraban el fenotipo opaco (OP) y de las colonias de fenotipo blanco con regiones opacas (B-OP), para determinar la frecuencia de cambio blanco-opaco en la cepa ATCC 10231 en presencia de las distintas cepas de *H. pylori*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CARACTERIZACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS CEPAS ENSAYADAS

En la figura 1 se observan las características microscópicas de las cepas ensayadas, en el caso de las de *H. pylori* J99, G27 y SS1, se observan células de morfología bacilar helicoidal, Gram negativas sin agrupación. Para la cepa de *C. albicans* ATCC 10231, se observan células con forma ovoide redondeadas que se tiñen de color violeta al utilizar la tinción de Gram.





**Figura 1.** Observación microscópica (tinción de Gram 100x) de las cepas de *H. pylori* y *C. albicans* utilizadas en este estudio. A) *H. pylori* J99. B) *H. pylori* G27. C) *H. pylori* SS1. D) *C. albicans* ATCC 10231.

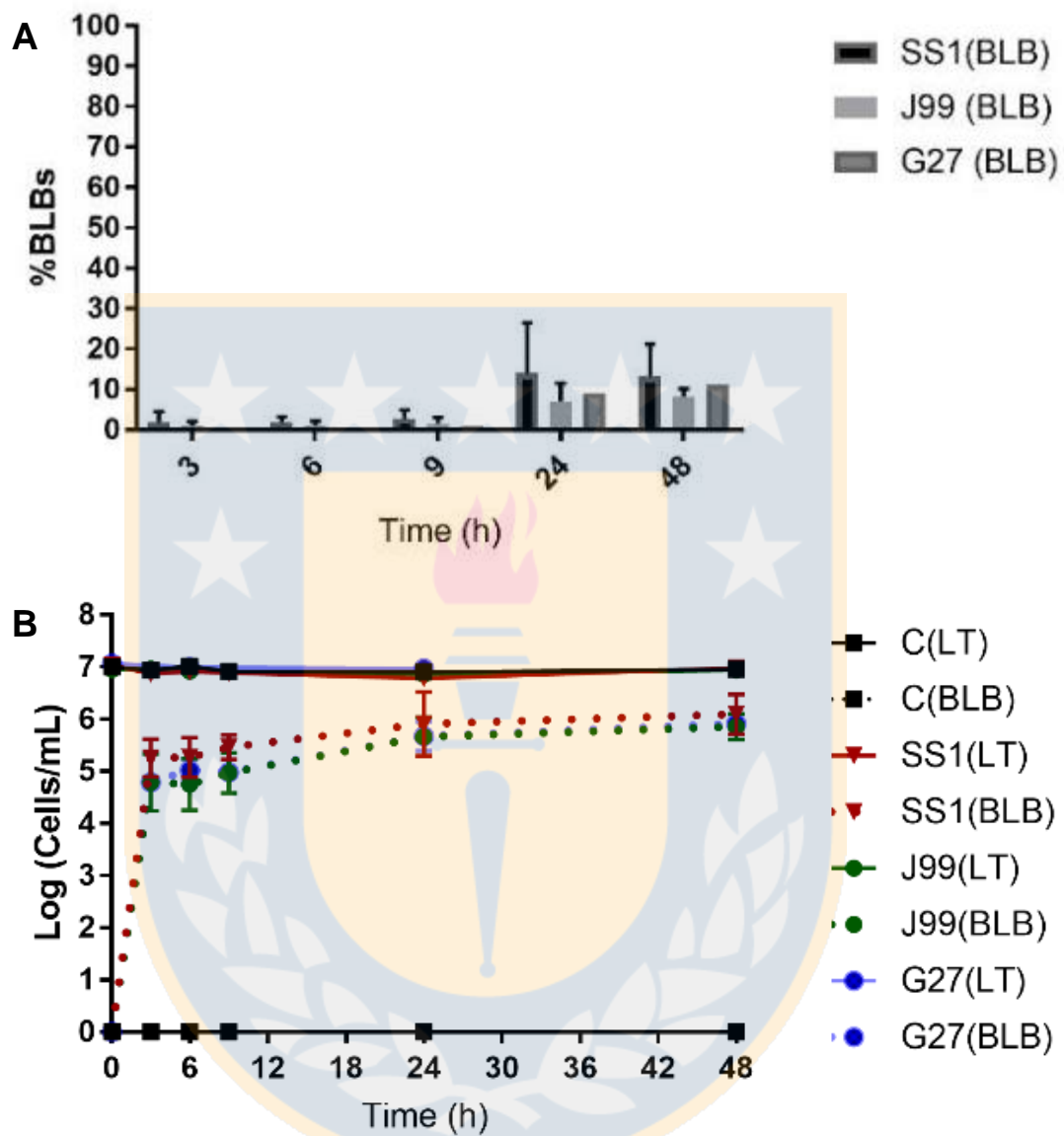
## 4.2. INTERNALIZACIÓN DE CEPAS DE *H. pylori* EN CÉLULAS DE *C. albicans*

En la figura 2 se puede observar el fenómeno de internalización de las cepas de *H. pylori* J99, G27 y SS1 en la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. El gráfico en A muestra el porcentaje de levaduras portadoras de bacterias en co-cultivos entre *C. albicans* y cepas de *H. pylori* a distintas horas de incubación, se observa el aumento paulatino del porcentaje de levaduras portadoras de bacteria a medida que aumenta el tiempo de incubación, observándose tanto a las 24 como a las 48 h de incubación un porcentaje de levaduras alrededor del 10% para todos los co-cultivo. No se observó diferencia significativa en el aumento del porcentaje de levaduras portadoras de bacterias para ninguno de los co-cultivos ( $p>0.05$ ) y tampoco se observó diferencia significativa al comparar los porcentajes de levaduras portadoras de bacterias entre co-cultivos ( $p>0.05$ ).

A las 3 h los co-cultivo entre las cepas 10231/SS1, 10231/J99 y 10231/G27, presentaron en promedio las siguientes concentraciones de levaduras portadoras de bacterias  $2 \times 10^5$  (Cells/mL),  $9 \times 10^4$  (Cells/mL) y  $6 \times 10^4$  (Cells/mL) respectivamente, existiendo diferencias significativas al comparar la concentración de los co-cultivos 10231/SS1-10231/J99 y

10231/SS1-10231/G27, ambos con un  $p < 0.0001$  a las 3 h de incubación , mientras que a las 48 h de incubación los co-cultivos presentaron concentraciones de levaduras portadoras de bacterias de  $2 \times 10^6$  (Cells/mL),  $8 \times 10^5$  (Cells/mL) y  $8 \times 10^5$  (Cells/mL) respectivamente, sin diferencias significativas al comparar los distintos co-cultivos ( $p > 0.05$ ).

Al realizar el análisis individual de las cinéticas de internalización de *H. pylori* en *C. albicans* se observó para todos los cultivos diferencias significativas en la concentración de levaduras portadoras de bacterias entre las 3 y 48 h de cultivo ( $p < 0.05$ ) para cada uno de los co-cultivos, lo que sugiere que entre las 3 y 48 h de incubación sigue produciéndose la internalización de células de *H. pylori* en células de *C. albicans* aumentando la concentración de levaduras portadoras de bacterias en el medio.



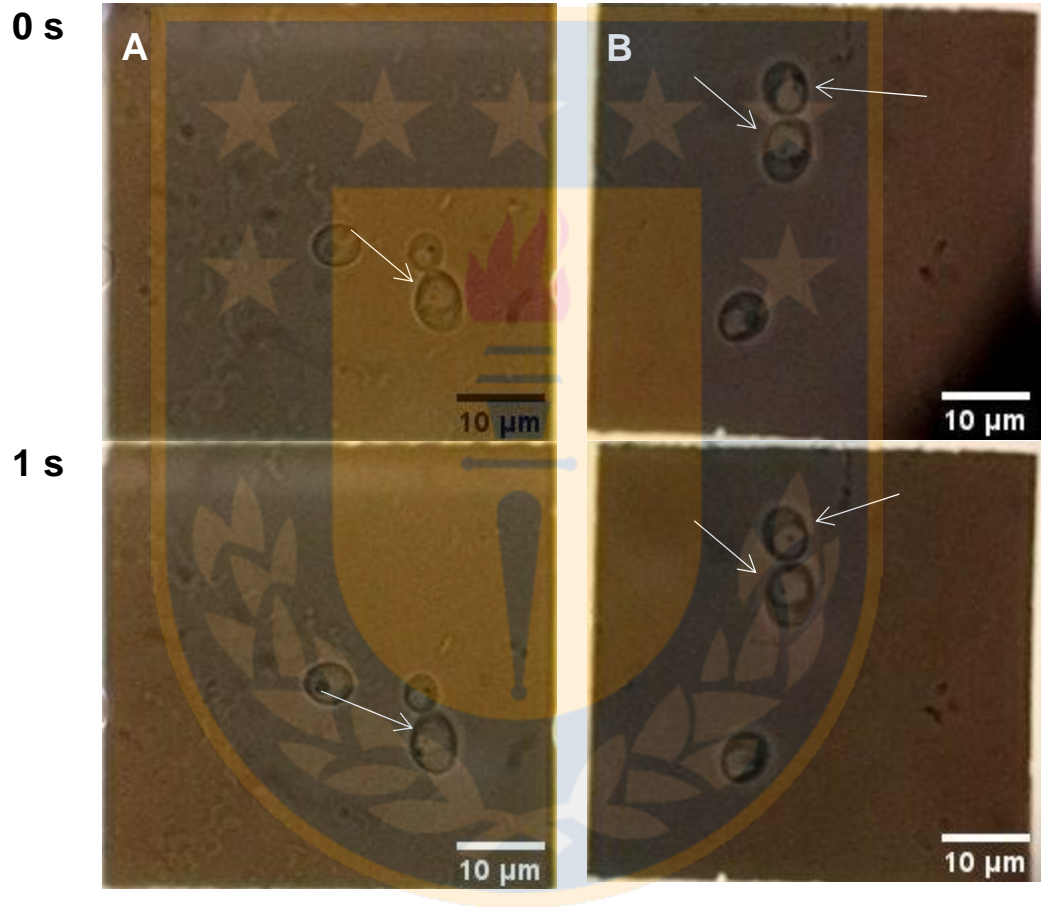
**Figura 2.** Internalización de cepas *H. pylori* en *C. albicans*. A) Porcentaje de levaduras portadoras de bacterias. B) Curvas de aparición de levaduras portadoras de bacterias en el tiempo. C: control; LT: levaduras totales; BLB: levaduras portadoras de bacterias.

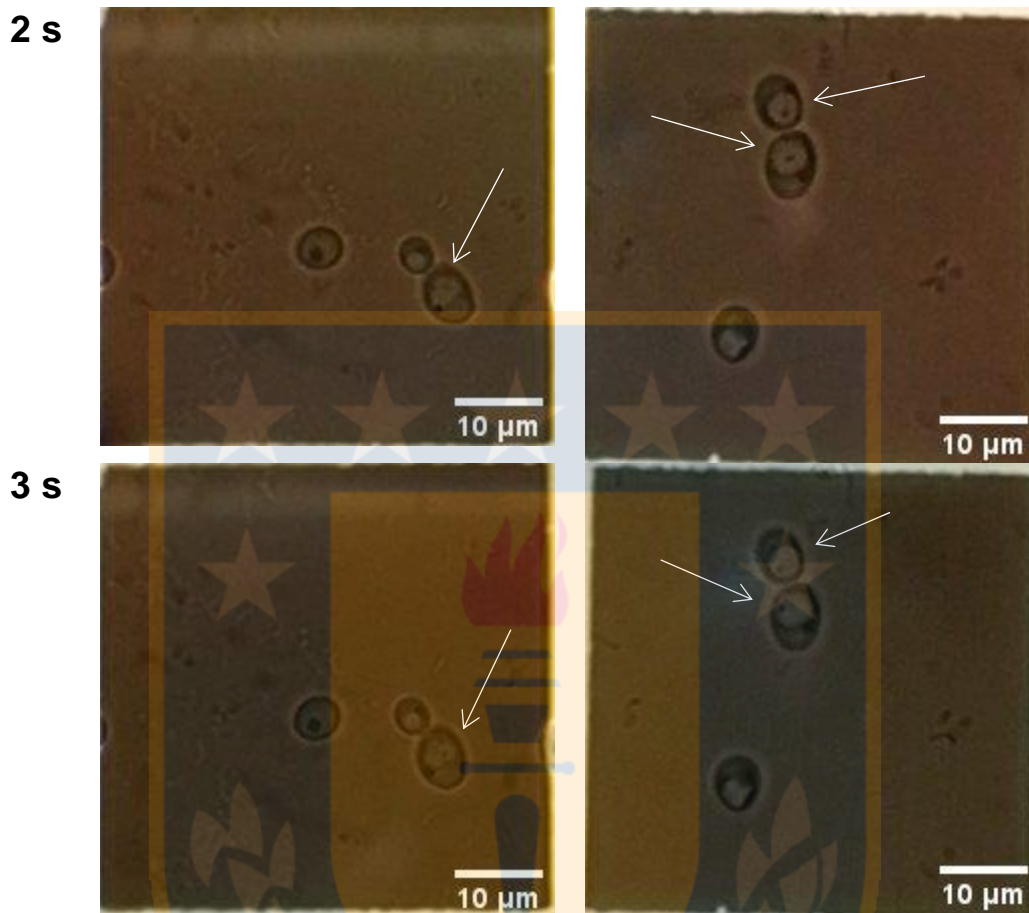
## 4.2. VIABILIDAD Y DETECCIÓN DE CEPAS DE *H. pylori* EN CÉLULAS DE *C. albicans*

Las figuras A y B de la figura 3, muestran el movimiento de cuerpos similares a bacterias en la vacuola de una célula de *C. albicans* en intervalos de 1 segundo en co-cultivos de 24 y 48 h de incubación respectivamente, lo que sugiere la viabilidad de *H. pylori* al interior de la célula de *C. albicans*. Para corroborar la viabilidad de las cepas *H. pylori* al interior de *C. albicans*, kit de viabilidad microbiana en co-cultivos de 48 h, observándose que dentro de las vacuolas del hongo se observan los cuerpos similares a bacterias de color verde (Fig. 4), lo que indica su viabilidad, el fluoróforo rojo indicativo de muerte celular sólo es observable en cuerpos extracelulares a la levadura, lo que sugiere la muerte de las células de *H. pylori* no internalizadas a las 48 h de co-cultivo. Además, al igual que en la figura 3 se observa el rápido movimiento de la bacteria al interior de la vacuola de la levadura para todos los co-cultivos a excepción del control (Fig. 4).

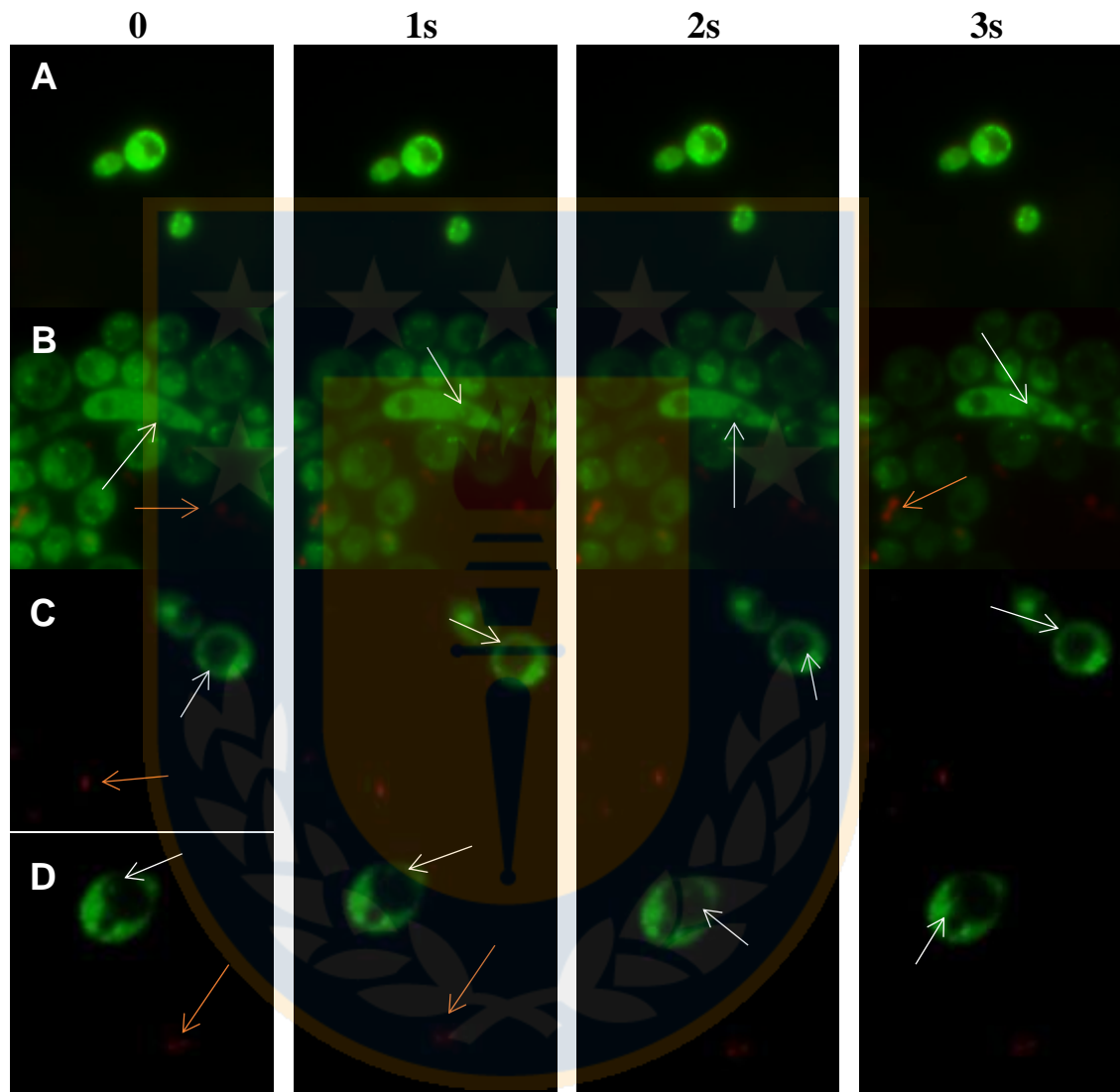
Por último, a través de la amplificación de genes específicos de *H. pylori* se determinó la presencia de la bacteria al interior de las células del hongo (Fig. 5-12). Se pudo corroborar que el perfil genético de las cepas de

*H. pylori* se mantuvo luego del proceso de internalización al compararlo con el ADN de control de cada una de las cepas (Tabla 2).





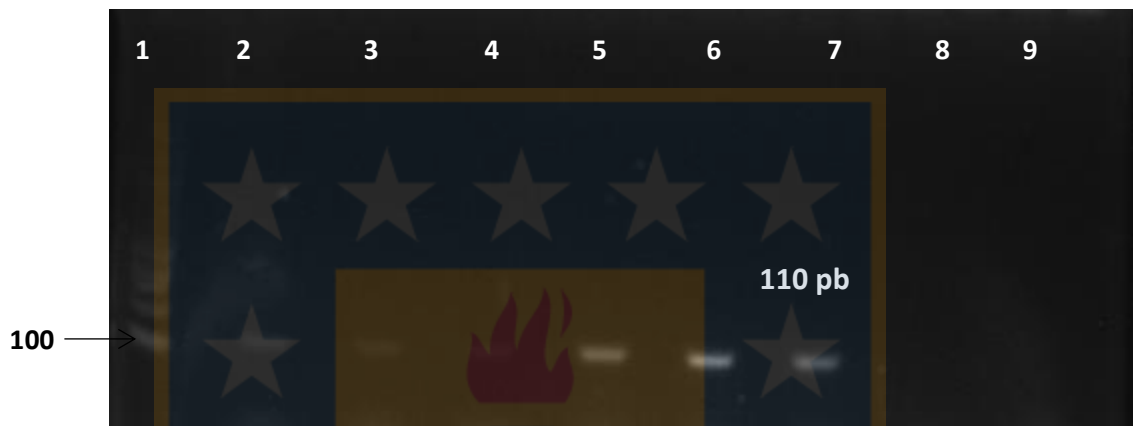
**Figura 3.** Observación en fresco de una célula de levadura portadora de bacteria en intervalos de un segundo a las A) 24 h de co-cultivo entre las cepas *H. pylori* J99 y *C. albicans* ATCC 10231 y B) a las 48 h de co-cultivo entre las cepas *H. pylori* G27 y *C. albicans* ATCC 10231. Flecha blanca indica presencia de cuerpo similar a bacteria moviéndose al interior de la célula de *C. albicans*. Las fotografías fueron tomadas en intervalos de 1 segundo.



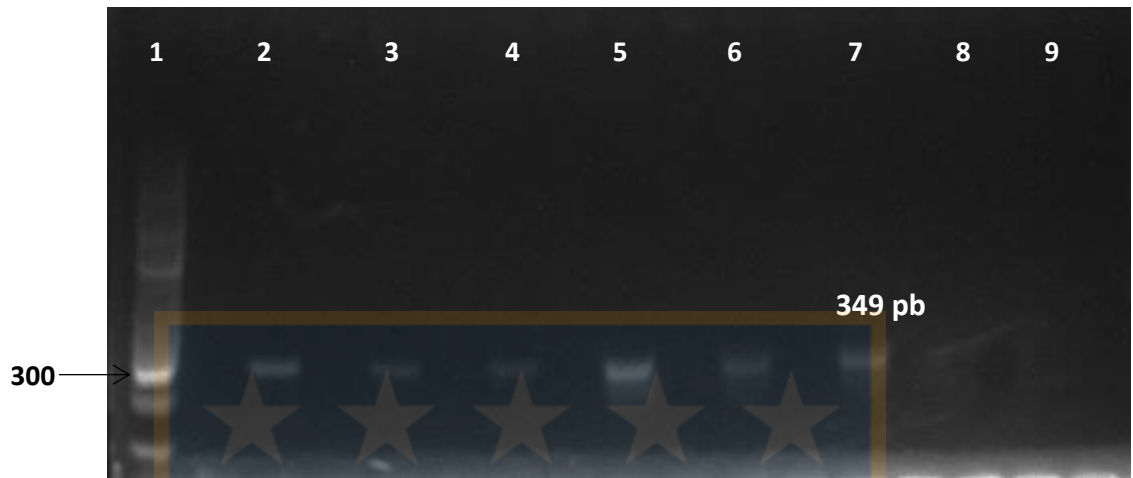
**Figura 4.** Viabilidad de cepas de *H. pylori* al interior de las vacuolas de la cepa ATCC 10231 de *C. albicans*. A) Control cepa de *C. albicans*. B) Co-cultivo entre la cepa J99 de *H. pylori* y *C. albicans*. C) Co-cultivo entre la cepa G27 de *H. pylori* y *C. albicans*. D) Co-cultivo entre la cepa SS1 de *H. pylori* y *C. albicans*. Flecha blanca indica



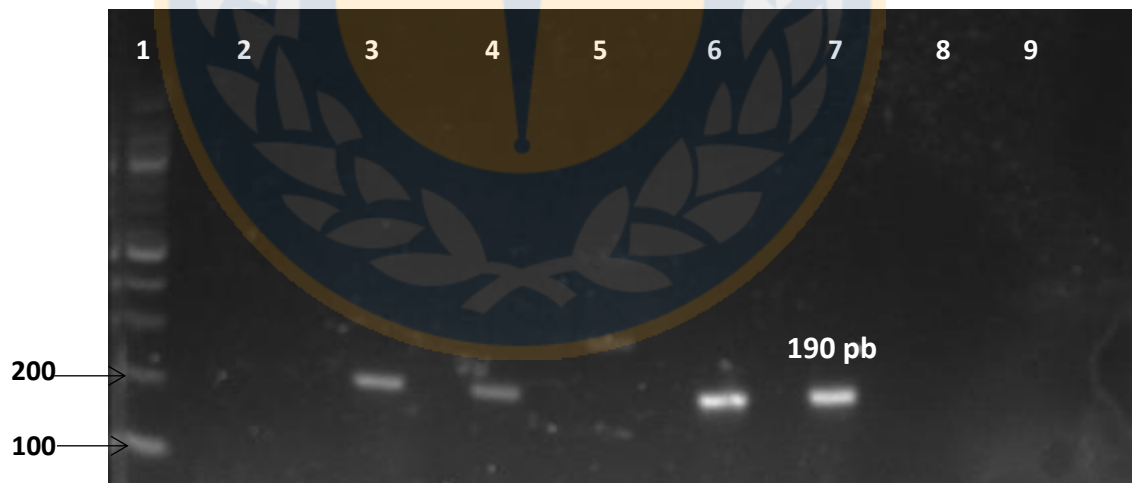
presencia de *H. pylori* viable en la vacuola de *C. albicans*. Flecha naranja indica presencia de células muertas.



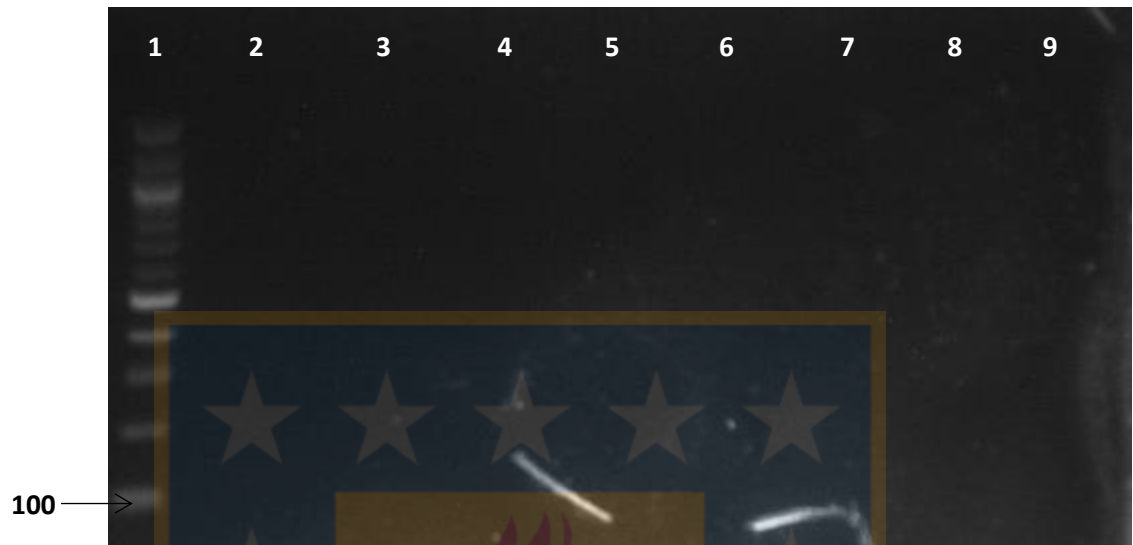
**Figura 5.** Detección gen *16S rRNA* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.



**Figura 6.** Detección gen *cagA* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.



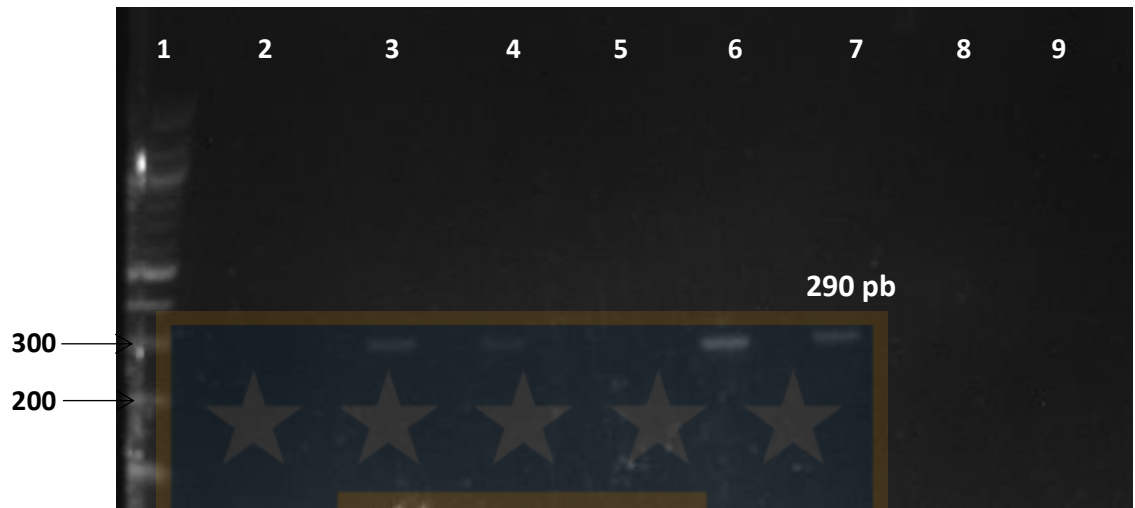
**Figura 7.** Detección gen *vacA s1a* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.



**Figura 8.** Detección gen *vacA s1b* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.



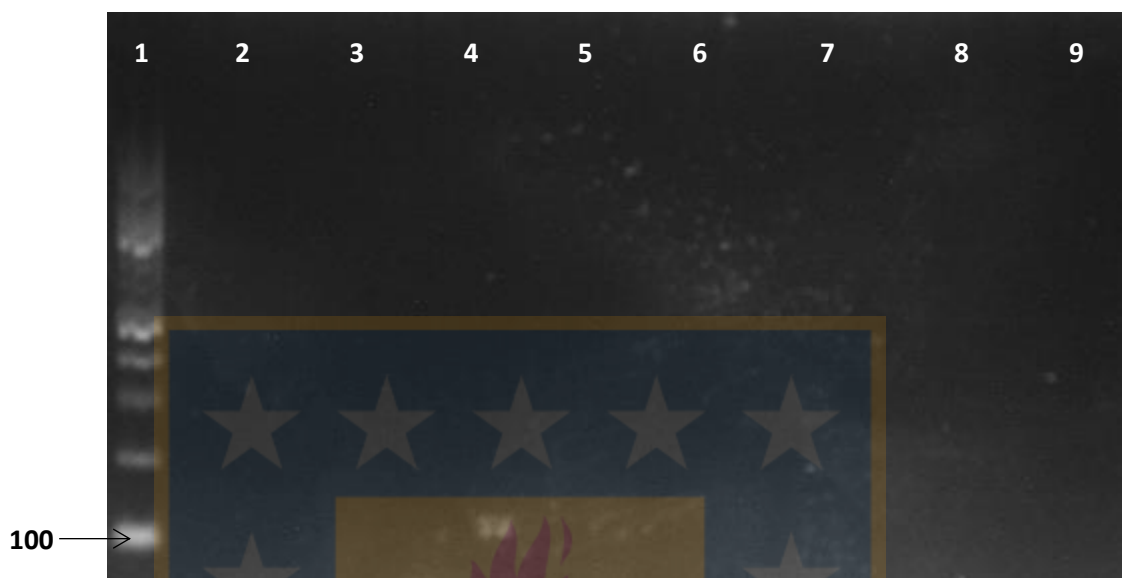
**Figura 9.** Detección gen *vacA s2* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.



**Figura 10.** Detección gen *vacA ml* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.



**Figura 11.** Detección gen *vacA m2* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.



**Figura 12.** Detección gen *dupA* de *H. pylori* en levaduras provenientes de cocultivos entre *C. albicans* ATCC 10231 (C-) y cepas de *H. pylori*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) C-SS1. 3) C-J99. 4) C-G27. 5) SS1. 6) J99. 7) G27. 8) Control negativo (ATCC 10231). 9) Blanco.

**Tabla 2.** Genotipificación de genes de *H. pylori* en levaduras portadoras de bacterias

Gen	Cepas <i>H. pylori</i>			Levaduras provenientes de co-cultivos			Control 10231
	SS1	J99	G27	C-SS1	C-J99	C-G27	
<i>16S rRNA</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>cagA</i>	+	+	+	+	+	+	-
<i>vacA s1a</i>	-	+	+	-	+	+	-
<i>vacA s1b</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>vacA s2</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>vacA m1</i>	-	+	+	-	+	+	-
<i>vacA m2</i>	+	-	-	+	-	-	-
<i>dupA</i>	-	-	-	-	-	-	-

+: Presencia del gen

-: Ausencia del gen

### **4.3. ENSAYO DE FILAMENTACIÓN EN CO-CULTIVOS ENTRE CEPAS DE *H. pylori* y *C. albicans* ATCC 10231**

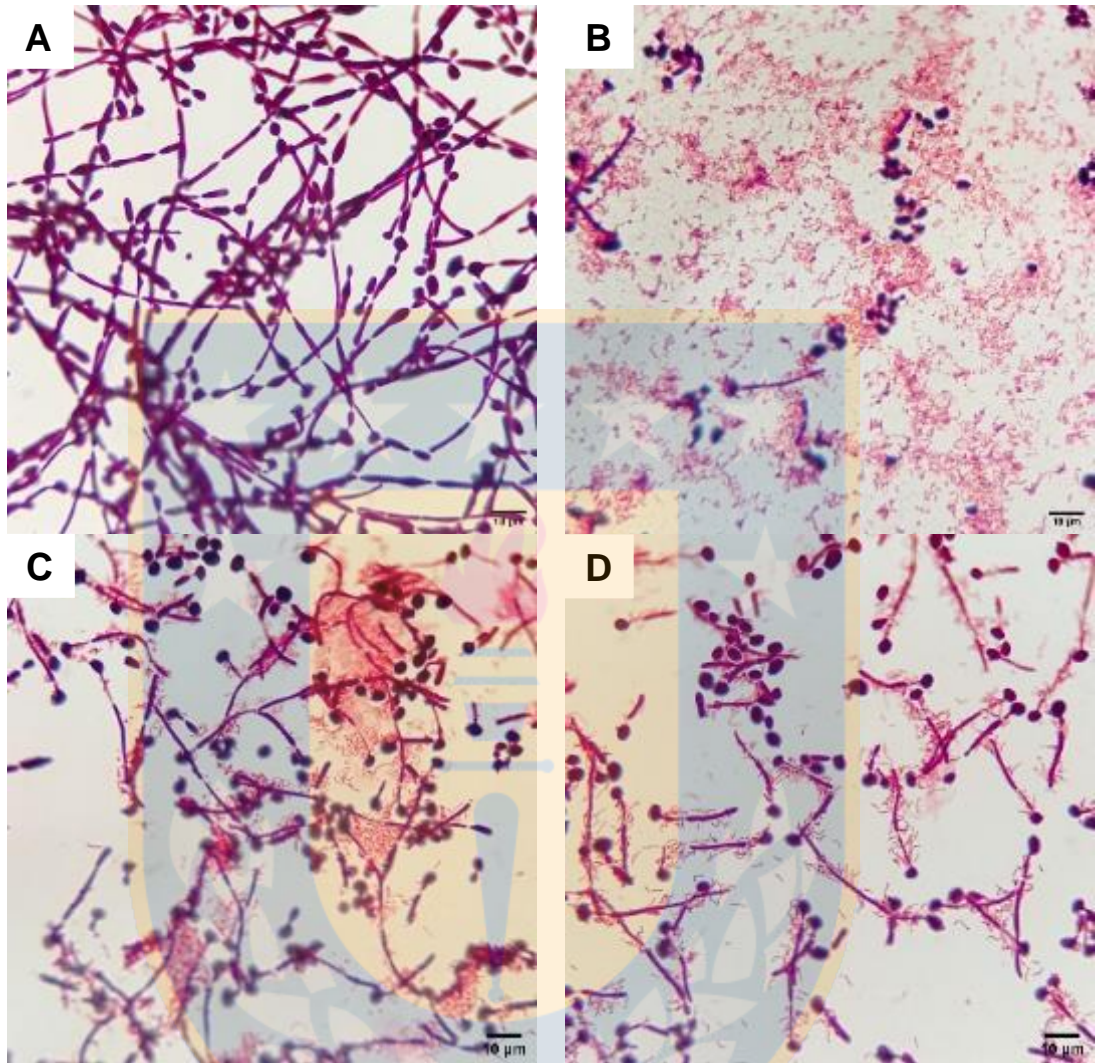
En la figura 13 se observan tinciones de Gram realizadas en los ensayos de filamentación para la cepa de *C. albicans* ATCC 10231 utilizando como inductor del cambio morfológico PBS 1X suplementado con 10% SFB. A simple vista se logra observar una mayor cantidad de hifas en el control comparado con los co-cultivos. Además, se observa, lo que parece ser una menor cantidad de adhesión de *C. albicans* en los co-cultivos comparado con el control. En la figura 13 B, también podemos observar que la cepa SS1 se adhiere preferentemente a la hifa de *Candida*, formándose un halo alrededor de la blastoconidia de *Candida*, lo que puede ser signo de inhibición de la adhesión de la bacteria en esta zona del hongo.

Para corroborar si *H. pylori* tuvo un efecto en el cambio morfológico de levadura a hifa en *C. albicans*, se tomaron alícuotas del sobrenadante de los co-cultivos y se contó el número de hifas presentes en 50 campos, utilizando cámara Neubauer, por cada una de las 4 réplicas por ensayo independiente. Al promedio del recuento de hifas por réplica se le otorgó un puntaje y se graficó (Fig. 14 A). De acuerdo con los resultados no se observaron diferencias estadísticas entre el control y los co-cultivos. Sin



embargo, en el control en varias réplicas el promedio de hifas fue mayor al de co-cultivos, lo que podría indicar una tendencia de *H. pylori* a inhibir el cambio morfológico de levadura a hifa inducido por SFB (Fig. 14 A).

Además, mediante análisis de imágenes de los co-cultivos adheridos a vidrio y teñidos por tinción de Gram, se determinó si *H. pylori* tuvo un impacto en el largo de las hifas de *C. albicans* y en la adhesión al determinar el porcentaje del área ocupada por las células de *Candida* en las fotografías del ensayo de filamentación (Fig. 14 B-C). Se encontró que el largo de las hifas fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) en el control comparado con los co-cultivos, siendo el promedio del largo de hifas en ausencia de *H. pylori* alrededor de 50  $\mu\text{m}$ , lo que en presencia de las cepas de *H. pylori* disminuyó alrededor de la mitad, lo que apoya que la presencia de *H. pylori* estaría inhibiendo la formación de hifas en *C. albicans* (Fig. 14 B). Junto con lo anterior en la gráfica de la figura 14 C, se observa además una disminución significativa del área de células de *C. albicans* adheridas a vidrio en el ensayo de filamentación, lo que sugiere que *H. pylori* no sólo inhibe la filamentación, sino que también inhibe la adhesión de *C. albicans* y por lo tanto la formación de biofilm producido por el hongo.



**Figura 13.** Desarrollo de hifas de *C. albicans* en PBS 1X suplementado con 10% de SFB, en solitario (control) y en co-cultivos entre la cepa de *C. albicans* 10231 y las cepas de *H. pylori* SS1, J99 y G27. Tinción de Gram (100x). A) Co-cultivo control 10231 + PBS 1X. B) 10231 + SS1. C) 10231 + J99. D) 10231 + G27.

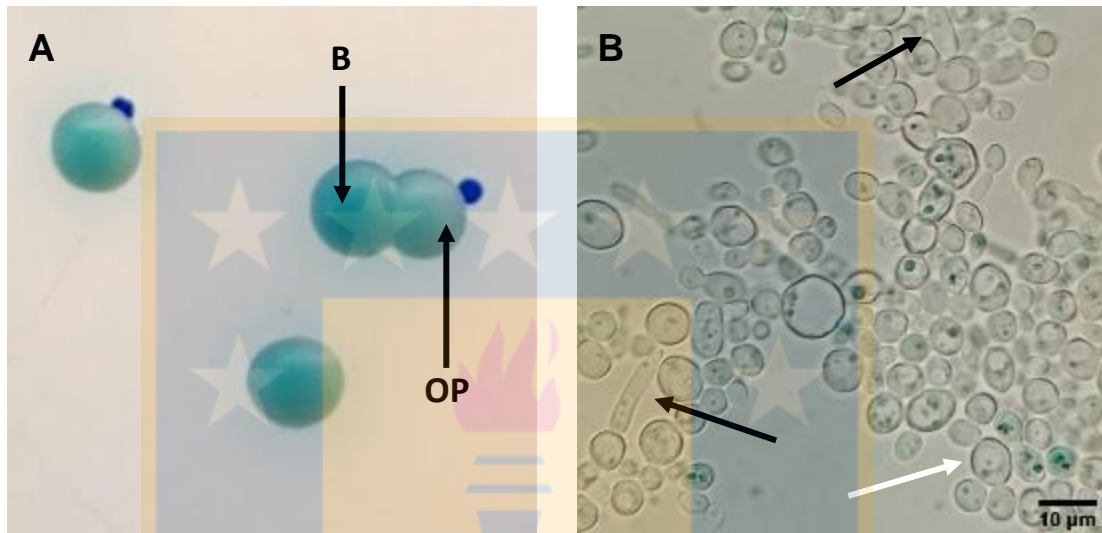


test). B) Promedio del largo de las hifas de *C. albicans* ATCC 10231, adheridas a portaobjeto. Letras a y b simbolizan diferencias significativas entre los grupos. ( $p < 0,0001$ ) (Kruskal-Wallis test). C) Promedio del porcentaje de área ocupado por células de *C. albicans* ATCC 10231. \*\* ( $p = 0,003$ ); \*\*\* ( $p < 0,0009$ ) (Ordinary one-way ANOVA test).

#### **4.4. CAMBIO FENOTÍPICO BLANCO-OPACO EN *C. albicans* EN CO-CULTIVOS CON *H. pylori*.**

En la figura 15 se pueden observar los cambios experimentados en las colonias de *C. albicans* ATCC 10231 luego de 3 días de cultivo, se observan colonias con el morfotipo blanco cuyas características macroscópicas en CHROMagar Candida, es la aparición de colonias color verde oscuro y brillantes (Fig. 15 A), la que a medida que aumentan los días de cultivo empieza a perder su coloración y brillo transformándose en una colonia de color verde claro, opaca (Fig. 15 A). A nivel microscópico este cambio fenotípico en las colonias de *C. albicans* también tiene cambios en la morfología del hongo (Fig. 15 B), donde se empieza observar la aparición de

células ovaladas y alargadas, como lo muestra la figura 15 B, flecha negra, morfología celular característica del morfotipo opaco.



**Figura 15.** Observación macroscópica y microscópica (montaje en fresco 100x) de cambio blanco opaco en la cepa de *C. albicans* ATCC 10231. A) Observación macroscópica de colonias de *C. albicans*, flecha indica zonas del morfotipo Blanco (B) y Opaco (OP) luego de 3 días de cultivo. B) Observación al fresco de colonia de fenotipo blanco con porciones opacas muestra presencia de levaduras con forma redonda (flecha blanca) y de células de levaduras de forma ovalada y alargadas (flecha negra).

Para determinar si la presencia de *H. pylori* tiene algún efecto sobre el cambio morfológico de blanco a opaco en *C. albicans* ATCC 10231, los co-cultivos se sometieron a incubaciones prolongadas y se determinó el porcentaje de colonias que presentaban fenotipo opaco y el porcentaje de colonias blancas que poseían una porción opaca. No se encontraron diferencias significativas entre el control y los co-cultivos con respecto a la frecuencia de aparición de los fenotipos opacos en los cultivos (Tabla 3). Sin embargo, en los co-cultivos la presencia de colonias de morfotipo blanco con porciones opacas, fue observable desde el segundo día de cultivo, al contrario que en el control donde este fenómeno sólo fue observable desde el tercer día de cultivo (Fig. 16).

En lo que respecta a la morfología celular de *C. albicans* no se observaron diferencia en los montajes en fresco al analizar las porciones blancas y opacas de las colonias, si se logró observar la aparición de células de gran tamaño, alrededor de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro en todas las muestras incluido el control (Fig. 17). Por último, en todos los co-cultivos de 5 días de incubación se logró observar levaduras que al interior de la vacuola se observaba el movimiento rápido de cuerpos, lo que indica la viabilidad de *H.*

*pylori* al interior de *C. albicans* incluso luego de una incubación prolongada (Fig. 18).

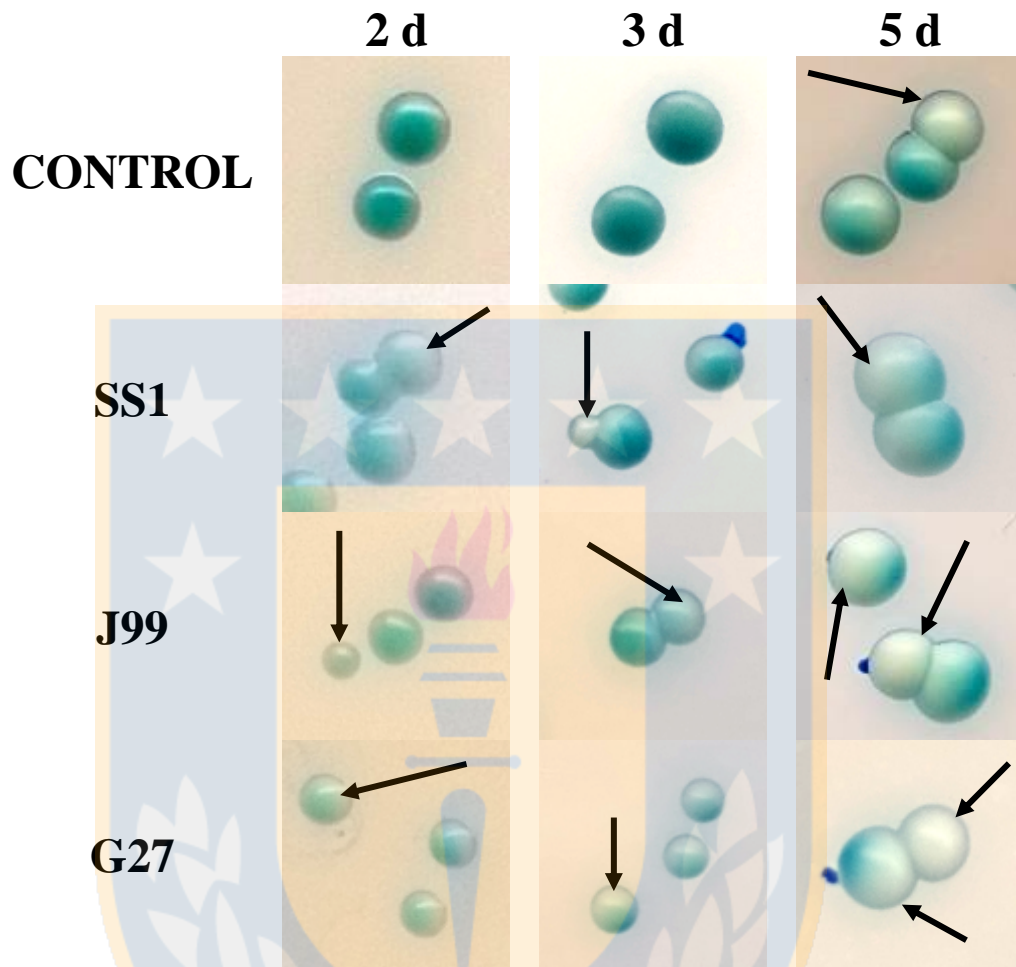
**Tabla 3.** Frecuencia de cambio fenotípico Blanco-Opaco en co-cultivo entre *C. albicans* y cepas de *H. pylori*

Cepas	Colonias Totales	3 días		5 días	
		Porcentaje colonias OP	Porcentaje colonias B-OP	Porcentaje colonias OP	Porcentaje colonias B-OP
Control	659	17,9 ± 6,384	54,5 ± 4,808	24,4 ± 7,637	75,2 ± 7,071
SS1	633	9,95 ± 6,107	68,6 ± 4,667	32,95 ± 6,435	67,05 ± 6,435
J99	476	14,3 ± 5,742	69,3 ± 0,141	22,8 ± 14,85	77,2 ± 14,85
G27	437	6,55 ± 6,988	76,7 ± 5,374	17,4 ± 2,97	82 ± 2,121

No se observaron diferencias significativas entre los grupos (Dunn's multiple comparisons test).

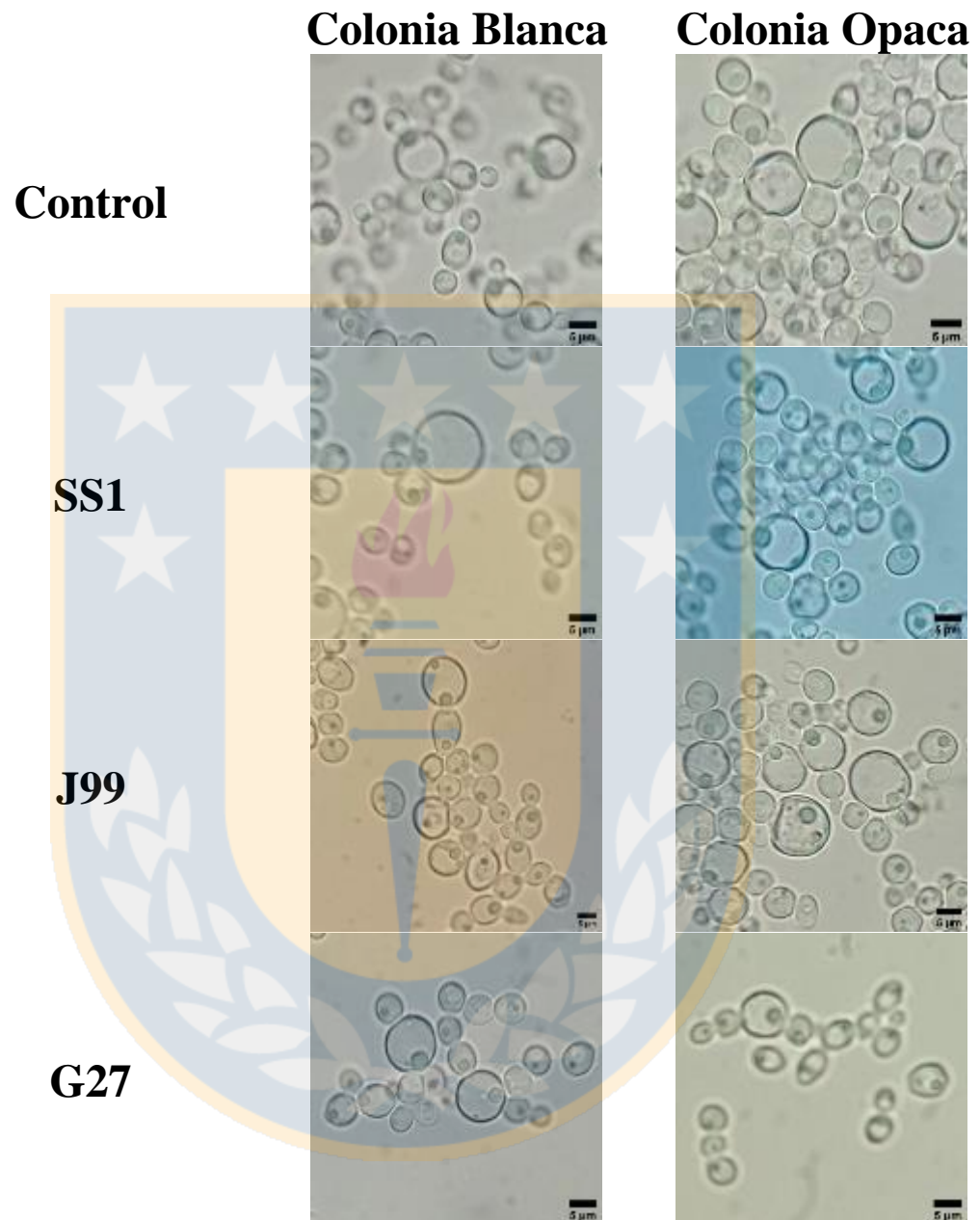
OP: Colonias con fenotipo opaco

B-OP: Colonias con fenotipo blanco que poseen una porción opaca

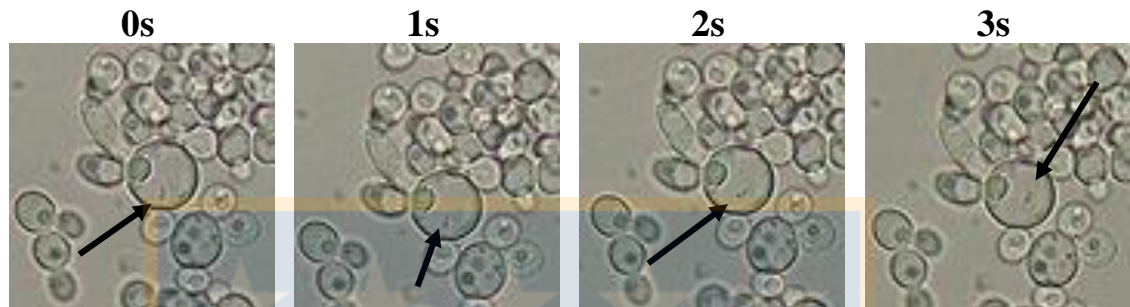


**Figura 16.** Evolución de fenotipo de colonias de levaduras portadoras de cepas de *H. pylori*. Flecha indica zonas de fenotipo opaco.





**Figura 17.** Morfología celular de *C. albicans* portadora de cepas de *H. pylori* en diferentes fenotipos de colonias, luego de 5 día de incubación.



**Figura 18.** Viabilidad de *H. pylori* al interior de *C. albicans* proveniente de una colonia de morfotipo blanco. Flecha indica movimiento de la bacteria al interior de la vacuola del hongo (Fotografía representativa).

## DISCUSIÓN

En este trabajo se estudió la capacidad de internalización de cepas de *H. pylori* en *C. albicans* y el efecto de la interacción entre estos microorganismos en la modulación de la morfología del hongo y viabilidad bacteriana.

La capacidad de *H. pylori* para internalizarse en células ha sido observado en biopsias gástricas y muestras de nodos linfáticos gástricos provenientes de pacientes con malestar gástrico, metaplasia, dispepsia, neoplasia y positivos para la infección por este patógeno (Y. Huang et al., 2016). Este fenómeno observado en humanos también ha sido observado en distintos modelos celulares pertenecientes a células epiteliales gástricas y no gástricas como las líneas celulares AGS, SGC-7901, GES-1, MKN45, Huh-7, HEp-2, HeLa, Caco-2 y MDCK (Y. Huang et al., 2016).

Sin embargo, las células humanas no son el único reservorio intracelular de esta bacteria patógena, ya que se ha detectado la presencia de *H. pylori* en vacuolas de levaduras aisladas de fuentes humanas como la

cavidad oral, vaginal y gastrointestinal (Matamala-Valdés et al., 2018; Sánchez-Alonzo, Matamala-Valdés, et al., 2021; Saniee et al., 2013) y no humanas como insectos, frutas y alimentos (Siavoshi et al., 2018).

Se ha observado que la internalización de *H. pylori* en levaduras estaría altamente influenciada por condiciones adversas para la supervivencia de la bacteria como la exposición a antibióticos, estrés por pH, temperatura y deficiencia de nutrientes (Sánchez-Alonzo, Arellano-Arriagada, et al., 2021; Sánchez-Alonzo, Belmar, et al., 2021; Sánchez-Alonzo et al., 2020; Sánchez-Alonzo, Silva-Mieres, et al., 2021). En este caso el medio utilizado para la realización del co-cultivo fue PBS 1X, un medio que se puede considerar deficiente en nutrientes, siendo los resultados muy similares a los obtenidos en un estudio previo donde se realizaron los co-cultivos en solución salina observándose entre un 8 y 10% de levaduras portadoras de bacterias (Sánchez-Alonzo et al., 2021), lo que se compara con la población de levaduras portadoras de bacterias de alrededor del 10% observado en este estudio.

De acuerdo con literatura previa la capacidad invasiva de *H. pylori* varía dependiendo de la cepa y el tipo de célula huésped, según datos

existentes hasta el momento, sólo entre el 0.01 y 0.1% de las células bacterianas inoculadas es capaz de invadir a las células huésped (Huang et al., 2016). Si consideramos que en este estudio el co-cultivo inicial entre *C. albicans* y *H. pylori* tenía una concentración inicial de bacterias de  $6 \times 10^8$  (células/mL) y al finalizar las 48 h de co-cultivo se observó una concentración promedio de células de levaduras portadoras de bacterias de  $1 \times 10^6$  (células/mL), la tasa de internalización de *H. pylori* en *C. albicans* sería del 0.166% bajo estas condiciones de cultivo, tasa similar a la indicada por autores en ensayos realizados en líneas celulares humanas.

Otro punto interesante a analizar es que no se observó diferencias significativas al comparar la concentración de L-PB entre las distintas cepas de *H. pylori* a las 48 h de cultivo, significando esto que no es un fenómeno cepa dependiente bajo estas condiciones, igual a lo observado por Sánchez-Alonzo et al., 2021. Sin embargo, si se encontraron diferencias en la concentración L-PB a las 3 h de co-cultivo, siendo el co-cultivo entre las cepas ATCC 10231 y SS1, el que presentaba una mayor internalización en este tiempo, por lo que podemos suponer que la cepa SS1 posee una mayor velocidad de internalización, pero al igual que las otras cepas de *H. pylori*

ensayadas al llegar a la concentración de  $10^6$  células/mL de L-PB, la internalización se detiene.

El método utilizado para la cuantificación de la internalización de *H. pylori* en la levadura se basa en el hecho de que mediante montaje en fresco al microscopio óptico de los co-cultivos es posible observar el rápido movimiento de los denominados “cuerpos similares a bacterias” al interior de la vacuola del hongo, y que esto a su vez es señal de la viabilidad bacteriana. Sin embargo, este método trae consigo ciertas complicaciones que se deben replantear en futuras investigaciones para robustecer la cuantificación de la tasa de internalización de *H. pylori* en la levadura.

Una de las complicaciones es el hecho de que la acumulación de complejos polifosfatados al interior de las vacuolas también presentan movimientos brownianos y se puede observar al realizar montajes en fresco al microscopio óptico, por lo que pueden ser confundidos con la presencia de bacterias al interior de la célula fúngica; aunque este fenómeno ha sido informado en *Cryptococcus humicola* y *Saccharomyces cerevisiae* (Breus et al., 2012; Kharchuk et al., 2019; Puchkov, 2010), es necesaria la búsqueda

de metodologías de marcaje que permitan diferenciar estos fenómenos en *Candida* ya que igual podrían estar sucediendo.

En la investigación presentada en esta tesis, se puede sugerir que este fenómeno no significó problemas en el recuento de la internalización, debido a que en el control no se observó la presencia de cuerpos similares a bacterias al interior de la vacuola de *C. albicans*. Sin embargo, como el fenómeno de visualización de estos gránulos polifosfatados depende de las condiciones de cultivo, si pudiese llegar a ser confundente bajo otras condiciones de investigación.

En lo que respecta a la metodología empleada para el recuento, el uso de la cámara Neubauer para la cuantificación de levaduras portadoras de bacterias dentro de una población de levaduras permitió establecer una tasa de internalización algo que no se había logrado establecer en investigaciones anteriores realizadas por el grupo de investigación, esto permite entender cuál es el real alcance de este fenómeno dentro de una población bacteriana, lo cual podría estar replicándose en su hábitat normal. Además, al transformar estos resultados en porcentaje de internalización, los datos fueron consistentes con lo observado en investigaciones previas bajo condiciones

similares (Sánchez-Alonzo, Silva-Mieres, et al., 2021). Sin embargo, un problema que tiene este método de recuento es la baja sensibilidad a bajas concentraciones microbianas, siendo  $10^5$  células/mL la concentración mínima cuantificable mediante este método, lo impide determinar en qué momento comienza la internalización de una bacteria en una célula fúngica.

Otro punto abordado en esta tesis fue el analizar si la presencia de *H. pylori* juega algún rol en la morfología del hongo, se pudo determinar que la bacteria tiene la capacidad de inhibir la formación de hifas en *C. albicans*, varios son los estudios que han reportado este fenómeno en otras bacterias.

La capacidad para inhibir la formación de hifas en *C. albicans* se ha reportado en bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*, cuyo mecanismo se basa en la liberación de metabolitos con capacidad antifúngica y la regulación negativa de genes involucrados en la transición morfogénica levadura-hifa en el hongo (Wang et al., 2017; Rossoni et al., 2018; de Barros et al., 2018; Allonsius et al., 2019; Jang et al., 2019; MacAlpine et al., 2021); en cepas de *Streptococcus salivarius*, las subespecies *thermophilus* y *Streptococcus mitis* las cuales inhiben la formación del tubo germinal y el cambio morfológico (Azad et al., 2021; do Rosário Palma et al., 2019;



Mokhtar et al., 2021). Esta capacidad no sólo ha sido observada en potenciales cepas probióticas o bacterias reconocidas como comensales, también ha sido observado en algunas bacterias patógenas como es el caso de la bacteriocina EntV de *Enterococcus faecalis*, la cual se ha determinado que es necesaria y suficiente para la reducción de la virulencia de *C. albicans* y la formación de biopelículas a través de la inhibición de la formación de hifas (Graham et al., 2017); o la presencia de *Porphyromonas gingivalis* que inhibe la formación de hifas en biopelículas polimicrobianas con bacterias orales, incluso existiendo la presencia de bacterias que promueven el cambio morfológico en *C. albicans* (Morse et al., 2019); y, uno de los ejemplos más documentados es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* la cual inhibe la formación de hifas en *C. albicans*, teniendo como consecuencia la disminución en el escape y la sobrevivencia del hongo al ser fagocitado por macrófagos (Salvatori et al., 2020). Con estos antecedentes es que surge el cuestionamiento de si la interacción entre *H. pylori* y *C. albicans* es de tipo mutualista, comensalismo o si estamos en presencia de un parasitismo por parte de la bacteria donde es la única beneficiada de esta interacción.

Otro punto interesante para discutir es la diferencia existente en los resultados en los ensayos de filamentación cuando se analiza el sobrenadante

de los co-cultivos, comparado con los co-cultivos adheridos al vidrio, donde en el primero no se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos, mientras si se encontraron diferencias significativas en el segundo análisis, sugiriendo la inhibición de la filamentación y de la adhesión, lo que podría provocar la disminución de la formación de biopelículas en el hongo. Este fenómeno podría darnos ideas del mecanismo implicado en la inhibición de la filamentación en *C. albicans* debido a la presencia de *H. pylori*.

Es conocido que la adhesión de *H. pylori* a las células huésped está mediado por la presencia de colesterol (Hsu et al., 2021), a pesar que la célula fúngica no posee colesterol si posee un análogo de éste que es el ergosterol y se ha propuesto que en el caso de la interacción con *Candida*, la bacteria podría estar usando el ergosterol como análogo del colesterol. Sin embargo, esta hipótesis aún no ha sido comprobada (Siavoshi, 2014). Al utilizar la bacteria el ergosterol proveniente de *Candida* esto podría disminuir los niveles de adhesión y por lo tanto, el desarrollo de la biopelícula fúngica ya que se ha demostrado ser dependiente de los niveles de ergosterol (Alim et al., 2018). Otro punto interesante es que la enzima que transforma el colesterol de célula en derivados de colesteril glucósido; la colesteril

glucotransferasa (CGAT), es capaz de aumentar la internalización de *H. pylori* en células AGS al aumentar la respuesta de autofagia (Muthusamy et al., 2021), que es un fenómeno que podría también estar afectando la internalización y la inhibición del cambio morfológico en *C. albicans*, ya que, la enzima CGAT se secreta a través de vesículas (Jan et al., 2020). Se ha informado que la presencia de vesículas extracelulares puede inhibir la formación de biopelículas y el cambio morfológico en *C. albicans in vitro*, aunque esto sólo se ha realizado con vesículas extracelulares de hongos (Honorato et al., 2022), igual es una aproximación interesante para explicar cómo es que *H. pylori* disminuye la elongación de las hifas y la adhesión de éstas. Además, siguiendo con la idea de la utilización de esta vía para que la bacteria pueda internalizarse en *C. albicans* se ha observado que el aumento de la endocitosis puede inhibir el alargamiento de las hifas (Bar-Yosef et al., 2018), que es justamente lo que se ha observado en la interacción entre estos microorganismos en esta investigación. Por lo que *H. pylori* al inhibir la adhesión y el alargamiento de hifas por sobre la iniciación del cambio morfológico, es que podría estar aumentando la concentración de células fúngicas que presentan el tubo germinal en el sobrenadante, provocando esta diferencia en los resultados.

Basados en esta premisa es que sería interesante utilizar un inhibidor de la enzima CGAT de *H. pylori*, como lo es la droga amiodarone (Jan et al., 2020), en co-cultivos con *C. albicans* en presencia de suero y ver si disminuye la adhesión de la bacteria al hongo, si disminuye la internalización y si aumenta la adhesión del hongo para la formación de biopelículas, ya que esto sería suficiente para determinar si esta enzima cumple un rol en el proceso de internalización y en los cambios morfológicos presentados durante la interacción entre *H. pylori* y *C. albicans*.

En lo que concierne al estudio de los cambios fenotípicos en *C. albicans* debido a la interacción con cepas de *H. pylori*, es necesario establecer que fluctuaciones nutricionales en el ambiente provocan heterogenicidad fenotípica en poblaciones microbianas que en un inicio provienen de una misma célula madre, transformándolas en comunidades multicelulares donde cada fenotipo muestra una especialización funcional que promueve la supervivencia frente a estas alteraciones en el ambiente (Varahan & Laxman, 2021). Esta heterogeneidad fenotípica ha sido especialmente estudiada en el caso de los hongos donde por ejemplo cuando hablamos de *C. albicans* podemos encontrar en muchas ocasiones

transiciones levadura-hifa o blanco-opaco en un mismo cultivo (Varahan & Laxman, 2021).

En el caso de este estudio *C. albicans* fue sometida a condiciones de hambruna durante los co-cultivos con las cepas de *H. pylori* y posteriormente sembrada en ChromAgar Candida para determinar cambios fenotípicos en el hongo debido a la previa interacción con la bacteria. Sin embargo, a pesar de que se observó una diferencia fenotípica en las colonias de *C. albicans* que aumentaba con el tiempo de cultivo, esto no estuvo en concordancia con lo observado en los montajes en fresco, donde no se observó la aparición de células opacas y sólo se observó el aumento en la cantidad de células del hongo de morfología redondeada y de gran tamaño (alrededor de 10  $\mu\text{m}$ ), por lo que, en este caso las alteraciones nutricionales a las cuales fue sometida la levadura no tuvo los efectos descritos previamente en literatura que afirman que este cambio es inducido por alteraciones en las fuentes de carbono (Vico et al., 2021).

Lo que se puede sugerir al respecto, es que el cambio de ambiente desde PBS a ChromoAgar Candida experimentado por el hongo pudo haber alterado la regulación del fenómeno de transición blanco-opaco, y es que esta

transición morfológica es controlada por al menos 8 reguladores transcripcionales, los cuales controlan el equilibrio entre los estados blanco y opaco, que tienen distintos perfiles transcripcionales y propiedades fisiológicas, lo que ha sugerido que este proceso está controlado por mecanismos epigenéticos independientes de cambios en la secuencia de ADN del hongo (Beekman et al., 2021) y el hecho de estar gobernado por cambios epigenéticos hace a este fenómeno más susceptible a los cambios en el microambiente de cultivo. Aun así, las levaduras provenientes desde cocultivos con *H. pylori* mostraron una diferencia fenotípica de sus colonias un día antes que el control sin interactuar con la bacteria, esto hace suponer que a pesar de que la interacción de *C. albicans* con *H. pylori* no está aparentemente relacionado con el cambio blanco-opaco, si puede estar relacionado con la aceleración de transición a otro fenotipo en *C. albicans*. Sin embargo, es necesario realizar estudios en la expresión de genes del hongo bajo estas condiciones para poder determinar con que procesos está relacionado este cambio en el fenotipo de las colonias. A nivel morfológico, este cambio fenotípico en las colonias de *C. albicans* conllevó a la aparición de células de gran tamaño de alrededor de 10  $\mu\text{m}$ , cuando se observaron los montajes en fresco, con respecto a este fenómeno se ha observado que la

privación de zinc provoca en cultivos de *C. albicans* la aparición de levaduras esféricas agrandadas, fenotipo que ha sido denominado Goliath (Malavia et al., 2017), entre las características de este fenotipo esta su volumen celular el cual en promedio es de  $146 \mu\text{m}^3$ , siendo el de una levadura regular entre  $28\text{--}35 \mu\text{m}^3$ , presentan una filamentación retardada comparado con levadura normales frente a inductores de la filamentación, exhiben una composición alterada de la pared celular, asociada con una mayor exposición a la quitina y presentan una capacidad de adhesión aumentada comparado con levaduras de tamaño regular (Malavia et al., 2017), si la exposición de la levadura a cepas de *H. pylori* realmente está acelerando la transición hacia un fenotipo Goliath es algo que se debe seguir estudiando bajo distintas condiciones nutricionales para determinar que el gatillante es realmente la presencia de la bacteria y no las condiciones de cultivo, aun así los resultados obtenidos sugieren una aceleración de este proceso en las levaduras provenientes de co-cultivos con *H. pylori*.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio permiten concluir que la interacción entre cepas de *H. pylori* y *C. albicans* no difiere de lo señalado en literatura con respecto a las interacciones entre este hongo y otras especies bacterianas.

Se demostró que la interacción interreinos entre *C. albicans* y *H. pylori* conlleva a la inducción de dos fenómenos: 1) La internalización de la bacteria en las vacuolas del hongo y 2) La inhibición de la filamentación en *C. albicans*. Además, a la posible inducción de un tercer fenómeno que es la aceleración de la transición de la levadura a un fenotipo Goliath.

En lo que concierne al fenómeno de internalización de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo este fenómeno ocurre en una baja tasa, siendo no más del 0,1% de las células de *H. pylori* capaces de internalizarse bajo las condiciones ensayadas. Además, este fenómeno se manifiesta independiente de si la morfología presentada por el hongo es levadura o hifa,



observándose la viabilidad de la bacteria al interior de la vacuola de *C. albicans* en ambas situaciones.

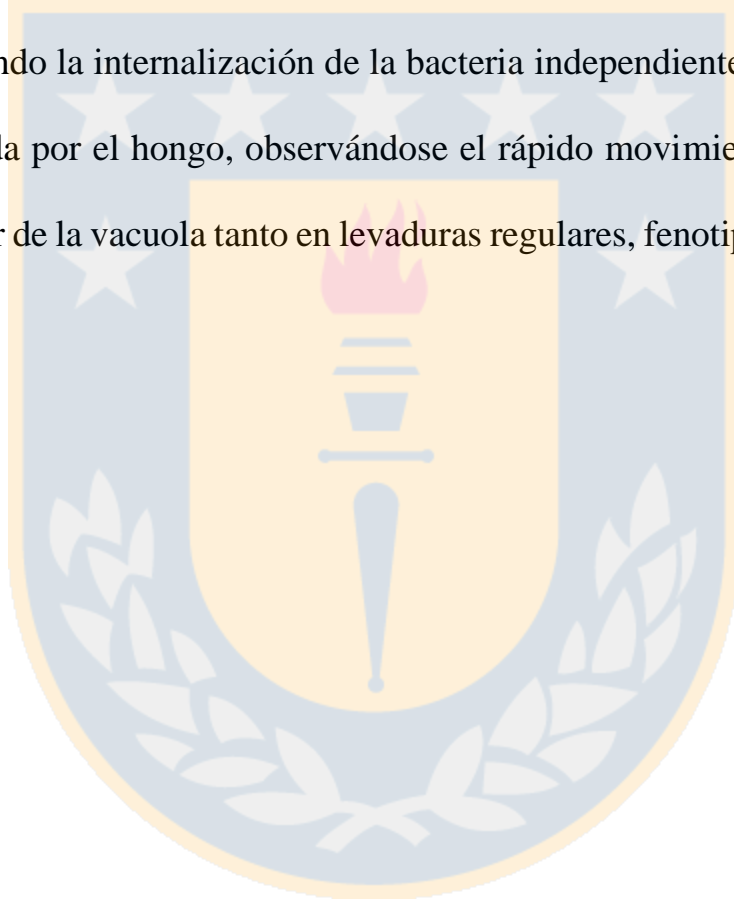
En el caso de la inhibición de la filamentación de *C. albicans* por *H. pylori* en presencia de SFB, se demostró que la interacción entre estos dos microorganismos provoca una disminución en la elongación del tamaño de las hifas del hongo y que además esta interacción podría estar afectando la capacidad de adhesión de las hifas del hongo en superficies inertes como el vidrio.

Por otro lado, no fue posible correlacionar la capacidad de internalización de *H. pylori* con su capacidad de inhibir la producción de hifas en *C. albicans*, tampoco se observó relación alguna entre la interacción entre estos microorganismos y la tasa de aparición del fenotipo opaco en *C. albicans*.

Por lo que es necesario probar nuevos acercamientos metodológicos que permitan dilucidar el real efecto de la internalización de *H. pylori* en los cambios morfológicos de *C. albicans*.

Sin embargo, también se puede concluir que en condiciones de co-cultivo carentes de nutrientes la interacción entre *H. pylori* y *C. albicans*

estaría promoviendo la transición hacia un fenotipo Goliath en la levadura, mientras que en condiciones de co-cultivo en presencia de suero la interacción entre *H. pylori* y *C. albicans* estaría inhibiendo la transición levadura-hifa en el hongo. Además, bajo estas dos condiciones se está produciendo la internalización de la bacteria independiente de la morfología presentada por el hongo, observándose el rápido movimiento de la bacteria al interior de la vacuola tanto en levaduras regulares, fenotipo Goliath e hifas.



## REFERENCIAS

- Alam, F., Catlow, D., Di Maio, A., Blair, J. M. A., & Hall, R. A. (2020). *Candida albicans* enhances meropenem tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in a dual-species biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(4), 925-935. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz514>
- Alim, D., Sircaik, S., & Panwar, S. L. (2018). The Significance of Lipids to Biofilm Formation in *Candida albicans*: An Emerging Perspective. *Journal of Fungi*, 4(4), 140. <https://doi.org/10.3390/jof4040140>
- Allonsius, C. N., Vandenheuvel, D., Oerlemans, E. F. M., Petrova, M. I., Donders, G. G. G., Cos, P., Delputte, P., & Lebeer, S. (2019). Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Scientific Reports*, 9, 2900. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39625-0>
- Andes, D. R., Safdar, N., Baddley, J. W., Alexander, B., Brumble, L., Freifeld, A., Hadley, S., Herwaldt, L., Kauffman, C., Lyon, G. M., Morrison, V., Patterson, T., Perl, T., Walker, R., Hess, T., Chiller, T., Pappas, P. G., & Investigators, T. T. (2016). The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Transplant Infectious Disease*, 18(6), 921-931. <https://doi.org/10.1111/tid.12613>
- Ansorg, R., & Schmid, E. N. (1998). Adhesion of *Helicobacter pylori* to yeast cells. *Zentralblatt Für Bakteriologie*, 288(4), 501-508. [https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(98\)80069-8](https://doi.org/10.1016/S0934-8840(98)80069-8)
- Azad, A., Ranjbaran, A., Zareshahrabadi, Z., Mehrabani, D., Zahed Zahedani, M., Talebanpour, A., & Zomorodian, K. (2021). Protective Effects of the Probiotic Bacterium *Streptococcus thermophilus* on

- Candida albicans* Morphogenesis and a Murine Model of Oral Candidiasis. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 46(3), 207-217. <https://doi.org/10.30476/ijms.2020.82080.0>
- Barbosa, J. O., Rossoni, R. D., Vilela, S. F. G., Alvarenga, J. A. de, Velloso, M. dos S., Prata, M. C. de A., Jorge, A. O. C., & Junqueira, J. C. (2016). *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *Candida albicans*. *PLOS ONE*, 11(3), e0150457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150457>
- Bartnicka, D., Gonzalez-Gonzalez, M., Sykut, J., Koziel, J., Ciaston, I., Adamowicz, K., Bras, G., Zawrotniak, M., Karkowska-Kuleta, J., Satala, D., Kozik, A., Zyla, E., Gawron, K., Lazarz-Bartyzel, K., Chomyszyn-Gajewska, M., & Rapala-Kozik, M. (2020). *Candida albicans* Shields the Periodontal Killer *Porphyromonas gingivalis* from Recognition by the Host Immune System and Supports the Bacterial Infection of Gingival Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1984. <https://doi.org/10.3390/ijms21061984>
- Bartnicka, D., Karkowska-Kuleta, J., Zawrotniak, M., Satala, D., Michalik, K., Zielinska, G., Bochenska, O., Kozik, A., Ciaston, I., Koziel, J., Dutton, L. C., Nobbs, A. H., Potempa, B., Baster, Z., Rajfur, Z., Potempa, J., & Rapala-Kozik, M. (2019). Adhesive protein-mediated cross-talk between *Candida albicans* and *Porphyromonas gingivalis* in dual species biofilm protects the anaerobic bacterium in unfavorable oxic environment. *Scientific Reports*, 9(1), 4376. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40771-8>
- Bar-Yosef, H., Gildor, T., Ramírez-Zavala, B., Schmauch, C., Weissman, Z., Pinsky, M., Naddaf, R., Morschhäuser, J., Arkowitz, R. A., & Kornitzer, D. (2018). A Global Analysis of Kinase Function in *Candida albicans* Hyphal Morphogenesis Reveals a Role for the Endocytosis Regulator Akl1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 17. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00017>
- Beekman, C. N., Cuomo, C. A., Bennett, R. J., & Ene, I. V. (2021). Comparative genomics of white and opaque cell states supports an epigenetic mechanism of phenotypic switching in *Candida albicans*. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 11(2), jkab001. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab001>

- Böttcher, B., Pöllath, C., Staib, P., Hube, B., & Brunke, S. (2016). *Candida* species Rewired Hyphae Developmental Programs for Chlamyospore Formation. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01697>
- Breus, N. A., Ryazanova, L. P., Dmitriev, V. V., Kulakovskaya, T. V., & Kulaev, I. S. (2012). Accumulation of phosphate and polyphosphate by *Cryptococcus humicola* and *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of nitrogen. *FEMS Yeast Research*, 12(6), 617-624. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00812.x>
- Bruno, D. do C. F., Bartelli, T. F., Rodrigues, C. R., & Briones, M. R. S. (2018). Prolonged growth of *Candida albicans* reveals co-isolated bacteria from single yeast colonies. *Infection, Genetics and Evolution*, 65, 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.021>
- Cavalcanti, I. M. G., Nobbs, A. H., Ricomini-Filho, A. P., Jenkinson, H. F., & Del Bel Cury, A. A. (2016). Interkingdom cooperation between *Candida albicans*, *Streptococcus oralis* and *Actinomyces oris* modulates early biofilm development on denture material. *Pathogens and Disease*, 74(3), ftw002. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw002>
- Chen, H., Zhou, X., Ren, B., & Cheng, L. (2020). The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*, 11(1), 337-348. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1748930>
- Cottier, F., & Hall, R. A. (2020). Face/Off: The Interchangeable Side of *Candida Albicans*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00471>
- Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). *Candida albicans*—Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, 117, 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028>
- Dash, N. R., Khoder, G., Nada, A. M., & Bataineh, M. T. A. (2019). Exploring the impact of *Helicobacter pylori* on gut microbiome composition. *PLOS ONE*, 14(6), e0218274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218274>
- de Barros, P. P., Scorzoni, L., Ribeiro, F. de C., Fugisaki, L. R. de O., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., Jorge, A. O. C., Junqueira, J. C., & Rossoni, R. D. (2018). *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an

- experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microbial Pathogenesis*, 117, 80-87.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.019>
- do Rosário Palma, A. L., Domingues, N., de Barros, P. P., Brito, G. N. B., & Jorge, A. O. C. (2019). Influence of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguinis* on virulence of *Candida albicans*: In vitro and in vivo studies. *Folia Microbiologica*, 64(2), 215-222.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-018-0645-9>
- dos Santos, J. D., Fugisaki, L. R. de O., Medina, R. P., Scorzoni, L., Alves, M. de S., de Barros, P. P., Ribeiro, F. C., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., Silva, D. H. S., & Junqueira, J. C. (2020). *Streptococcus mutans* Secreted Products Inhibit *Candida albicans* Induced Oral Candidiasis. *Frontiers in Microbiology*, 11.  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01605>
- Fahim, A., Himratul-Aznita, W. H., & Abdul-Rahman, P. S. (2019). Polymicrobial interactions between *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* and oral associated *Candida albicans* on an in vitro salivary biofilm and differential expression of ALS1, ALS2 and ALS3 genes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 33(1), 338-346. <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1577173>
- Graham, C. E., Cruz, M. R., Garsin, D. A., & Lorenz, M. C. (2017). *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4507-4512.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1620432114>
- Honorato, L., de Araujo, J. F. D., Ellis, C. C., Piffer, A. C., Pereira, Y., Frases, S., de Sousa Araújo, G. R., Pontes, B., Mendes, M. T., Pereira, M. D., Guimarães, A. J., da Silva, N. M., Vargas, G., Joffe, L., Del Poeta, M., Nosanchuk, J. D., Zamith-Miranda, D., Dos Reis, F. C. G., de Oliveira, H. C., ... Nimrichter, L. (2022). Extracellular Vesicles Regulate Biofilm Formation and Yeast-to-Hypha Differentiation in *Candida albicans*. *MBio*, e0030122. <https://doi.org/10.1128/mbio.00301-22>
- Hsu, C.-Y., Yeh, J.-Y., Chen, C.-Y., Wu, H.-Y., Chiang, M.-H., Wu, C.-L., Lin, H.-J., Chiu, C.-H., & Lai, C.-H. (2021). *Helicobacter pylori* cholesterol- $\alpha$ -glucosyltransferase manipulates cholesterol for bacterial

- adherence to gastric epithelial cells. *Virulence*, 12(1), 2341-2351. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1969171>
- Huang, G., Srikantha, T., Sahni, N., Yi, S., & Soll, D. R. (2009). CO2 Regulates White-to-Opaque Switching in *Candida albicans*. *Current Biology*, 19(4), 330-334. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.01.018>
- Huang, Y., Wang, Q., Cheng, D., Xu, W., & Lu, N. (2016). Adhesion and Invasion of Gastric Mucosa Epithelial Cells by *Helicobacter pylori*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00159>
- Ince, A. T., Kocaman, O., Ismailova, M., Tozlu, M., Gücin, Z., & Iraz, M. (2014). A rare co-existence of *Helicobacter pylori*, *Candida albicans* and *Candida kefyr* in a giant gastric ulcer. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 25(4), 435-436. <https://doi.org/10.5152/tjg.2014.3401>
- Ingle, S., Kodgire, S., Shiradhane, A., Patil, R., & Zore, G. (2017). Chlamydospore Specific Proteins of *Candida albicans*. *Data*, 2(3), 26. <https://doi.org/10.3390/data2030026>
- Jan, H.-M., Chen, Y.-C., Yang, T.-C., Ong, L.-L., Chang, C.-C., Muthusamy, S., Abera, A. B., Wu, M.-S., Gervay-Hague, J., Mong, K.-K. T., & Lin, C.-H. (2020). Cholesteryl  $\alpha$ -D-glucoside 6-acyltransferase enhances the adhesion of *Helicobacter pylori* to gastric epithelium. *Communications Biology*, 3(1), 120. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0855-y>
- Jang, S. J., Lee, K., Kwon, B., You, H. J., & Ko, G. (2019). Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 9(1), 8121. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44579-4>
- Karthick B, P., Rao, U., Joshua, E., & K, R. (2019). Study of the Coexistence of *Helicobacter pylori* and *Candida* in the Saliva of Patients with Dyspepsia. *Journal of Dentistry Indonesia*, 26(1), 26-31. <https://doi.org/10.14693/jdi.v26i1.1317>
- Kharchuk, M. S., Glushenkov, A. N., & Gromozova, E. N. (2019). Analysis of the motion of vacuolar volutin granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, 64(2), 207-213. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0646-8>
- Kong, E. F., Tsui, C., Kucharíková, S., Andes, D., Van Dijck, P., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Commensal Protection of *Staphylococcus aureus*

- against Antimicrobials by *Candida albicans* Biofilm Matrix. *mBio*, 7(5), e01365-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01365-16>
- Kong, E. F., Tsui, C., Kucharíková, S., Van Dijck, P., & Jabra-Rizk, M. A. (2017). Modulation of *Staphylococcus aureus* Response to Antimicrobials by the *Candida albicans* Quorum Sensing Molecule Farnesol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12), e01573-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01573-17>
- Liang, S.-H., Anderson, M. Z., Hirakawa, M. P., Wang, J. M., Frazer, C., Alaalm, L. M., Thomson, G. J., Ene, I. V., & Bennett, R. J. (2019). Hemizygoty Enables a Mutational Transition Governing Fungal Virulence and Commensalism. *Cell Host & Microbe*, 25(3), 418-431.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.005>
- Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 19-31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>
- MacAlpine, J., Daniel-Ivad, M., Liu, Z., Yano, J., Revie, N. M., Todd, R. T., Stogios, P. J., Sanchez, H., O'Meara, T. R., Tompkins, T. A., Savchenko, A., Selmecki, A., Veri, A. O., Andes, D. R., Fidel, P. L., Robbins, N., Nodwell, J., Whitesell, L., & Cowen, L. E. (2021). A small molecule produced by *Lactobacillus* species blocks *Candida albicans* filamentation by inhibiting a DYRK1-family kinase. *Nature Communications*, 12, 6151. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26390-w>
- Malavia, D., Lehtovirta-Morley, L. E., Alamir, O., Weiß, E., Gow, N. A. R., Hube, B., & Wilson, D. (2017). Zinc Limitation Induces a Hyper-Adherent Goliath Phenotype in *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02238>
- Massarrat, S., Saniee, P., Siavoshi, F., Mokhtari, R., Mansour-Ghanaei, F., & Khalili-Samani, S. (2016). The Effect of *Helicobacter pylori* Infection, Aging, and Consumption of Proton Pump Inhibitor on Fungal Colonization in the Stomach of Dyspeptic Patients. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00801>
- Matamala-Valdés, L., Sánchez-Alonzo, K., Parra, C., Sáez, K., Aguayo-Reyes, A., & García, A. (2018). Detection of intracellular *Helicobacter pylori* in *Candida*. SPP from neonate oral swabs. *Revista Da*



- Associação Médica Brasileira*, 64(10), 928-935.  
<https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.10.928>
- Mokhtar, M., Rismayuddin, N. A. R., Mat Yassim, A. S., Ahmad, H., Abdul Wahab, R., Dashper, S., & Arzmi, M. H. (2021). *Streptococcus salivarius* K12 inhibits *Candida albicans* aggregation, biofilm formation and dimorphism. *Biofouling*, 37(7), 767-776.  
<https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1967334>
- Morse, D. j., Wilson, M. j., Wei, X., Bradshaw, D. j., Lewis, M. a. o., & Williams, D. w. (2019). Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro biofilms by oral bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 68(4), 337-343. <https://doi.org/10.1111/lam.13145>
- Muthusamy, S., Jan, H.-M., Hsieh, M.-Y., Mondal, S., Liu, W.-C., Ko, Y.-A., Yang, W.-Y., Mong, K.-K. T., Chen, G.-C., & Lin, C.-H. (2021). Enhanced enzymatic production of cholesteryl 6'-acylglucoside impairs lysosomal degradation for the intracellular survival of *Helicobacter pylori*. *Journal of Biomedical Science*, 28, 72.  
<https://doi.org/10.1186/s12929-021-00768-w>
- Noble, S. M., Gianetti, B. A., & Witchley, J. N. (2017). *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, 15(2), 96-108.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.157>
- Paredes-Osses, E., Sáez, K., Sanhueza, E., Hebel, S., González, C., Briceño, C., & García Cancino, A. (2017). Association between cagA, vacAi, and dupA genes of *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathologies in Chilean patients. *Folia Microbiologica*, 62(5), 437-444.  
<https://doi.org/10.1007/s12223-017-0514-y>
- Perry, A. M., Hernday, A. D., & Nobile, C. J. (2020). Unraveling How *Candida albicans* Forms Sexual Biofilms. *Journal of Fungi*, 6(1), 14.  
<https://doi.org/10.3390/jof6010014>
- Puchkov, E. O. (2010). Brownian motion of polyphosphate complexes in yeast vacuoles: Characterization by fluorescence microscopy with image analysis. *Yeast*, 27(6), 309-315.  
<https://doi.org/10.1002/yea.1754>
- Romo, J. A., & Kumamoto, C. A. (2020). On Commensalism of *Candida*. *Journal of Fungi*, 6(1), 16. <https://doi.org/10.3390/jof6010016>
- Rossoni, R. D., de Barros, P. P., de Alvarenga, J. A., Ribeiro, F. de C., Velloso, M. dos S., Fuchs, B. B., Mylonakis, E., Jorge, A. O. C., &

- Junqueira, J. C. (2018). Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: Identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. *Biofouling*, 34(2), 212-225. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1425402>
- Salmanian, A.-H., Siavoshi, F., Akbari, F., Afshari, A., & Malekzadeh, R. (2008). Yeast of the oral cavity is the reservoir of *Helicobacter pylori*: Oral yeast is the reservoir of *H. pylori*. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 37(6), 324-328. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00632.x>
- Salmanian, A.-H., Siavoshi, F., Beyrami, Z., Latifi-Navid, S., Tavakolian, A., & Sadjadi, A. (2012). Foodborne Yeasts Serve As Reservoirs Of *Helicobacter pylori*: Foodborne Yeasts As Reservoirs Of *H. pylori*. *Journal of Food Safety*, 32(2), 152-160. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00362.x>
- Salvatori, O., Kumar, R., Metcalfe, S., Vickerman, M., Kay, J. G., & Edgerton, M. (2020). Bacteria Modify *Candida albicans* Hypha Formation, Microcolony Properties, and Survival within Macrophages. *MSphere*, 5(4), e00689-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00689-20>
- Sánchez-Alonzo, K., Arellano-Arriagada, L., Castro-Seriche, S., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Benavidez-Hernández, H., Campos, V. L., Sáez, K., Smith, C. T., & García-Cancino, A. (2021). Temperatures Outside the Optimal Range for *Helicobacter pylori* Increase Its Harboring within *Candida* Yeast Cells. *Biology*, 10(9), 915. <https://doi.org/10.3390/biology10090915>
- Sánchez-Alonzo, K., Belmar, L., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Campos, V. L., Smith, C. T., Sáez, K., & García-Cancino, A. (2021). Antibiotics as a Stressing Factor Triggering the Harboring of *Helicobacter pylori* J99 within *Candida albicans* ATCC10231. *Pathogens*, 10(3), 382. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030382>
- Sánchez-Alonzo, K., Matamala-Valdés, L., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Campos, V. L., Smith, C. T., Sáez, K., & García-Cancino, A. (2021). Intracellular Presence of *Helicobacter pylori* and Its Virulence-Associated Genotypes within the Vaginal Yeast of Term Pregnant Women. *Microorganisms*, 9(1), 131. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010131>

- Sánchez-Alonzo, K., Parra-Sepúlveda, C., Vega, S., Bernasconi, H., Campos, V. L., Smith, C. T., Sáez, K., & García-Cancino, A. (2020). In Vitro Incorporation of *Helicobacter pylori* into *Candida albicans* Caused by Acidic pH Stress. *Pathogens*, 9(6), 489. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060489>
- Sánchez-Alonzo, K., Silva-Mieres, F., Arellano-Arriagada, L., Parra-Sepúlveda, C., Bernasconi, H., Smith, C. T., Campos, V. L., & García-Cancino, A. (2021). Nutrient Deficiency Promotes the Entry of *Helicobacter pylori* Cells into *Candida* Yeast Cells. *Biology*, 10(5), 426. <https://doi.org/10.3390/biology10050426>
- Saniee, P., Siavoshi, F., Nikbakht Broujeni, G., Khormali, M., Sarrafnejad, A., & Malekzadeh, R. (2013). Immunodetection of *Helicobacter pylori*-specific proteins in oral and gastric *Candida* yeasts. *Archives of Iranian Medicine*, 16(11), 624-630. <https://doi.org/0131611/AIM.003>
- Siavoshi, F. (2014). Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 20(18), 5263. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5263>
- Siavoshi, F., Heydari, S., Shafiee, M., Ahmadi, S., Saniee, P., Sarrafnejad, A., & Kolahdoozan, S. (2019). Sequestration inside the yeast vacuole may enhance *Helicobacter pylori* survival against stressful condition. *Infection, Genetics and Evolution*, 69, 127-133. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.029>
- Siavoshi, F., Sahraee, M., Ebrahimi, H., Sarrafnejad, A., & Saniee, P. (2018). Natural fruits, flowers, honey, and honeybees harbor *Helicobacter pylori*-positive yeasts. *Helicobacter*, 23(2), e12471. <https://doi.org/10.1111/hel.12471>
- Siavoshi, F., Salmanian, A. H., Kbari, F. A., Malekzadeh, R., & Massarrat, S. (2005). Detection of *Helicobacter pylori*-Specific Genes in the Oral Yeast. *Helicobacter*, 10(4), 318-322. <https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2005.00319.x>
- Siavoshi, F., & Saniee, P. (2014). Vacuoles of *Candida* yeast as a specialized niche for *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 20(18), 5263-5273. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i18.5263>
- Tampakakis, E., Peleg, A. Y., & Mylonakis, E. (2009). Interaction of *Candida albicans* with an Intestinal Pathogen, *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. *Eukaryotic Cell*, 8(5), 732-737. <https://doi.org/10.1128/EC.00016-09>

- Tavakolian, A., Siavoshi, F., & Eftekhari, F. (2018). *Candida albicans* Release Intracellular Bacteria When Treated With Amphotericin B. *Archives of Iranian Medicine*, 21(5), 191-198.
- Todd, O. A., Fidel, P. L., Harro, J. M., Hilliard, J. J., Tkaczyk, C., Sellman, B. R., Noverr, M. C., & Peters, B. M. (2019). *Candida albicans* Augments *Staphylococcus aureus* Virulence by Engaging the *Staphylococcal* agr Quorum Sensing System. *mBio*, 10(3), e00910-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00910-19>
- Valentine, M., Benadé, E., Mouton, M., Khan, W., & Botha, A. (2019). Binary interactions between the yeast *Candida albicans* and two gut-associated *Bacteroides* species. *Microbial Pathogenesis*, 135, 103619. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103619>
- Varahan, S., & Laxman, S. (2021). Bend or break: How biochemically versatile molecules enable metabolic division of labor in clonal microbial communities. *Genetics*, 219(2), iyab109. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyab109>
- Vico, S. H., Prieto, D., Monge, R. A., Román, E., & Pla, J. (2021). The Glyoxylate Cycle Is Involved in White-Opaque Switching in *Candida albicans*. *Journal of Fungi*, 7(7), 502. <https://doi.org/10.3390/jof7070502>
- Wang, S., Wang, Q., Yang, E., Yan, L., Li, T., & Zhuang, H. (2017). Antimicrobial Compounds Produced by Vaginal *Lactobacillus crispatus* Are Able to Strongly Inhibit *Candida albicans* Growth, Hyphal Formation and Regulate Virulence-related Gene Expressions. *Frontiers in Microbiology*, 8, 564. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00564>
- Xu, H., Sobue, T., Bertolini, M., Thompson, A., Vickerman, M., Nobile, C. J., & Dongari-Bagtzoglou, A. (2017). *S. oralis* activates the Efg1 filamentation pathway in *C. albicans* to promote cross-kingdom interactions and mucosal biofilms. *Virulence*, 8(8), 1602-1617. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1326438>