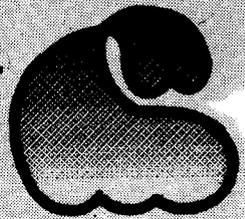


**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS**



**Efecto de Polisacáridos Sulfatados de Microalgas en  
Adhesión de Bacterias Patógenas a Líneas Celulares  
Humanas y de Peces.**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Manejo  
de Recursos Marinos**

PRESENTA:

*Marta Antonia Guzmán Murillo*

La Paz, Baja California Sur., 1997.

DEDICATORIAS . . . . .	<b>i</b>
AGRADECIMIENTOS . . . . .	<b>ii</b>
ÍNDICE GENERAL. . . . .	<b>iv</b>
RELACIÓN DE FIGURAS. . . . .	<b>viii</b>
RELACIÓN DE TABLAS. . . . .	<b>ix</b>
GLOSARIO . . . . .	<b>x</b>
RESUMEN. . . . .	<b>xiii</b>
ABSTRACT. . . . .	<b>xiv</b>
I. INTRODUCCIÓN. . . . .	<b>1</b>
1. Generalidades sobre microalgas.. . . . .	1
2. El uso de microalgas como alimento y forraje. . . . .	2
3. Productos de microalgas. . . . .	4
4. Aplicaciones médicas y biotecnológicas de polisacáridos sulfatados de microalgas. . . . .	5
5. Modelos experimentales sobre la utilización de polisacáridos como agentes alternos para prevenir la adherencia microbiana. . . . .	6
A. Modelo I: Inhibición de la adherencia de <i>Helicobacter pylori</i> a líneas celulares animales. . . . .	7
1. <i>Helicobacter pylori</i> : Generalidades y descripción. . . . .	7
2. Incidencia de <i>Helicobacter pylori</i> en ambientes acuícolas. . . . .	8
3. Prevención y control de infecciones producidas por <i>Helicobacter pylori</i> . . . . .	9
4. Factores de patogenicidad de <i>Helicobacter pylori</i> . . . . .	10
a) adhesinas. . . . .	11
b) adherencia e internalización. . . . .	12
5. Proteínas de la matriz extracelular en células de la mucosa gástrica. . . . .	13
B. Modelo II: Inhibición de la adherencia de cepas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> a células de peces ( <i>Paralabrax maculofasciatus</i> ). . . . .	14
1. Familia Vibrionaceae: Generalidades y descripción. . . . .	15
2. Importancia de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> en acuicultura y su impacto en salud pública. . . . .	16

II. JUSTIFICACIÓN .....	19
III. OBJETIVOS .....	22
Generales .....	22
Específicos .....	22
IV. MATERIALES Y METODOS .....	23
1. Preparación y purificación de polisacáridos de microalgas .....	23
a) Cultivo de microalgas .....	23
b) Aislamiento y purificación parcial de polisacáridos de microalgas por el método de precipitación con cloruro de cetil pirimidio CPC .....	24
2. Bacterias, condiciones de cultivo y almacenamiento .....	25
a) Cepas de <i>Helicobacter pylori</i> .....	25
b) Cepas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> .....	26
3. Líneas celulares de mamífero y cultivos primarios de células de peces utilizadas en este estudio .....	27
a) Líneas celulares de mamífero .....	27
b) Células de peces .....	28
4. Estandarización de métodos para la evaluación de la adherencia bacteriana a líneas celulares seleccionadas .....	28
a) Determinación de la adherencia bacteriana a líneas celulares por microscopía .....	28
b) Determinación de adherencia bacteriana a líneas celulares por microscopía de doble fluorescencia .....	29
c) Determinación de la adherencia bacteriana a líneas celulares seleccionadas por espectrofluorimetría .....	30
d) Determinación de la adherencia de bacterias marcadas con <sup>125</sup> I a proteínas de la matriz extracelular (ECM) de células HeLa S3 y Matrigel inmovilizado en placas de cultivo de tejidos .....	30
e) Determinación espectrofotométrica de la adhesión de bacterias marcadas con biotina a células HeLa S3 .....	31

f) Determinación espectrofotométrica de la adhesión de bacterias marcadas con biotina a células de peces..	32
5. Utilización de diferentes compuestos para inhibir y desplazar la adhesión de <i>Helicobacter pylori</i> a las líneas celulares seleccionadas.	32
a) Estudios de inhibición de adhesión bacteriana por microscopía de doble fluorescencia.	33
b) Estudios espectrofluorométricos de la inhibición de la adhesión de <i>H. pylori</i> a las líneas celulares seleccionadas..	33
c) Estudio espectrofotométrico de inhibición de adhesión de bacterias marcadas con biotina.	34
6. Utilización de polisacáridos sulfatados de microalgas para inhibir la adhesión de cepas de <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. ordalli</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>Aeromonas hydrophila</i> a células de cabrilla arenera ( <i>P. maculatofsciatus</i> ), (branquias, intestino, sangre y tegumento).	35
V. RESULTADOS.	36
1. Estandarización de métodos para la evaluación de la adherencia bacteriana a las líneas celulares seleccionadas.	36
2. Cinéticas de adhesión de <i>Helicobacter pylori</i> a líneas celulares.	38
3. Inhibición de la adhesión de <i>Helicobacter pylori</i> a líneas celulares seleccionadas.	40
3.1 Utilización de polisacáridos de microalgas para inhibir la adhesión de <i>H. pylori</i> a líneas celulares.	40
3.2 Inhibición de la adherencia de células HeLa S3 y Kato III con anticuerpos, antígenos de <i>H. pylori</i> y péptidos sintéticos.	43
4. Utilización de polisacáridos sulfatados de microalgas para inhibir la adhesión de cepas de <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. ordalli</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>Aeromonas hydrophila</i> a células de branquias, intestino, sangre y tegumento de la cabrilla arenera ( <i>P. maculatofsciatus</i> ).	45
VI. DISCUSIÓN.	50
VII. CONCLUSIONES.	61
VIII. PERSPECTIVAS.	62

Ix. BIBLIOGRAFÍA.....	63
. APÉNDICE. ....	73
1. Composición de medios de cultivo. ....	73
a) Microalgas. ....	73
b) Bacterias. ....	74
2. Obtención de antígenos de <i>Helicobacter pylori</i> . ....	76
3. Producción de anticuerpos policlonales. ....	77
4. Aislamiento de compuestos de matriz extracelular de células HeLa S3. ....	78
5. Marcaje de bacterias con <sup>125</sup> I. ....	79
6. Marcaje de bacterias con biotina. ....	80
7. Cuantificación de proteínas. ....	81
8. Cuantificación de carbohidratos totales. ....	82
9. Determinación del contenido de sulfatos en exopolisacáridos.. ....	83
10. Aislamiento y mantenimiento de células de cabrilla arenosa ( <i>P. maculatosciatus</i> ). ....	84
a) Cultivos primarios de células de tegumento, intestino y branquias. ....	84
b) Cultivos primarios de linfocitos T de sangre. ....	85
II. Reactivos y materiales. ....	86

## Relación de Figuras

<b>Figura 1.</b> Constituyentes de la matriz extracelular de células epiteliales de la mucosa.....	<b>14</b>
<b>Figura 2.</b> Modelo hipotético de inhibición y desplazamiento bacteriano a células epiteliales de la mucosa. ....	20
<b>Figura 3.</b> Cinética de adhesión de <i>H. pylori</i> , cepa 25 a células Kato III.....	38
<b>Figura 4.</b> Adhesión de cepas de <i>H. pylori</i> a líneas celulares de humano. ..	39
<b>Figura 5.</b> Efecto de exopolisacáridos sulfatados de microalgas en adherencia de <i>H. pylori</i> , cepa 25 a células HeLaS3.. ....	42
<b>Figura 6.</b> Inhibición de la adherencia de <i>H. pylori</i> , cepa 25 a células HeLa S3 con antígenos de <i>H. pylori</i> y con anticuerpos policlonales anti- <i>H. pylori</i> en conejo y ratón.....	43
<b>Figura 7.</b> Inhibición de la adherencia de <i>H. pylori</i> , cepa 25 a líneas celulares de humano, utilizando péptidos sintéticos homólogos a las secuencias de unión a heparina en proteínas de estrés y péptidos sintéticos homólogos a las secuencias de unión a heparina en fibronectina y anticuerpos monoclonales contra la proteína de estrés Hsp70 de células eucariotes. ....	45
<b>Figura 8.</b> Efecto de exopolisacáridos sulfatados de microalgas en la adhesión de cepas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> a células de cabrilla arenera ( <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> ). ....	48

---

## Relación de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Cepas de Microalgas utilizadas en el presente trabajo. ....	<b>23</b>
<b>Tabla 2.</b> Cepas de <i>Helicobacter pylori</i> utilizadas en el presente estudio .....	<b>25</b>
<b>Tabla 3.</b> Estandarización de métodos para la evaluación de adherencia de <i>Helicobacter pylori</i> a células animales. ....	<b>37</b>
<b>Tabla 4.</b> Resumen comparativo del efecto de exopolisacáridos sulfatados de microalgas en la adhesión de cepas de <i>Vibrio</i> y <i>Aeromonas</i> a células de cabrilla arenera ( <i>Paralabrax maculatofasciatus</i> ) . . . . .	<b>49</b>
<b>Tabla 5.</b> Microorganismos con afinidad por receptores proteoglicanos en células eucariotes . . . . .	<b>53</b>

---

## GLOSARIO

- **Adhesina.** Proteína presente en células eucariotes o procariotes que tiene afinidad por secuencias de aminoácidos o carbohidratos de otras macromoléculas.
- **Antibiótico.** Compuesto de bajo peso molecular que tiene la capacidad de inhibir o suprimir el crecimiento, desarrollo, o multiplicación bacteriana.
- **Anticuerpo.** Proteína producida a causa de la introducción de un antígeno, y que tiene la capacidad de combinarse con el antígeno que estimuló su producción.
- **Antígeno.** Sustancia que reacciona con anticuerpos o receptores de células T, despertada por inmunógenos.
- **Antrum.** Porción distal del estómago adjunta al píloro.
- **Carragenina.** Polisacárido sulfatado aislado de algas cafés y que tiene la propiedad de formar geles.
- **Colonización.** Capacidad que tiene un microorganismo para establecerse en un huésped susceptible.
- **Complemento.** Sistema de proteínas séricas que es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo.
- **Fibronectina.** Glicoproteína estructural que conforma parte de la matriz extracelular. Tiene un peso molecular de 210 a 260 kDa
- **Fucoídán.** Polisacárido sulfatado aislado de algas cafés.
- **Gastritis.** Definición histopatológica de inflamación de la superficie de la mucosa gástrica; esto es, infiltración de la lamina propia con linfocitos y células plasmáticas.
- **Heparina.** Proteoglicano sulfatado formado por una cadena polipeptídica con ramificaciones de polisacáridos compuestas de unidades repetitivas de D-glucosamina y ácido L-idurónico o ácido D-glucurónico conteniendo sustituciones de radicales 6-O-sulfato en la G-glucosamina, o sustituciones 2-O-sulfato en el ácido L-idurónico. Peso molecular entre 16,000 y 30,000 Da.
- **Hípocolesterémico. Niveles** bajo de colesterol en torrente sanguíneo.
- **Invasión.** Capacidad que tiene un microorganismo para penetrar y establecerse al interior de las células de un huésped susceptible.
- **Lactoferrina.** Glicoproteína con la capacidad para quelar y almacenar hierro; es secretada por células epiteliales glandulares presentes en la mucosa gástrica, así como en los gránulos de neutrófilos. Se le encuentra también en la leche y en el suero.

- **Ligando.** Cualquier molécula que forma un complejo con otra molécula, como un antígeno y un anticuerpo, o una lectina y un carbohidrato.
- **Matástasis.** Desarrollo neoplásmico del estómago resultado de un daño tisular excesivo asociado a un proceso inflamatorio prolongado (por décadas) por infección con *Helicobacter pylori*.
- **Matriz extracelular.** Término que denota una serie de estructuras especializadas de los huesos, tendones, músculo, y cartílago, incluyendo el tejido conectivo. Material macromolecular que se encuentra entre los diferentes tipos de células en muchos órganos, la lámina basal que separa el epitelio del endotelio y células mesenquimáticas del tejido conectivo intersticial. En su totalidad, los componentes de lo que se conforman las diferentes estructuras de la matriz extracelular son: colágenas, elastina, proteoglicanos y glicoproteínas estructurales.
- **Mitógeno.** Sustancias que inducen la síntesis de ADN, transformación blastoide y finalmente, división de los linfocitos.
- **Proteína de estrés (Hsp).** Proteínas pertenecientes a la familia de las chaperoninas. Son sintetizadas por las células eucarióticas o procariotes en respuesta a condiciones de estrés y están involucradas en el transporte de nutrientes a la célula.
- **Receptor.** Contraparte de un complejo que interacciona con un ligando.
- **Síndrome de enfermedades ulcerativas.** Infección producida por *Aeromonas hydrophila* en peces marinos, caracterizada por la generalización de ulceraciones en el tegumento del pez.
- **Sulfato de dextran.** Derivado poliiónico de dextran, que es un polisacárido con cadenas lineales de residuos de D-Glucopiranososa y con un peso molecular aproximado de 500,000 Da.
- **Sulfato de heparina.** Proteoglicano sulfatado formado por una cadena polipeptídica y con ramificaciones de polisacáridos compuestas de unidades repetitivas de D-glucosamina y ácido D-glucorónico conteniendo sustituciones de radicales N-sulfato, O-sulfato en la G-glucosamina y en el ácido L-idurónico. Peso molecular de entre 16,000 y 30,000 Da
- **Úlcera.** Degeneración de la superficie cutánea o de la mucosa.
- **Úlcera duodenal.** Degradación de la mucosa gástrica en áreas del duodeno debilitadas por inflamación debida a infecciones producidas por *Helicobacter pylori*.
- **Úlcera gástrica.** Degradación de la mucosa gástrica.
- **Úlcera péptica.** Perforaciones en áreas de la mucosa gástrica causada por daños ácidos en áreas debilitadas del estómago por inflamación debida a infecciones producidas por *Helicobacter pylori*, o bien, debido a otros

agentes como drogas no-esteroideas o anti-inflamatorias incluyendo aspirinas.

## RESUMEN.

El cultivo de microalgas es una actividad rentable, lo que ha permitido que su producción se haya incrementado considerablemente en años recientes; producción que es comercializada como biomasa para forraje, como reactivos biológicos de alto valor agregado, tales como inhibidores de proteasas, ácidos grasos poliinsaturados, polisacáridos mucilaginosos, agentes antibacterianos, antitumorales, cardiótonicos e hipocolesterémicos y anticoagulantes. En la actualidad la búsqueda de productos naturales han cobrado importancia debido a la necesidad de encontrar moléculas nuevas que tengan una aplicación en el tratamiento de enfermedades.

Debido a la afinidad que tienen ciertas especies bacterianas por glicoconjugados sulfatados expuestos en los tejidos de huéspedes susceptibles, en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que polisacáridos sulfatados aislados de microalgas podrían ser una estrategia importante a incluir como parte de la terapia anti-adhesiva durante el tratamiento de un proceso infeccioso. Se realizaron estandarizaciones de metodologías para la determinación de adherencia bacteriana a células animales, encontrándose diferencias en los métodos analizados; así mismo se comparó el potencial anti-adhesivo de los exopolisacáridos sulfatados aislados de microalgas con compuestos tradicionalmente empleados en terapias anti-adhesivas, encontrando que ocurre una inhibición de adherencia de *H. pylori* a líneas celulares y que el grado de inhibición con los compuestos tradicionalmente empleados resulta menor que con los exopolisacáridos sulfatados. Por otra parte y dada la necesidad que existe en la industria acuícola por contar con alternativas profilácticas y terapéuticas para contrarrestar infecciones microbianas en el cultivo de organismos marinos y de eliminar el uso casi irracional de antibióticos, se evaluó el posible efecto inhibitor de exopolisacáridos sulfatados en la adhesión de bacterias patógenas (*Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii* y *Aeromonas hydrophila*) a células de intestino, branquias, tegumento y sangre de cabrilla (*Paralabrax maculatofasciatus*), encontrando resultados homólogos a lo que ocurre en el modelo experimental con *H. pylori* y su adhesión a líneas celulares de mamífero, esto es, que algunos exopolisacáridos sulfatados inhiben la adhesión bacteriana.

## ABSTRACT.

Because microalgae culture has been recognized as a profitable activity, the industry has increased its production in the last decade. Microalgae production is commercialized as biomass for animal feed, high-value biological reagents such as proteolytic enzymes, protease inhibitors, polyunsaturated fatty acids, exopolysaccharides, and molecules with antibacterial, antitumor, cardiogenic, hypocholesteremic and anticoagulant activity. However, there is still the need for search for new active molecules with pharmacologic application.

Because the affinity of certain bacteria species for sulfated glucoconjugates exposed on the epithelial cells of susceptible hosts, we hypothesized that marine microalgae sulfated exopolysaccharides can be used in antiadhesive therapies against bacteria infections. Towards this end, a number of techniques for measuring the adhesion of bacteria to animal cells were standardized. We evaluated the effect of microalgae sulfated exopolysaccharides on the adhesion of pathogenic bacteria strains to human and fish-cell lines. We compared the antiadhesive activity of microalgae sulfated exopolysaccharides on the adhesion of *Helicobacter pylori* to human-cell lines with the kind of compounds traditionally used in antiadhesive therapies. The findings suggest that marine microalgae sulfated exopolysaccharides can be as effective as the compounds traditionally used in antiadhesive therapies.

Because of the need of the aquaculture industry for alternative prophylactic and therapeutic schemes for the control of microbial infections in marine organism cultures, and the need to reduce the indiscriminate application of antibiotics, we also evaluated whether marine microalgae sulfated exopolysaccharides can inhibit the adhesion of *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, and *Aeromonas hydrophila* to spotted sand bass (*Paralabrax maculatofasciatus*). The findings indicated that the bacteria adhesion to fish cells can be effectively blocked with the various sulfated exopolysaccharides studied.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

### **1.- Generalidades sobre Microalgas.**

No obstante que los estudios sobre microalgas se iniciaron formalmente a finales del siglo XIX por Beijerinck en 1890 (Soeder, 1980), existen evidencias documentadas de que las microalgas han sido empleadas como fuente de alimento desde tiempos muy remotos. Recientemente se ha descubierto que dichos organismos pueden tener aplicaciones tan variadas como en el tratamiento de aguas residuales, en la producción de alimentos, pigmentos, ácidos grasos poliinsaturados, carbohidratos, enzimas, vitaminas y otros metabolitos secundarios (De la Noüe y de Paw, 1988; Arredondo-Vega y Vázquez-Duhalt, 1991).

Las microalgas son organismos cosmopolitas, localizándose tanto en el medio marino, dulceacuícola y formando parte de ecosistemas terrestres, pudiendo existir tanto formas unicelulares como multicelulares. Se estima que existen aproximadamente 30 mil especies distintas de microalgas y son consideradas responsables de la producción de materia orgánica que se encuentra en los ecosistemas acuáticos y casi del 60% de la fotosíntesis total del planeta (Bold y Wynne, 1985).

El papel ecológico que juegan las microalgas en los ecosistemas acuícolas y terrestres es fundamental puesto que estos organismos fotosintéticos almacenan energía solar y la convierten en energía química, la cual es utilizada en su mayor parte como alimento para los organismos del segundo nivel trófico, entre los que se encuentran peces fitófagos (Mironova, 1975; Stanley y Jones, 1976; Bahr et al.,

---

1977), moluscos (Roels y Gerard, 1970; Ryther y Tenore 1976) y otros organismos en el ecosistema marino.

## **2.- Uso de microalgas como alimento y forraje.**

Se estima que la producción de microalgas marinas aporta la mitad de la producción primaria del mundo, por lo que se les ha llegado a considerar como el principal recurso biológico que podría llegar a resolver los problemas mundiales de alimentación (Barr, 1981).

Obviamente estos problemas no pueden ser resueltos a corto plazo con el cultivo de microalgas, puesto que es necesario abordarlos de una manera multidisciplinaria; esto es, establecer esquemas de productividad real de los cultivos, determinar el valor nutritivo, formular y diseñar procesos biotecnológicos y, lo más importante, lograr cambios en la dieta para que estos productos sean aceptados por el hombre.

A raíz de los trabajos de Jorgensen y Convit (1953), relacionados a la producción de *Chlorella* y su incorporación en la dieta del hombre, en Estados Unidos, Japón, Alemania y más tarde en Israel, se inició el estudio científico de la producción de biomasa a partir de cultivo de microalgas verdes, principalmente de *Chlorella* llegando a desarrollarse exitosamente las condiciones de bioingeniería y comercialización en Taiwan y Japón (Burlew, 1953). Posteriormente se ha venido desarrollando la manufactura de extractos de microalgas con distintas aplicaciones en la industria alimenticia y que han tenido éxito en el mercado. Sin embargo, Powell y colaboradores (1961) realizaron estudios con *Chlorella* para conocer su

---

**valor nutritivo, encontrándose con resultados no** muy alentadores; más tarde Kraut y colaboradores (en Soeder, 1980), considerando la inclusión de estudios sistemáticos para determinar el valor nutritivo de *Scenedesmus*, llegaron a la conclusión de que el valor biológico y la digestibilidad de las microalgas depende de las condiciones experimentales para su cultivo y de los procesos tecnológicos empleados para su obtención.

De aquí **que ha surgido la necesidad de ampliar dichas consideraciones con estudios** que incluyen aspectos biotecnológicos encaminados a la obtención de biomasa, técnicas de cosecha (Shelef et al., 1978; Mohn, 1978; Heussler, 1978), y procesos tecnológicos (Shelef et al., 1978; Hedenskog, 1978; Mohn, 1978).

Al hacer un análisis económico del cultivo de microalgas se puede evidenciar que dicha actividad resulta rentable, hecho que ha permitido y alentado significativamente que la producción de microalgas se haya incrementado considerablemente en años recientes, llegándose a tener por ejemplo, hasta 100 toneladas por hectárea de *Chlorella* bajo condiciones de cultivo en campo (Castillo et al., 1980; Grobbelaar, 1981; Ben-Amotz et al., 1982), producción que es comercializada tanto como biomasa para forraje, así como productos secundarios de un alto valor agregado.

En nuestro país, el cultivo del alga *Spirulina* ha tenido una importancia económica relevante ya que a México se le consideró en 1983 como uno de los principales productores a nivel mundial, teniendo como su principal mercado países Europeos.

Si se toma en consideración que las características generales en la producción de microalgas son: 1) tiempo de duplicación cada 24 horas, 2) elevada tasa de transformación de nitrato a proteína, 3) elevado contenido proteico, 4) composición bioquímica dependiente de las condiciones de cultivo, 5) escalamiento de cultivo hasta nivel industrial, 6) crecimiento autotrófico, heterotrófico/mixotrófico y 6) producción de 20 veces más biomasa que en los cultivos agrícolas tradicionales, se puede llegar a la conclusión de que el cultivo algal tiene una gran expectativa dentro de la industria alimenticia, cosmetológica y farmacológica (Jahn et al., 1984; Ahern et al., 1983a; 1983b).

### **3. Productos de microalgas.**

Se han desarrollado cultivos algales para la explotación comercial de compuestos como: proteínas, enzimas, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas, aminoácidos, antioxidantes, colorantes, agentes saborizantes y clarificantes (Aaronson et al., 1980; Lee y Bazin, 1991). Asimismo, se puede obtener una amplia variedad de compuestos farmacológicamente activos, como los inhibidores de proteasas (Canell et al., 1988), ácidos grasos poliinsaturados (Ahern et al., 1983a, 1983b; Cohen et al., 1988; Lee et al., 1988; Ohta et al., 1992), polisacáridos mucilaginosos, compuestos metabólicos con actividad antibacteriana (Fábregas et al., 1991), actividad antitumoral (Noda et al., 1989a; 1989b; Usi et al., 1980), actividad cardiótónica (Kosuya et al., 1985) e hipocolesterémica (Anususaya-Devi et al., 1979; Fábregas et al., 1994) y compuestos que pueden inhibir la coagulación sanguínea (Springer et al., 1957; Colliee et al., 1991).

#### 4. Aplicaciones médicas y biotecnológicas de polisacáridos sulfatados.

A pesar de que desde 1955 existen reportes de producción de compuestos antibióticos en algas marinas (Sierburth, 1961) y de que posteriormente en los años sesenta empiezan a aparecer datos que definen el compuesto activo de efecto microbicida (Fábregas et al., 1991; Fenical y Jensen, 1993), no es hasta en los años setenta que toman importancia los productos naturales marinos debido a la necesidad de encontrar moléculas nuevas que tengan una aplicación en el tratamiento de enfermedades en el humano. De esta manera se encontró que el fucoidan es un polisacárido sulfatado que se encuentra en la pared celular de ciertas algas marinas (Springer et al., 1957; Larsen et al., 1966; Kloareg y Quatrano, 1988), en donde está asociado a varias actividades biológicas como reconocimiento y adhesión celular y en la regulación de la función de dichos receptores de comunicación celular (Cassaró y Dietrich, 1977; Höök et al., 1984). Estudios recientes indican que este tipo de polisacáridos sulfatados son capaces de inhibir la replicación *in vitro* del virus HIV-1 por la supresión de la formación de células gigantes o por la inhibición de la enzima transcriptasa (Baba et al., 1990); asimismo, se ha descrito que tiene actividad anticoagulante (Abdel-Fattah et al., 1974; Usui et al., 1980) y una actividad antitrombótica directa por la trombina III o en una mayor manera por cofactor II de heparina (Collie et al., 1991). De la misma forma se han estudiado compuestos relacionados como el sulfato de dextrán que tienen actividad anti-adhesiva y anti-inflamatoria, esta última mediada por la habilidad que tienen dichos compuestos para interferir con el sistema de complemento (Raeppele et al., 1976; Pangburn et al., 1991). Por otro lado encuentran que polisacáridos sulfatados, incluyendo el fucoidan y la carragenina, inhiben la metástasis (Parish et al., 1987; Combe et al., 1987; Parish y Snowden 1988). La carragenina interfiere directamente con la actividad proteolítica de la pepsina, teniendo una aplicación *in vitro* en el tratamiento de úlceras pépticas (Stancioff y Renn, 1975); además se ha reportado que la carragenina prolonga la digestión gástrica de caseína sin interferir con la subsecuente digestión entérica

---

(Stanley, 1982). Existen una serie de estudios que indican que los polisacáridos sulfatados de algas marinas tienen actividad en el sistema inmunológico sobre células específicas. Sugawara y colaboradores (1982) han descrito que la carragenina actúa como mitógeno en las células T de humano. Brenan y Parish (1986) mencionan que la carragenina induce el factor del estímulo de colonización de granulocitos macrófagos. Considerando la variedad de usos biomédicos que se han descrito sobre los polisacáridos sulfatados aislados de algas marinas, podemos confirmar la importancia de estos compuestos sulfatados así como de su proyección futura dentro de la terapéutica en el tratamiento de una variedad de enfermedades en el humano y en veterinaria. Las ventajas que representaría el uso de microalgas para la obtención de reactivos biológicos de alto valor agregado como alternativa al uso de estos productos provenientes de macroalgas, son atractivas como para pensar en el desarrollo de una industria biotecnológica.

#### **5.- Modelos experimentales sobre la utilización de polisacáridos sulfatados como agentes alternos para prevenir la adherencia microbiana.**

Poniendo atención en lo referente a la producción de compuestos extracelulares de microalgas, particularmente de polisacáridos sulfatados con actividad potencial como agentes anti-cancerígenos (Furusawa y Furusawa, 1985) y teniendo en consideración que dichos metabolitos pueden ser producidos a gran escala bajo condiciones controladas de cultivo (Ramus, 1972), se contempla la posibilidad de que puedan ser aplicados como compuestos alternativos en la terapia de infecciones microbianas que llegan a iniciarse como una simple reacción inflamatoria.

## **A. Modelo I: Inhibición de la adherencia de *Helicobacter pylori* a líneas celulares animales.**

Considerando que las infecciones producidas por *H. pylori* en el hombre son reconocidas como una de las principales responsables de gastritis crónicas en el humano (Marshal, 1983), las cuales se inician mediante una reacción inflamatoria y pueden llegar a desencadenar en un cáncer gástrico (Wotherspoon et al., 1991; Nilius et al., 1993; Blondin et al., 1994), estudios recientes en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. han demostrado que *H. pylori* expresa componentes de superficie que tienen afinidad por la clase de sulfato de heparina que se encuentra en las células epiteliales de la mucosa gástrica (Ascencio et al., 1993) y por el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) dependiente de heparina (Ascencio et al., 1995).

Las uniones de *H. pylori* al sulfato de heparina de la mucosa gástrica son eficientemente bloqueadas por sulfato de heparina, oligosacáridos sintéticos de heparina (Ascencio et al., 1993) y por carbohidratos sulfatados (Hirno et al., 1995).

### **I.- *Helicobacter pylori*: Generalidades y descripción.**

*H. pylori* es un bacilo espiral o ligeramente curvo, Gram negativo con 2 a 6 flagelos unipolares muy característicos. La pared celular es lisa y puede estar cubierta con un prominente glicocálix. Ocasionalmente la bacteria puede tener bacteriófagos. Los flagelos tienen un distintivo bulbo terminal. Esta bacteria tiene una remarcable movilidad en soluciones viscosas donde los flagelos juegan un papel central (Hazell et al., 1986; Suerbaum et al., 1993). Se ha observado también que puede cambiar dentro de un rango morfológicamente normal a una forma *cocoidal*, especialmente

in vitro después de cultivos prolongados o de tratamientos por antibióticos. *H. pylori* puede ser cultivado tanto en medio sólido como líquido, siendo esenciales para su desarrollo condiciones microaerófilas con una concentración óptima de oxígeno entre 2-8%. En cultivo in vitro *H. pylori* es sensible a casi todos los antibióticos, con excepción de: ácido nalidíxico, trimetropín, sulfonamidas y vancomicina (Goodwin et al., 1989a; Goodwin y Worsley, 1993). *H. pylori* es caracterizado por su fuerte actividad de ureasa, es oxidasa positivo y produce una gran cantidad de catalasa (Goodwin et al., 1989b), superóxido dismutasa (Spiegelhalder et al., 1993); fosfolipasa, gama glutamiltanspeptidasa y contiene indol o produce sulfito de hidrógeno (Mégraud et al., 1985).

## **2.- Incidencia de *Helicobacter pylori* en ambientes acuícolas.**

Recientemente se encontró que el suministro de agua municipal podría ser una fuente importante de infección gastrointestinal (Klein et al., 1991). West y colaboradores (1992) han reportado que *H. pylori* puede mantenerse vivo por varios días en soluciones con pH entre 4.5 y 9.0 mientras que en rangos que van de pH 4.0 a 2.0 puede sufrir cambios fisiológicos (Klein et al., 1991). Sin embargo, también se ha reportado que en el medio acuático natural esta bacteria puede sobrevivir en rangos de pH que van de 3.0 a 10.0 (Kushner, 1987). También se ha observado que la concentración fisiológica de sal como la baja tensión de oxígeno son condiciones óptimas para que la bacteria sobreviva en el medio acuático; estas condiciones se pueden comparar con las empleadas en el transporte de las muestras de especímenes de biopsias para su posterior cultivo (Coudron y Kirby, 1989). Asimismo, se ha mencionado que *H. pylori* sobrevive por períodos importantes en agua destilada con una concentración de 0.6 M de cloruro de sodio que es la salinidad aproximada del agua de mar (West et al., 1992)

Un primer paso importante para el establecimiento de la ruta de transmisión de *H. pylori* de origen acuático es el haber demostrado la supervivencia de este patógeno en habitats dulceacuícolas (Shahamat et al., 1993). Recientemente se ha descrito que el microorganismo sufre cambios morfológicos que van de una forma bacilar curva a una forma de herradura o cocoide (Fuhrman y Azam, 1982; Mai et al., 1989; Crooker et al., 1990; Mai et al., 1990). Se ha descrito también que dentro de los parámetros ambientales, la temperatura es importante en la viabilidad de *H. pylori* en el agua; sin embargo, para el establecimiento de un reservorio natural adecuado para este microorganismo se requiere en primer lugar reconocer su ecología. La posibilidad de que *H. pylori* pueda permanecer en forma viable pero no cultivable es aún una incógnita y ciertamente nos podrá proveer de una gran significancia en salud pública el poder resolverla.

### **3.- Prevención y control de infecciones producidas por *Helicobacter pylori*.**

La erradicación de *H. pylori* puede ser un paso importante hacia la prevención tanto de úlcera péptica como de cáncer gástrico en el estómago y el duodeno (Rune, 1994). Hace algunos años, el tratamiento para las enfermedades causadas por esta bacteria representaban un gran problema ya que no se podía tener la seguridad de cual era la población bacteriana que se encontraba como comensal o cual era un verdadero patógeno para la mucosa gastroduodenal. Fue hasta 1989 cuando se llegó a la conclusión después de una serie de estudios de que *H. pylori* era un factor clave en el desarrollo de gastritis activa crónica y la enfermedad de úlcera duodenal. Teniendo como finalidad la erradicación del microorganismo, se tomó en cuenta el uso de posibles fármacos, sus beneficios y las complicaciones que estos podrían desencadenar considerando el que existiera un balance entre los efectos secundarios así como las posibles ventajas que estos presentarían. Así pues, se han empleado monoterapias usando sucralfato (Wyatt Co, England), análogos de

---

las prostaglandinas, metaclopramida, acetoamifen (Bristol Co, England), propanolol y una amplia gama de antimicrobianos los cuales han demostrado tener poca efectividad en términos de la erradicación del *H. pylori* (Sjöström y Larson, 1996; Sjöström et al., 1996).

#### 4.- Factores de patogenicidad de *Helicobacter pylori*.

En un pequeño número de enfermedades crónicas, el microorganismo puede permanecer por períodos prolongados, pero el número es gradualmente reducido, siendo difícil de encontrarlo y eliminarlo ya que permanece en sitios inaccesibles a terapias convencionales de antibióticos.

En relación a la forma de vida que presenta *H. pylori* tiene más bien un comportamiento como parásito, ya que comparte con estos la alta habilidad de ser un excelente colonizador.

La erradicación de *H. pylori* ha mostrado una gran dificultad por lo que se tiene la necesidad de entender la manera que tiene de colonizar el tracto gastroduodenal a fin de conseguir de una forma más acertada, como abordar esquemas de terapia y de profilaxis para controlar la infección.

Se conoce que el estómago provee un medio ambiente hostil para los microorganismos con lo cual previene el paso al intestino de microorganismos potencialmente patógenos. El incremento en la susceptibilidad de infecciones con bacterias cuando las funciones gástricas son incompletas es evidente por lo inefectivo de los mecanismos de defensa (Belitsos et al., 1992; Wildersmith, 1992). Para que *H. pylori* tenga éxito en este ambiente gástrico hostil, donde otros muchos organismos han fallado, le ha significado tener que experimentar la adquisición de adaptaciones notables y hasta ahora, muy poco entendidas. Así pues, el

---

entendimiento de estos rasgos adquiridos es la clave para dilucidar el mecanismo de colonización de *H. pylori*.

#### **a. Adhesinas.**

La actividad de ureasa y la movilidad son los únicos factores de virulencia que se ha comprobado que operan durante el proceso de colonización del huésped; sin embargo, *H. pylori* muestra una muy definida especificidad en cuanto a la colonización del estómago, lo cual es difícilmente explicado basándonos en estas propiedades (Krakowka et al., 1987; Radin et al., 1990; Lee et al., 1990). Se ha encontrado que *H. pylori* tiende a colonizar de una manera específica y predominante a su huésped en la parte antral del estómago y se ha demostrado una firme adherencia de la bacteria a la mucosa gástrica, la cual parece estar adherida a pedestales de manera semejante al mecanismo que se presenta en la infección con *Escherichia coli* enterotoxigénica (Godwin et al., 1986; Godwin et al., 1989a). Si nos basamos en lo ocurrido con otros patógenos gastrointestinales, el tropismo hacia tejidos es usualmente explicado por la presencia de adhesinas específicas, las cuales son moléculas que tienen complementaridad con los sitios receptores en el tejido para la unión de las bacterias por medio de interacciones con ligandos específicos. Se ha tratado de identificar a las adhesinas de *H. pylori* en base a su capacidad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies de animales, demostrándose de esta manera que *H. pylori* reconoce receptores celulares de un número considerado de especies animales (Emödy et al., 1988; Evans et al., 1988; Huang et al., 1988; Robinson et al., 1990; Wadström, 1990). Dado el número potencial de receptores que están expuestos en la superficie de las células gástricas implicaría que el número de adhesinas que *H. pylori* adquirió vía adaptación, fuera también muy amplio. Sin embargo, la mayoría de las interacciones de los receptores de las bacterias están mediadas por carbohidratos

en la célula huésped. Trust y colaboradores (1991) han mostrado que una proteína de adhesión y de hidrofobicidad, expuesta en la superficie celular, promueven la unión de *H. pylori* a laminina (Trust et al., 1991). Estudios de adhesión in vitro de *H. pylori* han sido descritos empleando una variedad de líneas celulares como son: células de intestino INT-407 (Neman-Simha y Mégraud, 1988); células adrenales YI (Evans et al., 1989); células derivadas de carcinoma gástrico Kato III (Hemalatha et al., 1991; Dunn et al., 1991) y células de carcinoma epitelial HeLa (Fauchere y Blaser, 1990).

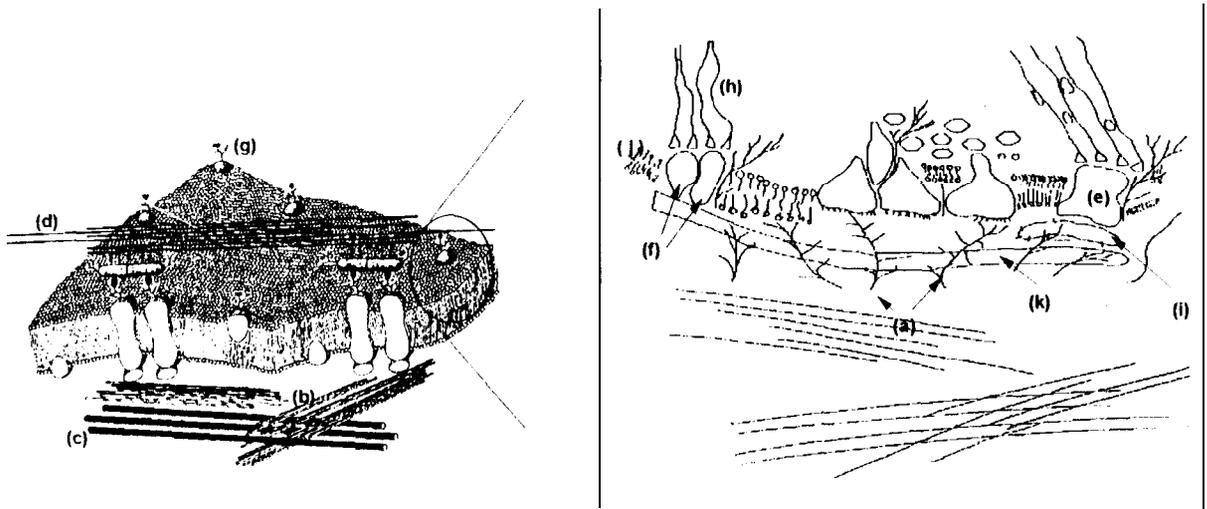
#### **b. Adherencia e Intemañización.**

Los mecanismos de *H. pylori* para inducir la enfermedad gastroduodenal no están bien establecidos (Newell, 1991; Marshall, 1991; Sinclair, 1991; Lee y Hazell, 1993; Dunn, 1991). Factores involucrados en la patogenicidad de enfermedades entéricas causadas por otras bacterias patógenas, incluyen la ingestión oral del microorganismo, colonización y adherencia bacteriana a la superficie de la mucosa, seguida ésta por la producción de toxinas o la invasión de la mucosa (Finlay y Falkow, 1989). Durante el curso de una infección, *H. pylori* coloniza la superficie del epitelio gástrico, especialmente el antrum, debido al medio ambiente ácido que predomina en el lumen del estómago donde *H. pylori* reside permanentemente aunque al parecer *H. pylori* coloniza en microambientes con un pH más neutro generado por la capa de bicarbonato del moco que se encuentra inmediatamente adyacente a la superficie del epitelio gástrico (Marshall et al., 1990). Durante la adhesión de *H. pylori* a la superficie gástrica se produce una disrupción del microvello apical de la membrana normal, dando como resultado un contacto íntimo entre la superficie del microorganismo y la membrana plasmática de las células epiteliales (Hessey et al., 1990; Dytoc et al., 1993).

## **5.- Proteínas de la matriz extracelular en células de la mucosa gástrica**

Muchos microorganismos patógenos poseen la habilidad de adherirse a sustratos o superficies, por lo que se considera que el éxito de la colonización empieza por la capacidad que tiene el patógeno para adherirse a una superficie, propiedad que es también considerada como un factor de virulencia fundamental (Krogfelt, 1991). La interacción inicial en la unión entre el hospedero y el patógeno puede determinar el resultado futuro del proceso de infección, Sin adhesión al hospedero, el microorganismo patógeno puede no ser capaz de persistir en el foco inicial de la infección y establecerse en el huésped, lo cual prevendría la colonización y como consecuencia la enfermedad. Una gran cantidad de estudios han sido enfocados a los procesos de interacción entre patógeno y hospedero con el fin de identificar los componentes del patógeno involucrados en la unión y adhesión, así como poder describir los receptores del hospedero que son reconocidos por el patógeno (Klemm, 1985; Doig et al., 1988; Liu, 1991; Collinson et al., 1993)

Los componentes de la matriz extracelular del hospedero son posibles sitios para la unión de la bacteria (Höök et al. 1988; Westerlund, 1989; Korhonen et al., 1992). La matriz extracelular es un complejo que puede estar formado por una variedad de carbohidratos, glicoproteínas, proteínas y proteoglicanos, tales como laminina, fibronectina, colágena, vitronectina, sulfato de heparina entre otros (Kleinman et al., 1982; Paulsson, 1987; Ruoslahti, 1988; Timpl et al., 1979; Beck et al., 1990; Engel, 1992;); estos compuestos tienen estructuras complejas con cadenas de conjunción múltiple las cuales se encuentran involucradas en la unión intracelular (Figura 1). Su amplia distribución en el cuerpo del hospedero hace de estos compuestos candidatos ideales como receptores para que los microorganismos logren la colonización de una variedad de nichos (Kukkonen et al., 1993).



**Figura I.** Constituyentes de la matriz extracelular de células epiteliales de la mucosa

a) proteoglicanos (sulfato de heparina); b) microfilamentos; c) microtúbulos; d y k) colágena; e) proteínas; f y g) adhesinas; h) actina; i) glicoproteínas; j) glicolípidos.

**B. Modelo II: Inhibición de la adherencia de cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* a células de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).**

Entre las infecciones que se presentan comúnmente en el humano por consumo de organismos marinos contaminados con especies de *Vibrio*, sobresalen las infecciones gastrointestinales y septicemias, producidas particularmente por *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus*. Sin embargo, poco se conoce sobre el impacto en salud pública que representan otras especies del género *Vibrio* (Kelly y Stroh, 1988). Cabe señalar también, que la relación que existe entre el consumo de alimentos contaminados por *Aeromonas spp.* y las enfermedades gastrointestinales en humanos, no ha sido aún claramente establecida (Palumbo et al., 1989), Altwegg y colaboradores (1991) aislaron recientemente la misma cepa de *A. hydrophila* de un paciente con infección gastrointestinal y del platillo a base de camarones que había sido ingerido por dicho individuo. En adición, se ha encontrado que cepas aisladas de varios productos alimenticios, de peces así como

del medio ambiente, no difieren de las cepas aisladas de humanos con infecciones gastrointestinales (Santos et al., 1988; Palumbo et al., 1989; Kirov et al., 1990).

### **I.- Familia *Vibrionaceae*: Generalidades y descripción.**

La familia *Vibrionaceae* comprende bacilos no esporulados, rectos o ligeramente curvos, anaeróbicos, Gram-negativos, miden 0.3-1.0 X 1-3.5  $\mu\text{m}$ . Estos microorganismos pueden poseer flagelos polares lo que les confiere movilidad. Estas bacterias son heterotróficas y producen indol fenol-oxidasa y catalasa; fermentan glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácido y/o gas; reducen nitratos a nitritos y producen una amplia gama de enzimas extracelulares. El rango de crecimiento de estas bacterias está entre 4° y 44°C (con una temperatura óptima entre 22° y 28°C), el rango de pH óptimo para su crecimiento es entre 4 y 9. Las *Aeromonas spp.* a diferencia de los *Vibrio*, son resistentes al agente vibrioestático 2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina (O/129) (Baumann y Schubert, 1984).

Tanto las especies de *Aeromonas*, como las de *Vibrio* son microorganismos cosmopolitas, encontrándose a cualquier salinidad del mar, preferentemente en aguas estuarinas con un alto contenido de materia orgánica. Solamente algunas especies de *Vibrio* han sido reportadas como patógenos, ya que existen otras especies que son inocuas o actúan únicamente como comensales (Baumann y Schubert, 1984; Hjeltnes y Roberts 1994).

Las especies *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. salmonicida* y *V. vulnificus* han sido reportadas como especies patógenas para peces marinos. Encontrándose todas ellas asociadas con septicemias bacterianas o lesiones

focales crónicas en especies de peces marinos. La Vibriosis en peces está acompañada de alguna condición de estrés o trauma físico, aunque algunas especies como son *V. anguillarum* o *V. salmonicida* resultan ser patógenos primarios altamente infecciosos (Hjeltnes y Roberts 1994).

De igual manera, la prevalencia y distribución de *Aeromonas* móviles en hábitats dulceacuícolas ha sido bien documentada (Hazan et al., 1978; Rippey y Cabelli, 1979; Burke et al., 1984; Schubert, 1991). Estas bacterias pueden ser encontradas tanto en aguas contaminadas como no contaminadas, aguas negras y aguas potables (Burke et al., 1984; Monfort y Baleux, 1990; Araujo et al., 1991; Poffe y De Beeck, 1991; Schubert, 1991). A pesar de que estos patógenos fueron considerados originalmente como organismos dulceacuícolas, un amplio número de reportes han demostrado que *Aeromonas* se encuentra también ampliamente distribuida en ambientes marinos (Hazan et al., 1978; Kaper et al., 1981; Williams y La Rock, 1985; Abeyta et al., 1990). En adición, la abundancia e incidencia de *A. hydrophila* en ecosistemas acuáticos está representada por una distribución estacional; los números se incrementan con la temperatura, con un máximo durante el verano y una incidencia mínima durante el invierno (Burke et al., 1984; Abeyta et al., 1990; Monfort y Baleux, 1990).

## **2.- Importancia de *Vibrio* y *Aeromonas* en acuicultura y su impacto en salud pública.**

El significado económico que representan las especies del género *Aeromonas* y *Vibrio* es alto debido a que producen un síndrome de hemorragia severa o síndrome de enfermedades úlceraivas (SEU), en una variedad de peces (Boulanger et al., 1977; Austin y Alle-Austin, 1985; Trust, 1986; McGarey et al., 1991; Shotts et al.,

1991). Generalmente, pueden ser los patógenos que con mayor frecuencia se encuentran asociados con enfermedades de peces (Trust, 1986). Un reporte reciente demuestra que del 50-80% de la captura diaria de peces en el río St John en Florida exhibía lesiones SEU (McGarey et al., 1991). Aunque muchas cepas de *Aeromonas spp.* pueden ser patógenos oportunistas, otras se comportan claramente como patógenos primarios (Trust, 1986; Hjeltnes y Roberts 1994). Infecciones causadas por *A. hydrophila* pueden ocurrir tanto en mamíferos como en otros organismos; sin embargo, no siempre ocurren infecciones letales en un 100% de la población y los sobrevivientes poseen un alto título de anticuerpos (IgM/IgG) (Austin y Alle-Austin, 1985).

Resulta difícil de explicar la diferencia que existe en la incidencia estacional con la que presentan las especies de la familia *Vibrionaceae* en poblaciones naturales o de cultivo de organismos marinos, aunque una respuesta a ello sería lo referente a las condiciones ambientales y a la calidad del agua (Kelly y Stroh, 1988). De aquí que el control de enfermedades producidas en organismos marinos en cultivo esté directamente relacionado a los factores que facilitaron la invasión microbiana de un determinado huésped y por consiguiente, dicho control es también dependiente de la calidad del agua de los sistemas de cultivo.

Dado que en ocasiones resulta difícil determinar qué factores alteraron la calidad sanitaria del cultivo de organismos marinos, se emplean terapias de antibióticos como mecanismos de control de infecciones producidas por especies de la familia *Vibrionaceae*. Sin embargo, la quimioterapia en acuicultura dependerá en gran medida de la disponibilidad de regulaciones sanitarias sobre el uso de antibióticos (Hjeltnes y Roberts 1994). La razón de ello estriba en que estos microorganismos desarrollan muy rápidamente resistencia a antibióticos, por lo que recientemente se

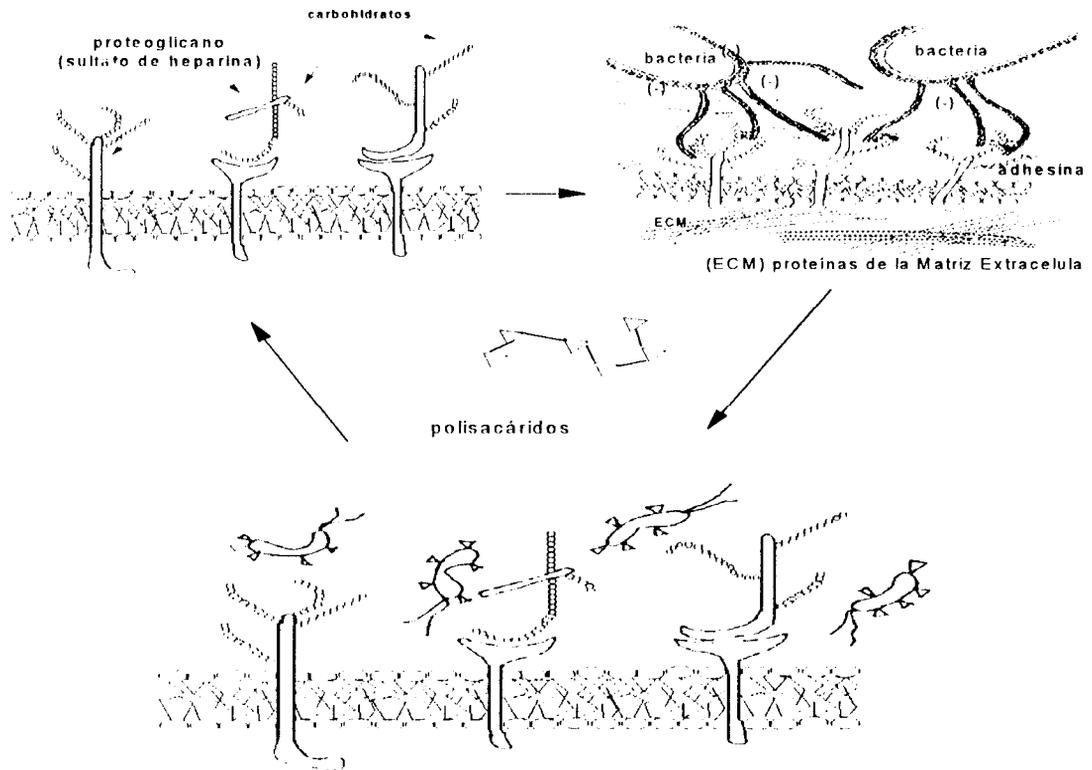
---

explora la posibilidad de establecer esquemas de vacunación como medida profiláctica y aunque existen en el mercado algunas vacunas comerciales, éstas están dirigidas principalmente a problemas infecciosos en peces de agua dulce, más no especies marinas.

## II. JUSTIFICACION.

Uno de los programas institucionales del CIB-Nor, S.C., se refiere a investigaciones biotecnológicas básicas para el Uso y Manejo de Recursos Naturales y a su aprovechamiento integral, así como a favorecer alternativas encaminadas al establecimiento de estrategias para el uso y control racional de los recursos naturales; quedando incluido dentro de este último aspecto biotecnológico el proyecto Aplicación Biotecnológica de Microalgas y el proyecto Estudio de Organismos del Medio Marino para la Prevención y Control de Enfermedades. Este último en un proyecto que involucra los estudios bioquímicos, inmunológicos y moleculares encaminados al establecimiento de estrategias inmunoproliféricas para la prevención y control de infecciones microbianas, así como al esclarecimiento de la incidencia de *H. pylori* y de especies de *Vibrio* y *Aeromonas* en organismos asociados al medio marino y su impacto en la población de la región.

Teniendo en consideración que estudios recientes han demostrado que ciertas especies bacterianas expresan componentes de superficie que tienen afinidad por el sulfato de heparina que se encuentra en las células epiteliales de las mucosas y que estas uniones son eficientemente bloqueadas por el sulfato de heparina, oligosacáridos de heparina y por carbohidratos sulfatados se plantea la hipótesis de que polisacáridos sulfatados, homólogos a los receptores expuestos en las células epiteliales de la mucosa y que son reconocidos por patógenos como *H. pylori*, pueden competir y desplazar al agente patógeno (Figura 2).



**Figura 2. Modelo hipotético de inhibición y desplazamiento bacteriano a células epiteliales de la mucosa**

Aunado esto a la incidencia mundial de enfermedades ulcerativas tanto en humanos como en peces, el desarrollo de compuestos terapéuticos efectivos para prevenir y controlar enfermedades producidas por patógenos responsables de tales enfermedades deben de ser consideradas como una prioridad, lo cual nos daría un avance considerable en el establecimiento de estrategias a seguir para controlar y prevenir la infección, utilizando para ello compuestos que tienen potencial para ser explotados biotecnológicamente como son los polisacáridos sulfatados aislados de microalgas. Así pues se propone que la utilización de polisacáridos sulfatados de microalgas, podrían ser una estrategia importante en la terapia anti-adhesiva durante el tratamiento de un

proceso infeccioso y reducir con ello también el uso de antibióticos y evitar la subsecuente generación de cepas resistentes a estos compuestos.

El desarrollo de estrategias anti-adhesivas contra este patógeno será facilitado en la medida en que se genere el conocimiento detallado sobre la interacción biológica de estos compuestos al reaccionar con residuos análogos expuestos en las células del huésped y que desplazarían al patógeno.

## II. OBJETIVOS.

### Generales

El establecimiento de estrategias inmunoprolácticas para la prevenci3n y control de infecciones microbianas.

### Específicos.

1. Producir polisacáridos extracelulares de diferentes especies de microalgas, cultivadas bajo condiciones estándares de laboratorio.
2. Aislar polisacáridos sulfatados de microalgas presentes extracelularmente en los medios de cultivo.
3. Evaluar la actividad anti-adhesiva que tienen los polisacáridos sulfatados sobre la adhesión de *H. pylori* a líneas celulares humanos (HeLa S3 y Kato III).
4. Evaluar la actividad anti-adhesiva que tienen los polisacáridos sulfatados sobre la adhesión de *Vibrio* y *Aeromonas* a células de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*).
5. Comparar el potencial anti-adhesivo de los polisacáridos sulfatados aislados de microalgas con compuestos tradicionalmente empleados en terapias anti-adhesivas, tales como anticuerpos policlonales y monoclonales, ligandos y receptores específicos involucrados en el proceso adhesivo y péptidos sintéticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS.

### 1.- Preparación y purificación de polisacáridos de microalgas.

#### a.- Cultivos de microalgas.

Las cepas de microalgas consideradas en el presente trabajo (Tabla 1), fueron cultivadas en medio F/2 (Apéndice 1.a), (Guillard y Ryther, 1962), incubadas a 25°C en matraces Erlenmeyer de 250 ml e iluminadas con lámparas fluorescentes blancas (Claustre y Ciestan, 1987). Las microalgas se cosecharon en fase estacionaria por centrifugación a 6,000 x g/4°C/20 min.

**Tabla 1.** Cepa de microalgas utilizadas en el presente trabajo.

Nombre científico	Salinidad	Procedencia
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	3.6 %	USCE
<i>Chlorella capsulata</i>	3.6 %	UTEX / 2074
<i>Chlorella sp.</i>	3 - 6 %	CCMP
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	3.6%	USCE
<i>Nannochloropsis oculata</i>	3.6 %	Cuba
<i>Tetraselmis suecica</i>	3.6%	USCE
<i>Tetraselmis sp.</i>	3.6 %	CCMP
<i>Isochrysis galbana</i> var. <i>tahitiana</i>	3.6 %	Cuba
<i>Isochrysis sp.</i>	3.6 %	CCMP
<i>Rodhosorus marinus</i>	3.6 %	UTEX / LB 1723
<i>Chaetoceros sp.</i>	3.6 %	CCMP
<i>Botryococcus braunii</i>	0 - 0.25 %	Gotingen, Alemania
<i>Botryococcus sudeticus</i>	0 %	UTEX / 2629
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	0 %	UTEX / 729
<i>Chlorococcum oleofaciens</i>	0 - 0.25 %	UTEX / 105
<i>Dysmorphococcus globosus</i>	0 %	UTEX / LB 65
<i>Hormotilopsis gelatinosa</i>	0 %	UTEX / 104
<i>Neochloris oleoabundans</i>	0 - 0.75 %	UTEX / 1185
<i>Ochromonas danica</i>	0 - 0.25 %	UTEX / L 1298

UTEX: The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin, USA. **Cuba:** Cepas de la Delegación Provincial de la Ciudad de la Habana del Ministerio de Ciencia y Tecnología y

Medio Ambiente de Cuba. USCE: Colección del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, España. CCMP: Provasoli-Guillar Center for Culture of Marine Phytoplankton. West Bootbay Harbor, Mine USA.

### **b.- Aislamiento y purificación parcial de polisacáridos de microalgas por el método de precipitación con cloruro de cetil pirimidio CPC (Ramus, 1972).**

Las microalgas se cosecharon en fase estacionaria por centrifugación a 6,000 x g/4°C/20 min, separando el sobrenadante (inicial) y el paquete celular. El paquete celular se lavó con agua destilada/agua de mar (según la concentración de cloruro de sodio requerida por la cepa) y se dejó en agitación durante 24 horas a 40°C. Posteriormente se centrifugó a 45, 000 x g durante 20 min, separando el sobrenadante que se mezcló con el sobrenadante inicial. La mezcla total se filtró a través de una membrana Millipore de 0.45µm. Se añadió NaCl al sobrenadante total, hasta llevar la solución a una concentración final 0.05 M y el detergente cloruro de cetil pirimidio (CPC) hasta llevar la solución a una concentración final de 0.1%. La mezcla se calentó a 40°C durante una hora, para asegurar un mayor rendimiento en el aislamiento de los polisacáridos sulfatados a partir de las porciones que permanecen intracelulares; se centrifugó a 6000 x g/20 min y el precipitado obtenido se lavó con NaCl 0.05 M y CPC 0.1% a una temperatura de 40°C por 30 min. El precipitado se solubilizó con una solución de CaCl<sub>2</sub> 2.0 M, con agitación constante y llevando a 40°C durante 30min. Se precipitó nuevamente con 3 volúmenes de etanol frío, el precipitado se lavó con etanol, etanol-éter (1: 1 v/v) y éter, centrifugando en cada etapa de lavado a 6000 x g/15 min. Los

polisacáridos crudos (150 mg) fueron aplicados a una columna de DEAE-celulosa (9 x 12 cm) equilibrada con un regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0 y lavada con 200 ml del mismo regulador conteniendo 0.2 M de cloruro de sodio y 10 mM de EDTA. La columna se eluyó con un gradiente lineal preparado por la mezcla de 150 ml de solución A (regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0, conteniendo cloruro de sodio 0.2 M y EDTA 10 mM) y 150 ml de solución B (regulador de acetato de sodio 50 mM, pH 5.0, conteniendo cloruro de sodio 1.2 M). El rango de flujo de la columna fue de 12 ml/h, a las fracciones se les determinaron los polisacáridos por la reacción de carbazol fenol-ácido sulfúrico (Apéndice 9).

## 2.- Bacterias, condiciones de cultivo y almacenamiento.

### a.- Cepas de *H. pylori*

Tabla 2. Cepas de *Helicobacter pylori* utilizadas en el presente estudio.

Cepas	Procedencia	Avance del padecimiento
25	Centro hospitalario de Helsingörg, Suecia	adenocarcinoma
17874	Colección de la Universidad de Göteborg, Suecia	adenocarcinoma
1139	Centro hospitalario de la Universidad de Lund, Suecia	úlceras
253		úlceras de duodeno
33		úlceras de duodeno
32		úlceras de duodeno
54		gastritis
6		gastritis
1222s		gastritis

Las cepas de *H. pylori* fueron almacenadas a -80°C en caldo soya triptica (TSB) conteniendo 15% (vol/vol) de glicerol y se cultivaron en agar sangre suplementado con eritrocitos de caballo al 5% (GAB-camp-agar), (Apéndice 1 .b. 1 ), durante 48-72 horas a 37°C bajo condiciones microaerofílicas (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> y 85 % de N<sub>2</sub>). Las cepas de *H. pylori* para emplearse en los bioensayos se ajustaron espectrofotométricamente a una densidad óptica (D. 0) de 1.0 a 540 nm, dando una concentración final de 10<sup>9</sup> ufc/ml. De esta suspensión bacteriana se partió para preparar el inóculo para los bioensayos. Se hicieron las diluciones de las bacterias en el medio de cultivo RPMI 1640 a una concentración final de 10<sup>7</sup> ufc/ml.

#### **b.- Cepas de *Vibrio* y *Aeromonas*.**

Las cepas empleadas en el estudio fueron aisladas de úlceras de tegumento, así como de órganos internos (sangre, riñón e intestino) de la cabrilla arenosa (*Paralabrax maculatofasciatus*), **obtenidas** del laboratorio de piscicultura del CRIP, La Paz, BCS. Las cepas se incubaron en agua peptonada por 24 horas a 35°C para su primer aislamiento, posteriormente se hizo una siembra en medios selectivos (agar MacConkey y agar TCBS) (Apéndices 1.b.2; 1.b.3) incubándose a 35°C. Se llegó a la identificación de las cepas mediante pruebas bioquímicas (Api 20 E, utilización de carbohidratos, descarboxilación de aminoácidos) así como de crecimiento a diferentes salinidades (0, 3, 6, 8 y 10% de NaCl) y temperaturas (37°C y 41 °C).

Las cepas aisladas fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en Agar Marino 2216 (Apéndice 1.b.4) conteniendo 15% (vol/vol) de glicerol. Las cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* para emplearse en los bioensayos se prepararon de una manera similar a como se describió con *H. pylori*.

### **3.- Líneas celulares de mamífero y cultivos primarios de células de peces utilizadas en este estudio.**

#### **a.- Líneas celulares de mamífero.**

Se usaron las líneas Kato III obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC) derivada de carcinoma gástrico humano y HeLa S3 (ATCC), derivadas de carcinoma epitelial de cervix humano. Las células fueron crecidas en frascos de cultivo de  $75\text{ cm}^2$ , conteniendo medio RPMI 1640, suplementado con 40  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, 2 mM de L-glutamina y suero fetal de ternera a una concentración de 10 al 20% (RPMI1640-completo). Los frascos de cultivo fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  (95% de humedad relativa y 5% de  $\text{CO}_2$ ). Las células se lavaron con un regulador salino de fosfatos pH 7.2 (PBS-A) y después fueron tratadas con tripsina (0.25% en solución modificada de Hank's) por 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , para permitir que las células se despeguen de la superficie plástica de la botella de cultivo; las células tripsinizadas se resuspendieron en medio de cultivo RPMI1640-completo y fueron transferidas a una nueva botella de cultivo cada 5 días, a bien de suministrarles nutrientes y eliminar desechos metabólicos.

Para los bioensayos, las células tripsinizadas a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml fueron transferidas a placas de cultivo de 24 pozos las cuales

contenían cubreobjetos y se incubaron por 16 horas para permitir la adherencia de las células en los cubreobjetos.

#### **b.- Células de peces.**

Se usaron células de intestino, branquias, tegumento y linfocitos T de cabrilla arenera (*Paralabrax maculofaciatus*) sanas, obtenidas del laboratorio de piscicultura del CRIP, La Paz, BCS. Las células fueron preparadas como se indica en el Apéndice 10 a y 10 b.

Las células se mantuvieron en placas de 96 pozos, conteniendo medio RPMI 1640, suplementado con 40 µg/ml de gentamicina; 2 mM de L-glutamina y suero de caballo a una concentración de 20% (RPMI 1640-completo). Las placas de cultivo se incubaron a 22°C (95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>). Para los bioensayos, las células se prepararon en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 20 % de suero de caballo y 40 µg/ml de gentamicina a una concentración de  $2.4 \times 10^4$ .

### **4.- Estandarización de métodos para la evaluación de la adherencia bacteriana a líneas celulares seleccionadas.**

#### **a.- Determinación de la adherencia bacteriana a líneas celulares por microscopía.**

Las células Kato III y HeLa S3 fueron adheridas a cubreobjetos e infectadas con *H. pylori* adicionando a cada pozo 200 µl de la suspensión bacteriana

preparada como se describió anteriormente. Las placas de cultivo se incubaron a diferentes tiempos (1, 3 y 6 h.). Después de la infección de las monocapas con *H. pylori*, se lavaron 3 veces con PBS para retirar el exceso de bacterias no adheridas. Las monocapas se tiñeron utilizando la tinción de Gram. Para cuantificar el número de células que presentan bacterias adheridas, se contaron 100 células por monocapa, por triplicado para cada tiempo de incubación, los resultados se expresan como Índice de Adhesión, que es el porcentaje de la media de células infectadas. Los experimentos se corrieron por triplicado.

#### **b.- Determinación de adherencia bacteriana a líneas celulares por microscopia de doble fluorescencia.**

Las células Kato III y HeLa S3 fueron adheridas a cubreobjetos e infectadas con *H. pylori*, como se describe anteriormente, incubando a diferentes tiempos (1, 3 y 6 h.). Después de la infección, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS para retirar el exceso de bacterias no adheridas. Las monocapas se incubaron por 15 min a 22°C con PBS conteniendo leche descremada al 5% y Tween-20 al 0.01% (regulador de bloqueo). El regulador de bloqueo se descartó y se adicionó anticuerpo de conejo (anti-*H. pylori*), (Apéndice 3) en una dilución de 1: 100 preparada en el mismo regulador de bloqueo. Las monocapas se incubaron por 30 min a 22°C, posteriormente se lavaron con PBS y se fijaron en metanol por 5 min a 4°C, para luego dejarlas secar al aire. Se adicionó IgG anti-conejo conjugado con isotiocinato de fluoresceína diluido 1:50 con el regulador de bloqueo y se incubaron por 30 min a 22°C. Las monocapas se tiñeron 5 min con yoduro de propidio a una concentración de 25 µg/ml y se cuantificaron al microscopio de fluorescencia, con el filtro de 490 de excitación.

Los resultados son expresados como Índice de Adhesión, que es el porcentaje de la media de células infectadas. Los experimentos se corrieron por triplicado.

**c.- Determinación de adherencia bacteriana a líneas celulares por espectrofluorometría.**

Para los bioensayos las células HeLa S3 tripsinizadas a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml se transfirieron a placas de cultivo de 96 pozos incubándolas por 16 horas en las condiciones antes mencionadas y se lavaron las células 3 veces con RPMI sin antibiótico ni suero. Se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de suspensión de *H.pylori*, previamente marcadas con Succinimidil-7-amino-4-metilcumarina-3-ácido acético (AMCA-NHS) a una concentración de 1  $\mu$ g/mg de proteína, y después de 20 min de incubación a 22°C, se lavaron 3 veces con PBS para retirar el exceso de marcador fluorescente. Se incubaron las células con las bacterias por 3 h a 37°C. Se lavaron las monocapas con PBS 3 veces y se leyeron en un fluorómetro (Pharmacia) para placas de cultivo de tejidos con un filtro de 365 nm de excitación. Los resultados se reportan en Unidades Relativas de Fluorescencia (URF).

**d.- Determinación de adherencia de bacterias marcadas con  $^{125}$ I a proteínas de la matriz extracelular (ECM) de células HeLa S3 y matrigel inmovilizado en placas de cultivo de tejidos.**

Se adicionaron 20  $\mu$ g de proteína de la matriz extracelular (ECM) (Apéndice 4) en placas de cultivo de células de 96 pozos. Después de 16 hrs de incubación a 4°C, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 para remover el exceso de ECM

que no se pegó a la superficie de los pozos y se adicionaron 200 µl de albúmina al 3% en PBS para bloquear los posibles sitios activos en la superficie plástica de las placas de cultivo. Después de 1 h de incubación a 22°C, las placas se lavaron con PBS-Tween 20 y se adicionaron 100 µl de la suspensión de bacterias, previamente marcadas con <sup>125</sup>I (Apéndice 5). Las placas se incubaron durante 1 h a 22°C. El exceso de bacterias no adheridas a las superficies de los pozos fue aspirada, seguido de tres lavados con PBS-Tween 20 (previamente enfriado a 4°C). Finalmente la radioactividad presente en los pozos se cuantificó en un contador Gama y los resultados se expresan en función de la radioactividad adherida a las placas de cultivo en cuentas por minuto (cpm).

**e.- Determinación espectrofotométrica de la adhesión de bacterias marcadas con biotina a células HeLa S3.**

Para los bioensayos, las células HeLa S3 se tripsinizaron 4 X 10<sup>5</sup> células/ml y se transfirieron a placas de cultivo de 96 pozos incubándolas por 16 horas en las condiciones antes mencionadas. Se lavaron las células 3 veces con RPMI sin antibiótico ni suero y se incubaron durante 90 min a 37°C con *H. pylori* marcado con biotina-NHS (Apéndice 6). Las preparaciones se lavaron tres veces con PBS-Tween-20 (0.1 %); se adicionaron 100 µl de estreptavidina-peroxidasa y se incubaron las preparaciones por 90 min a 37°C. Se lavaron tres veces las preparaciones con PBS-Tween-20 y se adicionaron 100 µl del sustrato para peroxidasa orto-fenilenediamino (2 mg/12 ml de citrato de sodio 0.1 M, pH 5.0, conteniendo 15 µl de peróxido de hidrógeno (30%) incubando 20 min a 22°C en la oscuridad. La reacción se detuvo por adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 M. Las placas se leyeron en un espectrofotómetro a 492 nm.

Los resultados de adhesión se reportan en unidades de densidad óptica a 492 nm. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

**f) Determinación espectrofotométrica de la adhesión de bacterias marcadas con biotina a células de peces.**

Para los bioensayos la dilución  $2.4 \times 10^5$  de células fue preparada en el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 20% de suero de caballo y 40  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina.

Las células aisladas de los diferentes tejidos del pez se mantuvieron en placas de 96 pozos conteniendo medio RPMI 1640 suplementado con 40  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina, 2 mM de L-glutamina y suero de caballo a una concentración de 20% (RPMI1640-completo). Las placas de cultivo se incubaron a 22°C (95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>) durante 16 hrs. Las células se lavaron 3 veces con RPMI sin antibiótico ni suero y se incubaron durante 3 hrs a 37°C con *Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii* y *Aeromonas hydrophila*, previamente marcadas con biotina (Apéndice 6). Los resultados de adhesión se reportan en unidades de densidad óptica a 492 nm. Todos los experimentos se corrieron por triplicado.

**5.- Utilización de diferentes compuestos para inhibir y desplazar la adhesión de *Helicobacter pylori* a líneas celulares seleccionadas.**

Utilizando el procedimiento para la evaluación de la adherencia bacteriana por microscopía de doble fluorescencia, espectrofluorometría y radioactividad, se

procedió a evaluar la actividad inhibitoria de polisacáridos sulfatados de microalgas a fin de comparar su potencial inhibitorio con el de compuestos tradicionalmente empleados en terapias anti-adhesivas durante procesos infecciosos.

#### **a.-Estudio de inhibición de adhesión de bacterias por microscopia de doble fluorescencia.**

Placas de cultivo con células Kato III (preparadas como se describe anteriormente), se incubaron durante 1 h a 37°C con los siguientes compuestos: 1) Adhesinas de *H. pylori* con afinidad por sulfato de heparina: HSBP40, HSBP60, HSBP80, HSBP100 (Apéndice 2); 2) Proteínas inducidas por estres de *H. pylori* (Hsp60) (Apéndice 2); 3) Proteínas asociadas a la envoltura celular, fracción extraída con agua (Apéndice 2); 4) Sueros completos de conejo contra las fracciones HSBP de *H. pylori* (Apéndice 3) y 5) Suero completo de ratón contra Hsp60 de *H. pylori* (Apéndice 3). Se agregaron a cada pozo 100 µl de suspensión de *H. pylori*. Después de la infección, las monocapas se trataron como se describió anteriormente para la determinación de adhesión bacteriana por el método de doble fluorescencia.

#### **b.- Estudio espectrofluorométrico de inhibición de la adhesión de *H. pylori* a líneas celulares.**

Para los bioensayos de inhibición, las células HeLa S3 se prepararon como anteriormente se describió y se incubaron durante 1 h a 37°C con los siguientes compuestos: 1) Exopolisacáridos sulfatados obtenidos de microalgas; 2)

Adhesinas de *H. pylori* con afinidad por sulfato de heparina: HSBP40, HSBP60, HSBP80, HSBP100; 3) Proteínas de *H. pylori* inducidas por estrés (Hsp60); 4) Proteínas asociadas a la envoltura celular (extracción con agua); 5) Péptidos sintéticos análogos a los péptidos de unión a heparina de la Hsp70 (LIGRK y LIGRR) de células eucariontes (Hansen et al., 1995) y la secuencia de péptidos de unión a heparina de la fibronectina (LIGRKKT); 6) IgG de conejo contra HSBP (bajo peso molecular); 7) IgG conejo contra HBSP (alto peso molecular); 8) Sueros completos de conejo contra las fracciones HSBP y 9) Suero completo de ratón contra Hsp60 de *H. pylori*. Se agregaron a cada pozo 100  $\mu$ l de suspensión de *H. pylori*, previamente marcadas con AMCA-NHS a una concentración de 1  $\mu$ g/mg de proteína. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS para retirar el exceso de marcador fluorescente. Se incubaron las células con las bacterias por 3 hrs a 37°C. Se lavaron las monocapas con PBS 3 veces y se leyeron en el fluorómetro con un filtro de 365 nm de excitación. Los resultados son expresados en Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU).

**c) Estudio espectrofotométrico de inhibición de adhesión de bacterias marcadas con biotina.**

En el estudio de inhibición de la adhesión de bacterias marcadas con biotina, se procede de la misma manera a como se describe el procedimiento espectrofotométrico de adhesión, sólo que las bacterias marcadas son previamente incubadas durante 1 h a 22°C con las diferentes preparaciones de polisacáridos sulfatados y los otros compuestos inhibidores que se desea estudiar. Los resultados de inhibición se reportan como porcentaje relativo de inhibición en base al porcentaje de adhesión de bacterias marcadas sin inhibidor.

**6.- Utilización de polisacáridos sulfatados de microalgas para inhibir la adhesión de cepas de *Vibrio alginolyticus*, *V. ordalii*, *V. vulnificus* y *Aeromonas hydrophila* a células de cabrilla arenera (branquias, intestino, tegumento y sangre).**

En el estudio de inhibición de la adhesión de bacterias marcadas con biotina, se procede de la misma manera a como se describe el procedimiento espectrofotométrico de adhesión, sólo que las bacterias marcadas son previamente incubadas durante 1 h a 22°C con las diferentes preparaciones de polisacáridos sulfatados y los otros compuestos inhibidores que se desea estudiar. Los resultados de inhibición se reportan como porcentaje relativo de inhibición en base al porcentaje de adhesión de bacterias marcadas sin inhibidor.

## V. RESULTADOS.

### 1.- Estandarización de métodos para la evaluación de la adherencia bacteriana a líneas celulares.

Se estandarizaron varios métodos de estudio a fin de poder contar con alternativas que sirvieran para dilucidar de una manera rápida y cualitativa si una muestra bacteriana tiene la habilidad de adherirse a una línea celular. Sin embargo, como se trataba de procesar un número grande de muestras a la vez, como era en el caso de los estudios de inhibición de adherencia bacteriana, fue preciso contar con métodos apropiados que nos permitieran, además de manejar un número grande de muestras, tener precisión, sensibilidad y rapidez.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los diferentes métodos de estudio para la determinación del grado de adhesión bacteriana a células animales. En base a los resultados obtenidos, al tiempo que se requiere para procesar una muestra y conocer el resultado, se pudo constatar que el método de microscopía simple fue el adecuado para determinar de una forma semicuantitativa si una muestra de *H. pylori* se adhiere o no a una línea celular.

Sin embargo, cuando se trata de procesar simultáneamente un gran número de muestras, el método espectrofotométrico fue el más adecuado, sobre todo si no

se cuenta con las facilidades técnicas que implican el uso de un fluorómetro o un contador gama.

**Tabla 3. Estandarización de métodos para la evaluación de adherencia de *Helicobacter pylori* a células animales.**

Método	Unidad de adhesión	Adhesión	*Eficiencia del método	Ventajas y desventajas
Microscopía Simple	Indice de Adhesión	52	3	<ul style="list-style-type: none"> <li>. No se requiere de materiales y reactivos costosos.</li> <li>. No se requiere de equipo sofisticado.</li> <li>. Resulta un método cualitativo simple.</li> <li>. <b>Método</b> laborioso en cuanto a la lectura de las muestras.</li> <li>. Método subjetivo.</li> </ul>
Microscopía de Doble fluorescencia	Indice de Adhesión	46	2	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Se pueden analizar adhesión e invasión simultáneamente.</li> <li>. Método laborioso en cuanto a la lectura de las muestras.</li> <li>. Se requiere de un microscopio de epifluorescencia con filtros específicos.</li> </ul>
Fluorometría	Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU)	1,270	1,152	<ul style="list-style-type: none"> <li>⚡ Se pueden procesar cientos de muestras simultáneamente.</li> <li>⚡ Método altamente sensible y preciso.</li> <li>⚡ Se pueden analizar adhesión e invasión simultáneamente.</li> <li>. Se requiere de equipo sofisticado.</li> </ul>
Contador Gama	Cuentas Por Minuto (CPM)	46,585	600	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Se pueden procesar cientos de muestras <b>simultáneamente</b>.</li> <li>. Método altamente sensible y preciso.</li> <li>. Se requiere de equipo sofisticado.</li> <li>. Restricciones para el uso de radioisótopos</li> <li>⚡ Uso restringido a personal calificado.</li> </ul>
Espectrofotómetro	Densidad Óptica a 492 nm	1,200	1,152	<ul style="list-style-type: none"> <li>. Se pueden procesar cientos de muestras simultáneamente.</li> <li>. Método altamente sensible y preciso.</li> <li>⚡ Se requiere de equipo sofisticado.</li> </ul>

**\*Manejo de muestras para obtener un resultado por ensayo/hora.**

## 2. Cinética de adhesión de *Helicobacter pylori* a líneas celulares.

Con el propósito de conocer los tiempos óptimos de la adhesión bacteriana y evitar tiempos excesivos de incubación bacteria-célula animal, se evaluó la adherencia de *H. pylori* a monocapas de células Kato III a diferentes tiempos de incubación.

Estudios de microscopía simple y de doble fluorescencia nos revelan la existencia de una relación entre el tiempo de incubación y el índice de adhesión de *H. pylori*, cepa 25, a la monocapa de células Kato III, encontrándose que a las 6 horas hay un máximo de adherencia (Figura 3).

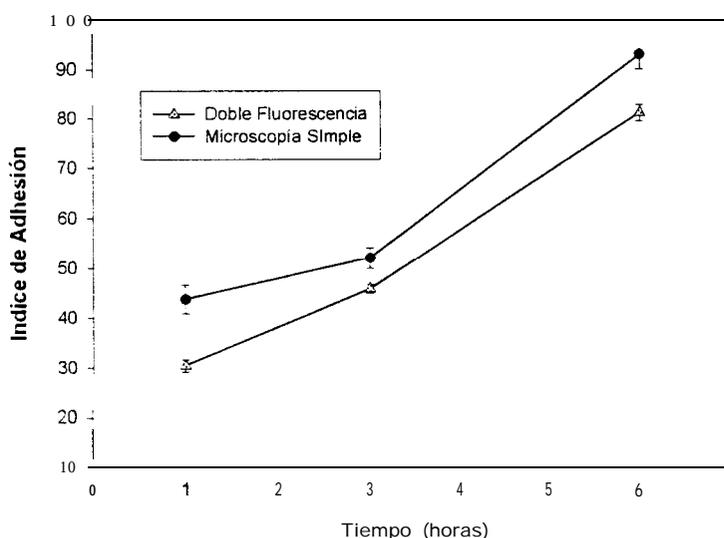
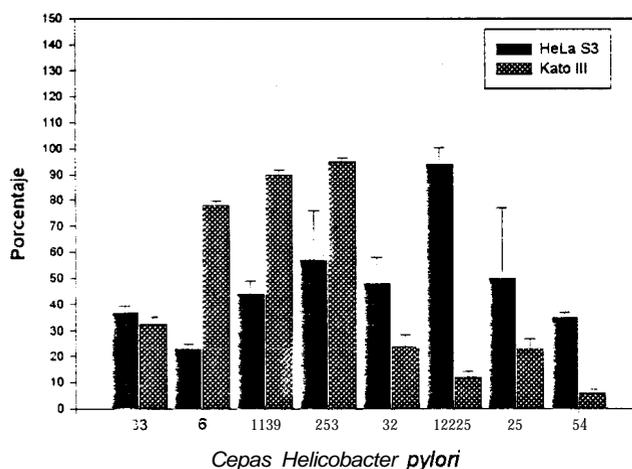


Figura 3. Cinética de adhesión de *H. pylori*, cepa 25, a células Kato III.

No obstante lo anterior, al incubar las preparaciones por períodos prolongados se pudo constatar de que ello tiene repercusión en la multiplicación del inóculo bacteriano adicionado con el consecuente abatimiento de los nutrientes y una alteración del pH del medio; por consiguiente esto ocasiona una disminución considerable en la viabilidad de las células animales.

En vista de los resultados obtenidos, para los estudios subsecuentes se tomó un tiempo de incubación de 3 horas, lo que por un lado nos aseguró una viabilidad celular, evitar la multiplicación bacteriana y reducir los períodos de incubación y los tiempos de los experimentos.



**Figura 4. Adhesión de cepas de *H. pylori* a líneas celulares.**

A fin de conocer la incidencia de fenotipo correspondiente a la expresión de una adhesina que le confiere a la bacteria adhesión a la línea celular, se estudió un lote de 8 cepas de *H. pylori* aisladas de pacientes con diferente grado de avance de la infección. La Figura 4 ilustra

que la adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3 y Kato III es una propiedad común para todas las cepas. Teniendo esto en consideración y en virtud de la información disponible sobre estudios relacionados con *H. pylori* se seleccionó la cepa No. 25 para estudios subsecuentes en el presente trabajo.

### **3. Inhibición de la adhesión de *Helicobacter pylori* a líneas celulares seleccionadas.**

#### **3.1. Utilización de polisacáridos de microalgas para inhibir la adhesión de *Helicobacter pylori* a líneas celulares.**

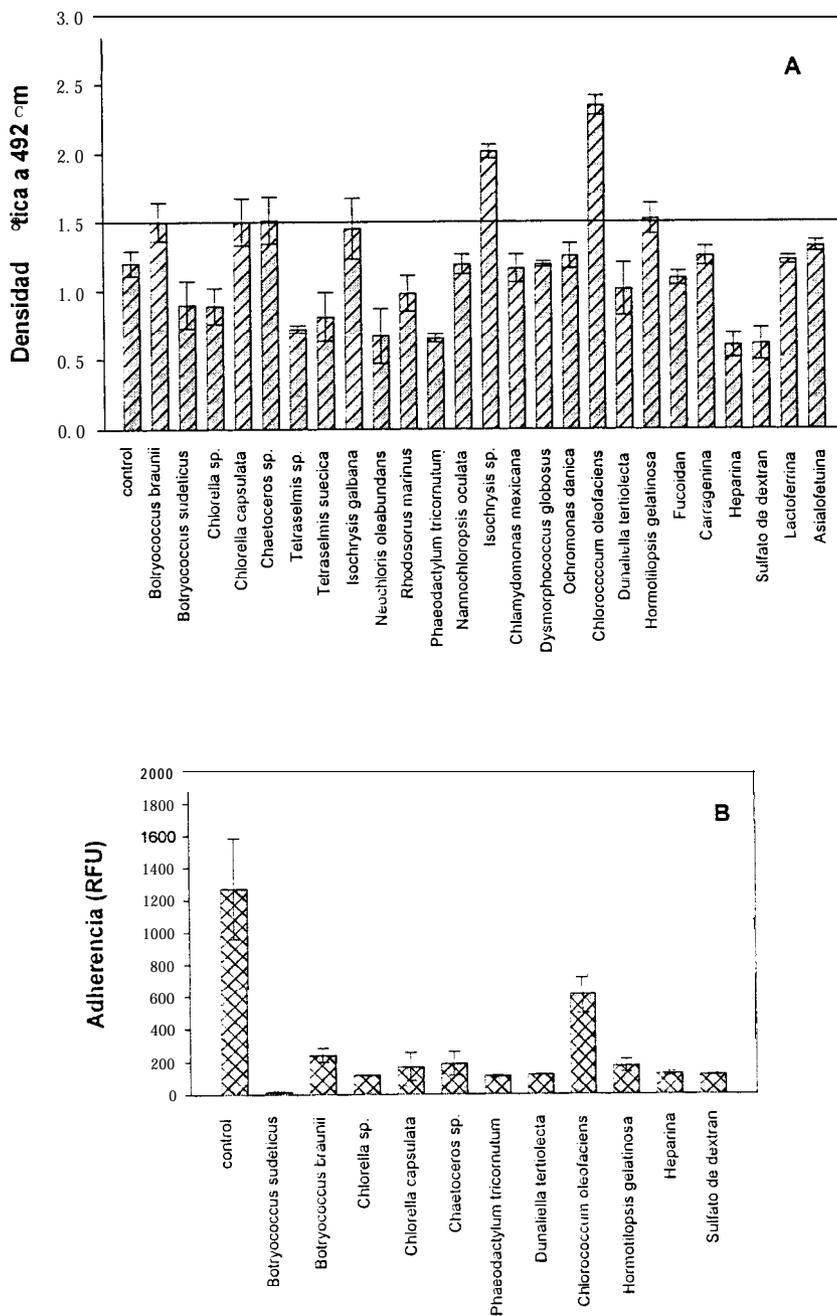
Dado el antecedente de que *H. pylori* tiene afinidad por los proteoglicanos sulfatados heparina y sulfato de heparina y en virtud de que su utilización como alternativas terapéuticas anti-adhesivas para prevenir la adhesión y el establecimiento de *H. pylori* en los tejidos de la mucosa de su huésped, resultaría costoso, además de que ello podría ocasionar efectos secundarios en el huésped, se determinó la posibilidad de utilizar polisacáridos sulfatados de microalgas como alternativa para la inhibición de la adhesión bacteriana. En la Figura 5 se ilustran los resultados referentes a la utilización de los polisacáridos sulfatados aislados de un grupo de 19 diferentes especies de microalgas.

El efecto que dichos polisacáridos ejercen sobre la adhesión de *H. pylori*, cepa 25, a células HeLa S3 es muy variado (Figura 5A); los polisacáridos de la microalgas *Tetraselmis sp*, *N. oleoabundans* y *P. tricorutum* son los que

producen un mayor grado de inhibición de la adhesión. Mientras que los polisacáridos de las microalgas *6. brauni*, *T. suecica*, *C. capsulata*, *Chaetoceros sp.*, *1. galbana*, *Isochrysis sp.*, *O. danica*, *C. oleofaciens* y *H. gelatinosa*, ejercen un efecto inverso, esto es, el grado de adhesión se ve incrementado con respecto al control.

Si consideramos que la concentración de polisacáridos sulfatados utilizada para el ensayo de inhibición (4 µg en 100 µL/pozo) con la concentración de heparina en el mismo ensayo de inhibición (100 µg en 100 µL/pozo) podemos ver que los resultados obtenidos de inhibición son mucho mayores con los polisacáridos sulfatados que con la heparina.

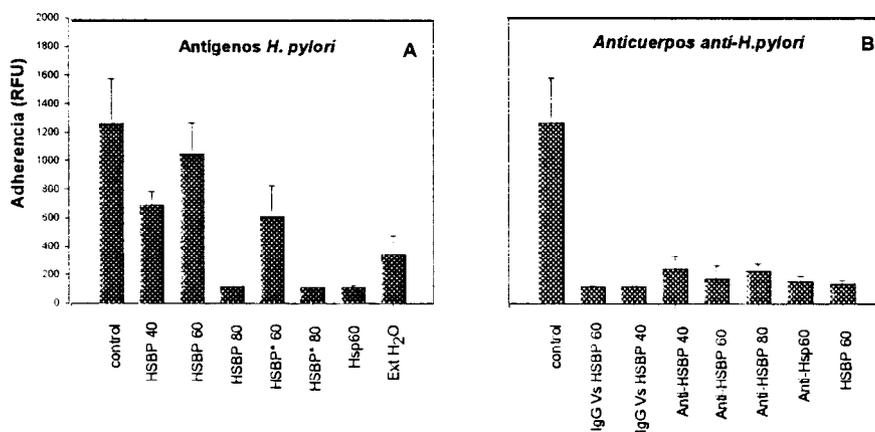
A manera de comparar el efecto inhibitorio de la adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3 se corrieron experimentos mediante el método espectrofotométrico (Figura 5A) y el método espectrofluorométrico (Figura 5B). Como se ilustra en la Figura 5 ambos métodos nos permiten apreciar el efecto inhibitorio de los polisacáridos sulfatados, sin embargo el método espectrofluorométrico ofrece una mayor resolución (Figura 5B).



**Figura 5.** Efecto de exopolisacáridos sulfatados de microalgas en adherencia de *H. pylori*, cepa 25, a células HeLa S3. (A) Determinación espectrofotométrica de la adhesión con bacterias marcadas con biotina; (B) Determinación espectrofluorométrica con bacterias marcadas con AMCA-NHS; control, adherencia bacteriana sin inhibidor.

### 3.2. Inhibición de la adhesión de células HeLa S3 y Kato III con Anticuerpos, Antígenos de *H. pylori* y Péptidos sintéticos.

Comparando el potencial anti-adhesivo de los polisacáridos sulfatados aislados de microalgas con los compuestos tradicionalmente empleados en terapias anti-adhesivas (anticuerpos policlonales y monoclonales, ligandos y receptores específicos involucrados en el proceso adhesivo y péptidos sintéticos); se continuó el estudio utilizando el procedimiento espectrofluorométrico para determinar la inhibición de la adhesión de *H. pylori* a células animales utilizando antígenos de *H. pylori* que le confieren la habilidad para adherirse al sulfato de heparina (Figura 6A), y anticuerpos policlonales generados en conejo contra estos mismos antígenos de *H. pylori* (Figura 6B).



**Figura 6.** Inhibición de la adherencia de *H. pylori*, cepa 25, a células HeLa S3 con Antígenos de *H. pylori* (A) y con Anticuerpos policlonales en conejo y ratón anti-*H. pylori* (B); control, adherencia bacteriana sin inhibidor.

Los resultados obtenidos nos indican que la adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3 es inhibida tanto por los antígenos de *H. pylori* involucrados en el proceso de adhesión de la bacteria al proteoglicano sulfatado de heparina, así como por los anticuerpos policlonales generados en conejo y ratón contra dichos antígenos del patógeno (Figura 6A y B). Sin embargo, podemos apreciar que el grado de inhibición de la adhesión bacteriana a células HeLa S3 es mayor al utilizar anticuerpos (Figura 6B) y dicho efecto inhibitorio es mayor al utilizar la fracción IgG en comparación con los antisueros totales (Figura 6B).

Por otro lado, si se compara el porcentaje de inhibición de la adherencia de *Helicobacter pylori* a células HeLa S3 utilizando exopolisacáridos sulfatados (Figura 5B) y anticuerpos policlonales anti-HSBP (Figura 6B) se podrán equiparar la efectividad anti-adhesiva de los polisacáridos sulfatados de microalgas.

De la misma manera, se utilizaron péptidos sintéticos homólogos a las secuencia de adhesión a heparina y fibronectina en la proteína de estrés Hsp70 de células eucariotes, así como anticuerpos monoclonales generados contra la Hsp70 (Figura 7). Los resultados obtenidos nos muestran que ni los péptidos sintéticos, ni los anticuerpos monoclonales, inhiben significativamente la adhesión de *H. pylori* a líneas celulares (Figura 7A y 7B).

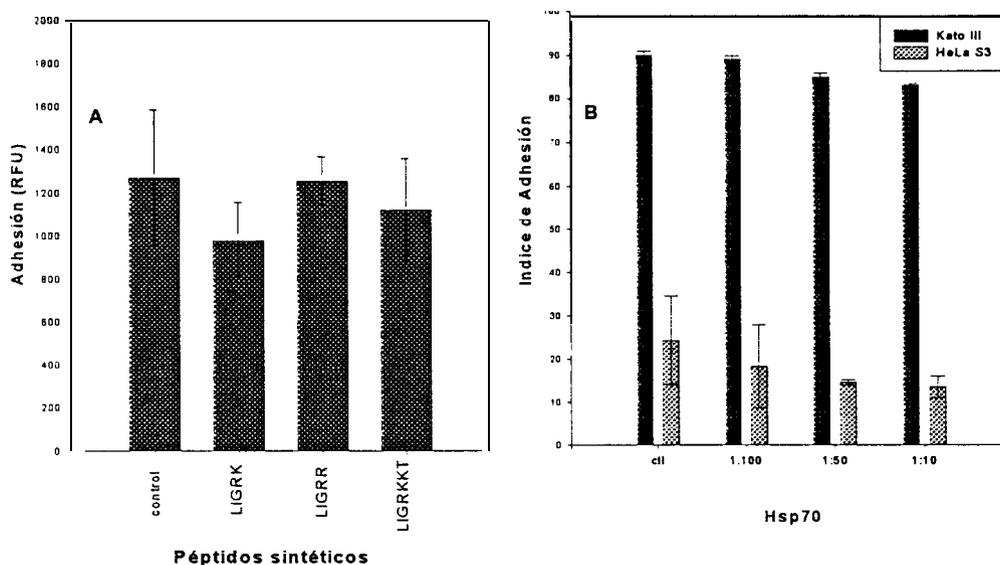


Figura 7. Inhibición de la adherencia de *H. pylori*, cepa 25, a líneas celulares de humano, utilizando péptidos sintéticos homólogos a las secuencias de unión a heparina en proteínas de estrés y péptidos sintéticos homólogos a las secuencias de unión a heparina en fibronectina (A) y anticuerpos monoclonales contra la proteína de estrés Hsp70 de células eucariotes (B); control (ctl) adherencia bacteriana sin inhibidor.

#### 4.- Utilización de polisacáridos sulfatados de microalgas para inhibir la adhesión de cepas de *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii* y *Aeromonas hydrophila* a células de branquias, intestino, sangre y tegumento de la cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*).

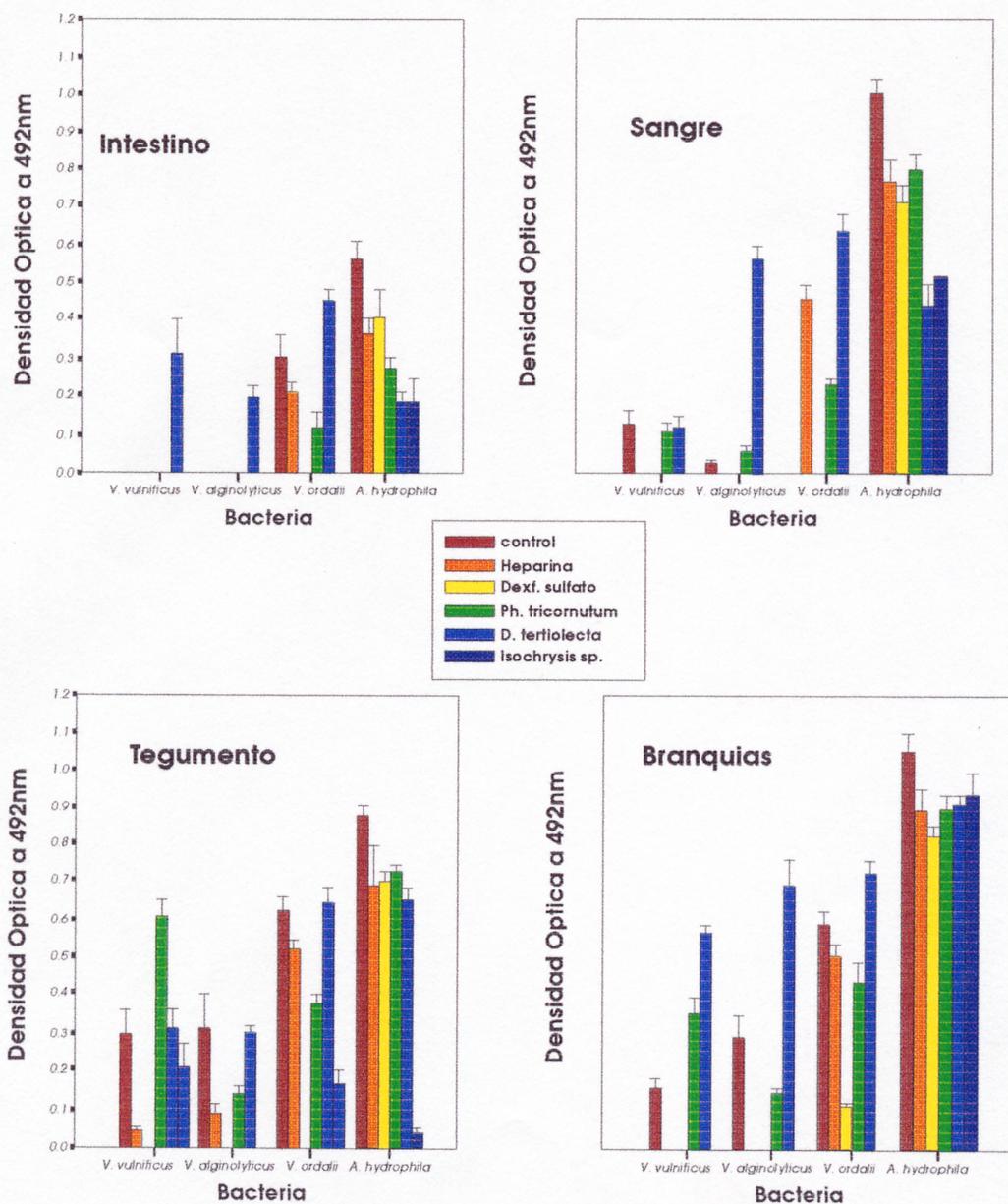
Dada la necesidad que existe en la industria acuícola por contar con alternativas profilácticas y terapéuticas para contrarrestar infecciones

microbianas en el cultivo de organismos marinos y de abatir el uso casi indiscriminado de antibióticos con la subsecuente generación de cepas bacterianas resistentes a antibióticos primarios, se planteó la posibilidad de que polisacáridos sulfatados de microalgas puedan ser empleados para tales propósitos. De esta manera se montó un modelo experimental para evaluar el posible efecto inhibitor de polisacáridos sulfatados en la adhesión de bacterias patógenas (*Vibrio vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. ordalii* y *Aeromonas hydrophila*) para la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), en un modelo experimental donde se emplearon células aisladas del intestino, tegumento, branquias y sangre de la cabrilla arenera. En la Figura 8 se puede apreciar de que este proceso de adhesión es posible inhibirlo con heparina de una manera similar al modelo de adhesión de *H. pylori* a líneas celulares.

Al evaluar el posible efecto inhibitor de polisacáridos sulfatados en la adhesión de cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* a las diferentes preparaciones celulares, encontramos resultados homólogos a lo que ocurre en el modelo experimental con *H. pylori* y su adhesión a líneas celulares de mamífero; esto es, que algunos polisacáridos sulfatados inhiben la adhesión bacteriana mientras que otros promueven un efecto inverso.

Un resumen comparativo de los efectos observados en la adhesión de cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* a células de intestino, sangre, tegumento y branquias de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) se encuentra enlistado en la Tabla 4.

Através de un análisis de varianza se determinó el grado de adhesión y de inhibición de la adherencia de *A. hydrophila* y las diferentes especies de *Vibrio* difiere significativamente ( $P < 0.05$ ) entre las diferentes especies de patógenos estudiados, así mismo, existe una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los tipos de células ensayadas.



**Figura 8.** Efecto de axopolisacáridos sulfatados de microalgas en la adherencia cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* a células de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*), control, adherencia bacteriana sin inhibidor.

**Tabla 4. Resumen comparativo del efecto de polisacáridos sulfatados de microalgas en la adhesión de cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* a células de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Infecta, capacidad del patógeno para adherirse a células de cabrilla arenerea. Elimina, capacidad del glicoconjugado para inhibir totalmente la adherencia del patógeno a células de cabrilla arenera. Inhibe, actividad del glicoconjugado para disminuir el grado de adherencia del patógenos a células de cabrilla arenera.**

Bacteria	Intestino	Sangre	Tegumento	Branquias
<i>Vibrio vulnificus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta solamente en presencia de <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta.</li> <li>· Eliminan Heparina Dextran sulfato <i>Isochrysis sp.</i></li> <li>· Inhiben <i>Ph tricornutum</i> y <i>D ertiolecta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Infecta</li> <li>· Elimina Dext. Sulfato</li> <li>· Inhibición mayor con Heparina</li> <li>· Promueven la adhesión <i>Ph. tricornutum</i> <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta</li> <li>· Elimina Heparina Dext Sulfato <i>Isochrysis sp.</i></li> <li>· Promueven la adhesión <i>Ph. tricornutum</i> <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>
<i>V. alginolyticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta solamente en presencia de <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta</li> <li>· Eliminan Heparina Dext Sulfato <i>Isochrysis sp</i></li> <li>· Promueven adhesión <i>Ph Tricornutum</i> <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· Infecta</li> <li>· Elimina Dext Sulfato <i>Isochrysis sp.</i></li> <li>· Inhibición mayor con Heparina <i>Ph. tricornutum</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta</li> <li>· Eliminan Heparina Dext. Sulfato <i>Isochrysis sp</i></li> <li>· Promueven la adhesión <i>Ph. tricornutum</i> <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>
<i>V. ordalii</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta</li> <li>· Inhibición con: Dextran sulfato, <i>Isochrysis sp.</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta solamente en presencia de Heparina, <i>Ph tricornutum</i> y <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta</li> <li>· Elimina Dext Sulfato</li> <li>· Inhibición mayor con <i>Isochrysis sp.</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta</li> <li>· Elimina <i>Isochrysis sp.</i></li> <li>· Inhiben Dext Sulfato Heparina <i>Ph tricornutum</i></li> <li>· Promueve la adhesión <i>D. tertiolecta</i></li> </ul>
<i>A. hydrophila</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Infecta.</li> <li>▶ Inhibición mayor con <i>D tertiolecta</i>, <i>Isochrysis sp.</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◀ Infecta</li> <li>◀ Inhibición mayor con <i>D tertiolecta</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ Infecta</li> <li>· Inhibición mayor con <i>Isochrysis sp</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecta</li> <li>· Inhibición mayor Dext Sulfato</li> </ul>

## VI.- DISCUSIÓN.

La obtención de polisacáridos sulfatados de algas ha facilitado el desarrollo de herramientas en la biotecnología moderna para la obtención de nuevos productos terapéuticos. Con el presente trabajo se contribuye al conocimiento básico respecto al efecto inhibitorio que ejercen los exopolisacáridos sulfatados de microalgas en la adhesión de bacterias patógenas a líneas celulares de humano y peces y pone de manifiesto el posible impacto biotecnológico que representaría el desarrollo de esquemas de producción de exopolisacáridos sulfatados de microalgas en la industria farmacéutica lo cual repercutiría en salud pública y en el desarrollo de la acuicultura en nuestro país.

Actualmente existen en el mercado polisacáridos sulfatados y una variedad de sustancias biológicamente activas que han sido aislados de macroalgas marinas, relativamente poco estudiadas encontrándose que tienen un gran potencial en biomedicina (Parish et al., 1987; Noda et al., 1989 a y b; Colliee et al., 1991). Sin embargo, se reconoce toda una problemática que acompaña a la producción comercial de reactivos biológicos obtenidos de macroalgas, en el caso particular de la producción de polisacáridos sulfatados nos enfrentamos en primer término a los procesos de extracción y purificación del polisacárido, puesto que en este tipo de organismos los polisacáridos sulfatados constituyen un componente intracelular (Kano et al., 1992; Itoh et al., 1993), lo que implica que el proceso de extracción (cosecha, lavados extensivos, secado, molienda y extracción del polisacárido), (Kano et al., 1992; Grauffel et al., 1993) eleva los costos de producción. Por otro lado tenemos que la producción de polisacáridos sulfatados, como cualquier otro metabolito secundario, es dependiente de las

condiciones de cultivo (Itoh et al., 1993; Herrero et al., 1994), por lo que el hecho de obtener macroalgas marinas de los bancos naturales donde se reproducen, implica que el contenido intracelular, la calidad y la cantidad de los polisacáridos puede variar dependiendo de las condiciones ambientales prevalecientes en las épocas de cosecha, además es necesario contar con una flota apropiada existiendo el riesgo de llegar a sobreexplotar el recurso con el consecuente impacto ecológico.

Considerando lo anterior, una alternativa a la utilización de macroalgas para la producción de polisacáridos sulfatados y el manejo racional de recursos naturales es el uso de microalgas. Esto permitiría realizar cultivos de producción bajo condiciones controladas que permitiría la modulación y optimización de la producción de los metabolitos, específicamente la producción de polisacáridos. Una ventaja adicional que brindaría este esquema es el hecho de que los polisacáridos son productos extracelulares de las microalgas (Ramus, 1972), propiedad que les confiere un atractivo e importancia biotecnológica pues los costos de producción pueden ser mucho menores a los esquemas de producción donde las macroalgas son la materia prima; de aquí el interés de querer profundizar con el presente estudio en esta línea de investigación con el fin de llegar a una aplicación biotecnológica de los exopolisacáridos sulfatados de microalgas, para lo que tendríamos que considerar como primera instancia, la realización de estudios sobre la optimización de las condiciones de cultivo de las microalgas así como definir las condiciones óptimas para la obtención de una mayor secreción del polisacárido sulfatado, para llegar a establecer un equilibrio entre el crecimiento, multiplicación celular y secreción del polisacárido sulfatado. En este sentido, se tendrían que ponderar los costos de producción de polisacáridos sulfatados de microalgas en relación a los costos cuando los polisacáridos son extraídos de

macroalgas. De cualquier forma, resulta atractiva la posibilidad de considerar el uso de microalgas como una alternativa para el uso y manejo racional de recursos naturales de macroalgas.

Algunas de las consideraciones teóricas que nos llevaron a formular la hipótesis de que los polisacáridos sulfatados de microalgas podrían tener un efecto inhibitor en la adhesión de bacterias patógenas a células animales, fueron el hecho de que en estas células encontramos que existe una amplia variedad de glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos sobre superficie celular. Estos glicoconjugados están mediando muchos de los procesos fundamentales de reconocimiento celular, incluyendo la adhesión célula-célula, célula-ECM, movilidad, crecimiento y señales de reconocimiento celular (Esko, 1991; Varki, 1993). Sin embargo, muchos microorganismos patógenos han aprendido a explotar dichos glicoconjugados de la superficie celular como receptores para adherirse (Tabla 4), procesos que les facilita la colonización e invasión de un tejido (Rostand y Esko, 1997). La interacción de proteínas específicas en la superficie de microorganismos (adhesinas) con las cadenas glicosídicas en los glicoconjugados (receptores) le permiten al patógeno dar el primer paso para el establecimiento de una infección (Rostand y Esko, 1997).

**Tabla 5.** Microorganismos con afinidad por receptores proteoglicanos en células eucariotes. (Rostand y Esko. 1997)

Microorganismo	Tejido afectado	Tipo de ensayo <i>in vitro</i>
<b>Bacterias Gram-negativas</b>		
<i>Bordetella pertussis</i>	Epitelio ciliado en tracto respiratorio	. Adhesión de HS expuesto en células HeLa, células CHO
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Tejido linfoide, ojos y tracto genital	. Adhesión de HS expuesto en células HeLa, células CHO, fibroblastos de ratón L929 . Adhesión a HS marcado con I <sup>125</sup>
<i>Helicobacter pylori</i>	Mucosa gástrica	. Adhesión a HS marcado con I <sup>125</sup>
<i>Haemophilus influenzae</i>	Epitelio respiratorio	. Adhesión de HS expuesto en células Hep-2, fibroblastos de ratón, fibroblastos humanos y células CHO
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Tracto genital	. Adhesión de HS expuesto en células Chang, células CHO
<b>Bacterias Gram-positivas</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tejido conectivo y células endoteliales	• Adhesión a HS marcado con I <sup>125</sup>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Tejido cardíaco y renal	. Adhesión a HS marcado con I <sup>125</sup> . Adhesión de heparina-agarosa expuesto en • cortes de tejido cardíaco y renal
<i>Streptococcus mutans</i>	Tejido cardíaco y renal	• Adhesión a heparina-agarosa • expuesto en cortes de tejido cardíaco y renal
<i>Streptococcus gordonii</i>	Tejido cardíaco	. Adhesión de HS expuesto en células endoteliales de la vena umbilical de humanos
<b>Parásitos</b>		
<i>Plasmodium falciparum</i> (CSs)	Hepatocitos y placenta	• Adhesión de HS expuesto en células HepG-2, hepatocitos de ratón, placenta humana, capilares de cerebro y plástico recubierto
<i>Leishmania amazonensis</i> (amastigotes)	Macrófagos, fibroblastos y epitelio	• Adhesión de HS expuesto en células CHO, macrófagos peritoneales de ratón y fibroblastos de ratón
<i>Leishmania donovani</i> (promastigotes)	Macrófagos, fibroblastos y epitelio	. Adhesión de HS expuesto macrófagos de ratón
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Corazón, sistema nervioso y matriz extracelular	. Adhesión de HS expuesto células Vero y células CHO
<b>Virus</b>		
HIV-1	Linfocitos T	. Adhesión de HS a líneas de células T. MT-4
CMV	Neutrófilos y monocitos	. Adhesión de HS expuesto Fibroblastos humanos, fibroblastos de pulmón humano

En virtud de la participación de los carbohidratos **en los procesos de reconocimiento celular de la interacción entre patógeno-huésped (Bergey y Stinson, 1988; Bellamy et al., 1993)**, resulta atractiva la posibilidad de utilizar drogas a base de carbohidratos para inhibir los procesos infecciosos (Rostand y Esko, 1997).

En el modelo experimental de adhesión **de *H. pylori* a líneas celulares de humanos, así como en el modelo experimental de adhesión** de cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* a células de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*), **se puso de manifiesto** que polisacaridos sulfatados bloquean efectivamente dicho proceso de adhesión bacteriana (Figuras 5 y 8). Dichos resultados de inhibición se tornan aun más interesantes cuando son comparados con aquellos resultados de inhibición de la adhesión bacteriana generados por la aplicación del tipo de compuestos tradicionalmente empleados para tales fines (ligandos-receptores, anticuerpos, péptidos sintéticos, Figuras 6 y 7), pues su producción implica el conocer primeramente cuales son los antígenos expuestos en la superficie celular del patógeno involucrados en el proceso de adhesión bacteriana, aislarlos, purificarlos, secuenciarlos y producir anticuerpos contra **ellos**.

En el modelo experimental de adhesión de *H. pylori* a líneas celulares de humanos (HeLa S3 y Kato III), conocíamos de antemano que la bacteria expresa en su superficie celular adhesinas que reconocen específicamente el proteoglicano sulfato de heparina, mismo que se encuentra expuesto en la superficie celular de la membrana epitelial de la mucosa gástrica; así mismo, se conocía que la adhesión de dicha bacteria al sulfato de heparina puede ser bloqueado por oligosacáridos de sulfato de heparina (Ascencio et al., 1993), de aquí que era atractiva la posibilidad de aplicar polisacáridos sulfatados de

microalgas para inhibir la adhesión de *H. pylori* a líneas celulares de humano. Sin embargo, en el modelo experimental de adhesión de cepas de *Vibrio alginolyticus*, *V. ordanii*, *V. vulnificus* y *Aeromonas hydrophila* a células de cabrilla arenera no se contaba con información alguna al respecto, excepto que dichos vibriones fueron aislados de las úlceras epiteliales en el tegumento de cabrillas enfermas, sujetas a condiciones de cultivo. Con estos dos ejemplos se pone de manifiesto que los exopolisacáridos sulfatados de microalgas pueden llegar a ser una herramienta terapéutica para controlar infecciones microbianas, aun en aquellos casos donde no se tenga conocimiento sobre cuales son los componentes celulares involucrados en el proceso de adhesión microbiana.

Es indudable que generalmente tendemos a relacionar el termino “control de infecciones microbianas” con vacunas, esto es, la aplicación de antígenos que desencadenen en el huésped una respuesta inmunológica con la subsecuente producción de anticuerpos específicos contra el patógeno o bien, le sean suministrados “anticuerpos prefabricados” a fin de controlar y neutralizar un proceso infeccioso. Sin embargo, es importante señalar que en muchos microorganismos, los componentes celulares de adhesión o adhesinas se encuentran en espacios muy estrechos, retraídos, lo que los hace inaccesibles disminuyendo la posibilidad de que puedan ser alcanzados por anticuerpos; lo que explica por que ciertos virus, bacterias y parásitos escapan al sistema inmune del huésped, por lo que en estos casos la aplicación de vacunas contra dichos patógenos resultan ineficientes; en cambio, la aplicación de carbohidratos solubles que impidan la adhesión del agente patógeno puede ser una alternativa terapéutica más apropiada (Karlsson 1991).

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, así como por estudios en proceso en nuestro laboratorio, relacionados a la aplicación de vacunas en ratones para la prevención y control de infecciones producidas por *H. pylori* en ratones experimentalmente infectados con *H. pylori* (Ruiz-Bustos et al., en proceso) y de infecciones producidas experimentalmente por vibriones en cabrilla arenera (Merino-Contreras et al., en proceso) se podría decir que el uso de exopolisacáridos sulfatados representan una alternativa terapéutica en el control de procesos infecciosos activos, en tanto que la aplicación de vacunas sería la alternativa profiláctica apropiada para la prevención de procesos infecciosos.

Los resultados referentes al efecto de los exopolisacáridos sulfatados de microalgas en los dos modelos experimentales, nos indican que los exopolisacáridos sulfatados de algunas especies de microalgas marinas bloquean el proceso de adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3 (*Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, y *Neochloris oleabundans*, Figura 5), y la adhesión de cepas de *V. alginolyticus*, *V. ordalii*, *V. vulnificus*, y *A. hydrophila* a células de intestino, sangre, tegumento y branquias de cabrilla arenera (*P. tricornutum*, Figuras 8). Una explicación al efecto inhibitorio podría ser que existe cierta especificidad en cuanto a la naturaleza del residuo carbohidrato del exopolisacárido sulfatado, así como la carga neta y la conformación estereoquímica de las moléculas para incrementar la interacción entre ligando-receptor de una manera homóloga a como se ha reportado que ocurre en el proceso de adhesión-invasión de células endoteliales por merozoitos de *Plasmodium falciparum* (Xiao et al. 1996).

Cabría señalar que en los experimentos de adhesión de *vibrios* y *Aeromonas* se seleccionaron los exopolisacáridos sulfatados de *Phaeodactylum tricornutum*, *Dunaliella tertiolecta* e *Isochrysis sp.* en virtud de que dichos exopolisacáridos ejercieron un efecto altamente inhibitorio (*Ph. tricornutum*), medianamente inhibitorio (*D. tertiolecta*) y un efecto inverso, o sea la adhesión se vió incrementada (*Isochrysis sp.*) en el modelo I de adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3

Por otro lado, el hecho de que la adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3 se halla incrementado en presencia de los exopolisacáridos sulfatados aislados de *Chlorococcum oleofaciens*, *Isochrysis sp.* y *Tetraselmis suecica*, se debe a un efecto antagónico de cargas así como a la estereoquímica en la interacción ligando-receptor. Un efecto similar es lo que ocurre con la adhesión de cepas de *Vibrio alginolyticus*, *V. ordanii*, y *V. vulnificus* a células de intestino y branquias de cabrilla arenera en presencia de exopolisacáridos sulfatados aislados de *D. tertiolecta* (Figura 8).

Cabe resaltar que debido a que los exopolisacáridos sulfatados aislados de diferentes especies de microalgas pueden ejercer efectos diferentes en la adhesión de bacterias patógenas a células de animales, resultaría imprescindible que al pensar en la aplicación de estos compuesto como agentes terapéuticos en el control de infecciones microbianas se contemple, en primera instancia la identificación del(los) agente(s) bacterianos involucrados en la infección, lo cual nos permita seleccionar el exopolisacárido sulfatado que nos asegure un efecto anti-adhesivo. Dado que en el control de infecciones bacterianas tanto en humanos como en veterinaria y acuicultura, comúnmente se han venido empleando una serie de tratamientos mixtos a base de

antibióticos y compuestos antiparasitarios de amplio espectro para tratar de erradicar a los agentes patógenos que se encuentran adheridos a las mucosas, terapias que en la mayoría de los casos resultan altamente agresivas al huésped; además de que se llega a propiciar la generación de cepas resistentes y la subsecuente necesidad del uso posterior de esquemas de tratamientos a base de antibióticos de segunda generación (Sjöström et al., 1996; Sjöström y Larsson, 1996), los cuales pueden implicar riesgos para el paciente debido a la posibilidad de reacciones secundarias.

Así pues, el uso potencial de los exopolisacáridos sulfatados nos ofrece una alternativa importante en terapias anti-adhesivas, en procesos infecciosos como lo que ocurre con *H. pylori*. Dado que en nuestro modelo experimental los exopolisacáridos sulfatados de microalgas bloquean el proceso de adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3, se podría esperar que en un modelo *in vivo* la aplicación de estos compuestos sulfatados ocasionaran la inhibición de la adhesión y establecimiento del patógeno en el huésped o la eliminación del patógeno del organismo infectado. Una terapia a base de exopolisacáridos sulfatados aislados de *Tetraselmis* sp., *Phaeodactylum tricornutum*, y *Neochloris oleabundans* (Figura 5) bloquearían la adhesión de *H. pylori* al sulfato de heparina expuesto en la mucosa epitelial gástrica que actúa como reservorio de dicho agente patógeno (Figura 2). Así mismo, el tratamiento con exopolisacáridos sulfatados podría ser también utilizado para bloquear el proceso inicial de colonización del huésped por *H. pylori*, como compuestos profilácticos en infecciones microbianas donde el proceso de citoadhesión patógeno-huésped está mediado por glicoconjugados sulfatados.

**Por otro lado tenemos** que tradicionalmente se han empleado heparina, sulfato de heparina y dextran sulfato para el control de procesos inflamatorios debido a que estos compuestos intervienen en la adhesión, activación y en el tránsito de leucocitos (Tyrell et al., 1995); de igual manera se les ha empleado como agentes anti-virales en el caso de HSV (tipo I) y el virus HIV (Ito et al., 1987; Neytes et al., 1992; Clayette et al., 1996); más sin embargo se ha observado que el uso prolongado de estos compuestos trae consigo una serie de problemas secundarios como es la trombositopenia e inhibición del sistema de complemento, lo cual no garantiza de forma exitosa su uso (Flexner et al., 1991). de aquí que la utilización de exopolisacáridos sulfatados de microlagas sea una alternativa biológicamente potencial para el reemplazo de dichos proteoglicanos.

Actualmente la industria acuícola ha enfrentado la problemática que representa la propagación de enfermedades infecciosas en condiciones de cultivos intensivos donde se manejan altas densidades de organismos en espacios limitados, lo que demanda el desarrollo de alternativas profilácticas y terapéuticas para el tratamiento de organismos marinos en cultivo, dado que el uso no controlado de antibióticos en acuicultura y la poca efectividad para erradicar y manejar los brotes infecciosos en un sistema de cultivo se refleja en altos costos de producción. Así pues, el uso de exopolisacáridos sulfatados sugiere que además de eliminar la utilización desmesurada de antibióticos con el subsecuente problema de cepas resistentes, se estimularía el sistema inmune celular de las especies en cultivo por el efecto probiótico que poseen los exopolisacáridos sulfatados (Itoh et al. 1993). En este mismo sentido, se considera que el uso de exopolisacáridos sulfatados como agentes probióticos potenciales en la industria acuícola, mediante la implementación de cultivos mixtos, representarían además de condiciones para prevenir y mejorar los

---

mecanismos de control en los procesos infecciosos, una fuente adicional de nutrientes, pues se implementarían esquemas de suministro de microalgas al cultivo marino para la liberación de los exopolisacáridos al medio como nutrientes; hecho que además no requeriría de formulación de alimentos para el suministro de las microalgas como agente probiótico.

Por otra parte, cabe señalar que la utilización de exopolisacáridos sulfatados como posible herramienta en terapias anti-adhesivas contra infecciones microbianas ofrece ventajas adicionales a las de los esquemas de vacunación en la industria acuícola, pues la aplicación de vacunas esta limitada al cultivo de peces, en tanto que para la industria acuícola es de primordial importancia el desarrollo de alternativas terapéuticas para el control de infecciones microbianas en crustáceos, moluscos y algunos otros grupos de invertebrados marinos de importancia comercial que no poseen memoria inmunológica.

Es importante también señalar que el modelo experimental empleado para el estudio del efecto de los exopolisacáridos sulfatados de microalgas en la adhesión de *Vibrios* y *Aeromonas* a células de cabrilla arenera (*P. maculatofasciatus*), es un modelo *in vitro* que nos permitió realizar en el laboratorio pruebas biológicas que de haberse llevado acabo *in vivo* hubieran implicado un alto costo debido al elevado número de organismos y a la complejidad de las instalaciones requeridas para su realización. Así pues, los estudios preliminares *in vitro* nos permitieron seleccionar o definir tratamientos y condiciones experimentales con organismos marinos.

## VII. CONCLUSIONES.

- Los exopolisacáridos sulfatados de diferentes especies de microalgas inhiben la adhesión bacteriana a células animales.
- El potencial inhibitorio de los exopolisacáridos sulfatados es mucho mayor al de proteoglicanos (sulfato de heparina) y dextran sulfato.
- Las distintas especies de microalgas utilizadas en este estudio produjeron exopolisacáridos con distinto poder inhibitorio o amplificador de la adhesión de bacterias a las superficies celulares empleadas.
- Al parecer las distintas cepas de *Vibrio* y *Aeromonas* probadas reconocen proteoglicanos sulfatados en células de peces de una manera homóloga a como *H. pylori* reconoce sulfato de heparina de células de humano.
- Por la actividad inhibitoria de ciertos exopolisacáridos sulfatados de microalgas sobre la adhesión de bacterias a células de humano, estos exopolisacáridos sulfatados podrían ser evaluados en un modelo *in vivo* como terapias profilácticas contra infecciones bacterianas.

## VIII. PERSPECTIVAS.

- ≡≡ Explotación biotecnológica de microalgas para la obtención de reactivos biológicos de alto valor agregado.
- ≡≡ Contar con una alternativa para el aprovechamiento racional de la explotación de macroalgas.
- ≡≡ Potencial farmacológico de microalgas en el diseño de drogas a base de exopolisacáridos sulfatados.
- Alternativa terapéutica y profiláctica en el cultivo de organismos marinos para disminuir el uso de antibióticos y evitar la generación de cepas resistentes.
- ≡≡ Las microalgas ofrecen una amplia distribución de exopolisacáridos sulfatados que servirían como herramienta molecular para el estudio de procesos de reconocimiento e interacción entre célula-células y célula-patógeno.

## IX. BIBLIOGRAFIA.

- Aaronson, S., Berner, T. and Dubínsky, Z. 1980. En: The production and use of microalgal biomass. G. Shelef, C.J. Soeder and M. Balaban (eds.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Abdel-Fattah, A. F.; Hussein, M. M. D. and Salem, H. M. 1974. Studies of the purification and some properties of sargassam a sulphated heteropolysaccharide from *Sargassum linifilium*. Carbohydr. Res. 33: 9-17.
- Abeyta, C. Jr.; Kaysner, C. A.; Wekell, M. M. and Stott, R. F. 1990. Incidence of motile *Aeromonas* from the United States west coast shellfish growing estuaries. J. Food. Prot. 53: 849-855.
- Ahern, T. J.; Kato, S. and Sada, E. 1983. Prostaglandin synthesis from arachidonic acid by immobilized ram seminal microsomes. Biotechnology and Bioengineering 25: 881-883.
- Ahern, T. J.; Kato, S. and Sada, E. 1993b. Arachidonic acid production by the red algae *Porphyridium cruentum*. Biotechnology and Bioengineering 25: 1057 - 1070.
- Altwegg, M.; Lucchini, G. M.; Luthy-Hottenstein, J. and Rohrbach, M. 1991. *Aeromonas*-associated gastroenteritis after consumption of contaminated shrimp. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 10:44-45.
- Amini, H. R.; Ascencio, F.; Cruz-Villacorta, A.; Ruiz-Bustos, E. and Wadström, T. 1996. Immunochemical properties of a 60 kDa cell surface-associated heat shock-protein (Hsp60) from *Helicobacter pylori*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 16:163-172.
- Anususya-Devi, M.; Venkataraman, L. V. and Rajasekaran, T. 1979. Hypocholesterolemic effect of diets containing algae on albino rats. Nutr. Rep. Int. 20: 83 - 90.
- Araujo, R. M.; Arribas, R. M. and Peres, R. 1991. Distribution of *Aeromonas* species in water with different levels of pollution. J. Appl. Bacteriol. 71:182-186.
- Arredondo-Vega, B. O. and Vázquez-Duhalt, R. 1991. Aplicaciones biotecnológicas del cultivo de microalgas. Ciencia y Desarrollo XVII: 99-I II.
- Ascencio, F.; Fransson, L-A; Wadström, T. 1993. Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. J. Med. Microbiol. 38: 240-244.
- Ascencio, F.; Hansson, H-A, Larm, O.; Wadström, T. 1995. *Helicobacter pylori* interacts with heparin and heparin-dependent growth factor. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 12: 265-272.
- Austin, B. and Alle-Austin, D. 1985. Bacteria pathogens of fish. J. Appl. Bacteriol. 58: 483-506.
- Baba, M.; Schols, D.; Pauwels, R.; Nakashima, H. and De Clercq, E. 1990. Sulfated polysaccharides as potent inhibitors of HIV-induced syncytium formation: a new strategy towards AIDS chemotherapy. J. AIDS. 3: 493-499.
- Bahr, T. G.; King, D. L.; Johnson, H. E. and Kerns, C. L. 1977. Municipal wastewater recycling: production of algae and macrophytes for animal food and other uses. Dev. Ind. Microbiol. 18: 121-134.
- Barr, T. N. 1981. The world food situation and global grain prospects. Science. 214: 1087
- Bauman, P. and Schubert, H. W. 1984. Family II. *Vibrionaceae* Veron 1965, 5245<sup>Al</sup>. En: pp.516-540. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins (eds.).

- Beck, K.;** Hunter, I. and Engel, J. 1990. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB. J.* 4: 148-160.
- Belitsos, P. C.;** Greenson, J. K.; Yardley, J. K.; Sisler, J. R. and Bartlett, J. G. 1992. Association of gastric hypoacidity with opportunistic enteric infections in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 166: 277-84.
- Bellamy, F. D.;** Horton, J.; Mullet, F.; Picart, S. Samreth and Chana, B. 1993. Glycosylated derivatives of benzophenone, benzhydrol, and benzhydrol as potential venous antithrombotic agents. *J. Med. Chem.* 36: 898-903.
- Ben-Amotz, A.; Ausman, I. and Svrton, M. 1982. Glycerol production by *Dunaliella*. *Experientia.* 38: 49.
- Bergey, E. and Stinson, M. 1988. Heparin-inhibitable basement membrane-binding protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 56: 1715-1721.
- Blondin, C.;** Fischer, E.; Boisson-Vidal, C.; Kazatchkine, M.D. and Jozefonvicz, J. 1994. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucans) from brown sea weed. *Mol. Immunol.* 31: 247-253.
- Bold, H. C.** and Wynne, M. J. 1985. Introduction to the algae. Prentice Hall, Englewood, U. K. pp. 376.
- Boutanger, Y.; Lallier, R. and Cousineau, G. 1977. Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. *Can. J. Microbiol.* 23:1161.
- Brenan, M. and Parish, C. R. 1986. Modification of lymphocyte migration by sulfated polysaccharides. *Eur. J. Immunol.* 16: 423-430.
- Burke, F.; Robinson, J.; Gracey, M.; Peterson, D. and Partridge, K. 1984. Isolation of *Aeromonas* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 361-366.
- Burlew, J. D. 1953. Algal culture from laboratory to pilot plant. Carnegie Inst., Washington, D. C. Public. No 600, pp 357.
- Canell, R. J. P.;** Kellam, S. J.; Owsianka, A. M. and Walker, J. M. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Medica* 10: 14.
- Cassaro, C. M. F.** and Dietrich, C. P. 1977. Distribution of sulphated mucopolysaccharides in invertebrates. *J. Biol. Chem.* 252: 2254-2261.
- Castillo, S.;** Merino, M. F. and Heussler, P. 1980. Production and ecological applications of algae mass culture under Peruvian conditions. In *Algae Biomass: Production and use* G., Shelef and C. J. Soeder (eds.), Elsevier: North Holland, Amsterdam. 123.
- Claustre, H.** and Ciestan, J. 1987. Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae: possible ecological implications. *Marine Ecology*, 40: 167-74.
- Clayette, P.;** Moczar, E.; Mabondzo, A.; Martin, M. ; Toutain, B.; Marcé, D. and Dormont, D. 1996. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by heparin derivatives. *AIDS. Res, Hum. Retroviruses* 12: 63-69.
- Cohen, Z.;** Vonshak, A. and Richmond, A. 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: Correlation to growth rate. *Journal Phycology* 24: 328-332.
- Colliee, S.;** Fischer, A. M.; Tapon-Brethaudiere, J.; Boisson, C.; Durand, P. and Jozefonvicz, J. 1991. Anticoagulant properties of a fucoidan fraction. *Tromb. Res.* 64: 143-154.

- Collinson, S. K.; Doig, P. C.; Doran, J. L.; Clouthier, S.; Trust, T. J. and Kay, W. W. 1993. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella enteritidis* to fibronectin. *J. Bacteriol.* 175: 12-18.
- Combe, D. R.; Parish, C. R.; Ramshaw, I. A. and Snowden, J. M. 1987. Analysis of the inhibition of tumor metastasis by sulphated polysaccharides. *Int. J. Cancer.* 39: 82-88.
- Coudron, P. E. and Kirby, D. F. 1989. Comparison of rapid urease tests, staining techniques and growth on different solid media for detection of *Campylobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1527-1530
- Crabtree, J. E; Peichl, P.; Wyatt, J. I.; Stachl, U. and Lindley I. J. D. 1993. Gastric interleukin-8 and IgA, IL-8 autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection. *Scand. J. Immunol.* 37: 65-70.
- Crooker, A. R.; Myres, M. C. and Kraft, W. G. 1990. Morphological and structural diversity of *Helicobacter pylori*. *Electron Microsc. Soc. Am. Bull.* 20: 81-83
- De la Noüe, J. and de Paw, N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances* 6: 725-750.
- Doig, P.; Todd, T.; Sastry, P. A.; Lee, K. K.; Hodges, R. S.; Paranchych, W. and Irvin, R. T. 1988. Role of pili in the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 56: 1641-1646.
- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Halmíton, J. D.; Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Duhois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. D.; Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Dunn, B. E.; Altmann, M. and Campbell, G. P. 1991. Adherence of *Helicobacter pylori* to gastric carcinoma cells: analysis by flow cytometry. *Rev. Infect. Dis.* 13: 557-564.
- Dytoc, M.; Gold, B. and Louie, M. 1993. Comparison of *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 61: 448 - 456
- Emödy, L.; Carlsson, A.; Ljungh Å. and Wadström, T. 1988. Mannose-resistant haemagglutination by *Campylobacter pylori*. *Scand. J. Infect. Dis.* 20: 353-354.
- Engel, J. 1992. Laminins and other range proteins. *Biochemistry* 31: 10643-10651.
- Esko, J. D. 1991. Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3: 805-816.
- Evans, D. G.; Evans, D. J.; Moulds, J.J. and Graham, D. Y. 1988. N-acetylneuraminyllactose-binding fibrillar haemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infect. Immun.* 56: 2896-2906.
- Evans, D. G.; Evans, Jr. D. J. and Graham, D. Y. 1989. Receptor-mediated adherence of *Campylobacter pylori* to mouse Y-1 adrenal cell monolayers. *Infect. Immun.* 57: 2272-2278.
- Fáhrega, J.; Muñoz, A.; Otero, A.; Barja, J. L. and Romaris, N. 1991. A preliminary study on bacterial activities of some bacteria isolated from marine environment. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1377-1382.
- Fábregas, J.; Herrero, C.; Gamallo, Y.; Otero, A.; Paz, J. M. and Vecino, E. 1994. Decrease of plasma cholesterol with the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* in hypercholesterolemic rats. *J. Gen. Microbiol.* 40: 553-540.

- Fauchere, J.-L. and Blaser, M. J. 1990. Adherence of *Helicobacter pylori* cells and their surface components to HeLa cell membranes. *Microb. Pathogen.* 9: 427-439.
- Fenical, W. and Jensen, P. R. 1993. Marine microorganisms: A new biomedical resource. En: D. H. Allaway and O. R. Zahorsky. (eds.). *Marine biotechnology*. Vol. 1. Pharmaceutical and bioactive natural products. Plenum Publishing Corporation. New York. pp 419-457.
- Finlay, B. B. and Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 53: 210-230
- Flexner, C.; Barditch-Crovo, P.; Kornhauser, H. F.; Nerhood, L.; Chaisso, R. E.; Bell, K.; Lorentsen, K. J.; Hendrix, C. W.; Petty, B. and Lietman, P. S. 1991. Pharmacokinetics, toxicity and activity of intravenous dextran sulfate in human immunodeficiency virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 35: 2544-2550.
- Forman, D.; Newell, D. G.; Fullerton, F. et al. 1991. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ*. 302: 302-305
- Fröman, G.; Witalski, L. M.; Faris, A.; Wadström, T. and Höök, M. 1984. Binding of *Escherichia coli* to fibronectin. *J. Biol. Chem.* 23: 14899-14905.
- Frrerst, J.; Sambhi, S. K.; Paynter, J. L.; Hawkins, J. A. and Atherlon, J. G. 1991. Isolation of a bacterium resembling *Pirellula* species from primary tissue culture of the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*). *App. Environment. Microbiol.* 57: 3127 - 3134.
- Fuhrman, J. A. and Azam, F. 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66: 109-120
- Furusawa, E. and Furusawa, S. 1985. Anticancer activity of a natural product, Vita-Natural, extracted from *Undaria pinnatifida* on interperitonally implanted Lewis lung carcinoma. *Oncology*. 42: 364-369
- Goodwin, C. S., Armströng, J. A. and Marshall, B. J. 1986. *Campylobacter pyloridis* and peptic ulceration. *J. Clin Pathol.* 39: 353-365.
- Goodwin, C. S., Armströng, J. A. and Peters, M. 1989a. Microbiology of *Campylobacter pylori*. En: M. J. Blaser (ed). *Campylobacter pylori* in gastritis and peptic ulcer disease. New York Igaku Shoin, 25-49.
- Goodwin, C. S.; Armströng, J. A.; Chilvers, T.; Peters, M.; Colins, M. D.; Sly, L.; McConnell, W. and Harper, W. E. S. 1989b. Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst Bacteriol.* 39: 397-405.
- Goodwin, C. S. and Worsley, B. W. 1993. Microbiology of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol. Clin. N Am* 22: 5- 19
- Grauffel, V., Kloareg, B.; Mabeu, S.; Durand, P. and Jozefonviez, J. 1989. New natural polysaccharide with potent antithrombotic activity: fucans from brown algae. *Biomaterials*. 10: 363-368
- Grobbelaar, J. U. 1981. Deterministic model for describing algal growth in large outdoor mass algal cultures in wastewater for aquaculture. Grobbelaar, J. U.; C. J., Soeder and D. F., Torrin (eds.) University of the Orange Free State. Bloemfontein Republic of South Africa pp 453

- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Huse and *Detonula copervacea* Gleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239.
- Harlow E, Lane D. Antibodies. 1988. A laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory. New York. pp.319-358.
- Hazan, T. C.; Fliermans. C. B.; Hirsch, R. P. and Esch, G. W. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. Appl. Environ. Microbiol. 36:731-738.
- Hazell, S. L.; Lee, A.; Brady, L. and Hennessy, W. 1986. *Campylobacter pyloridis* and gastritis association with intercellular spaces and adaptation an environment of mucus as important factors colonization of the gastric epithelium. J. Infect. Dis., 153: 658-663
- Hedenskog, G. 1978. Properties and composition of single-cell protein, influence and processing. Pro. 1 lth FEBS-Meeting Copenhagen 1977. Pergamon Press, Oxford. 44A3: 73-88.
- Hemalatha, S.; Drumm, B. and Sherman, P. 1991. Adherence of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelial cells in vitro. J. Med. Microbiol. 35: 197-202.
- Herrero, C.; Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, P. and Fábregas, J. 1994. Variations in the biochemical profile of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) cultured with different nutrient concentrations and urea as a nitrogen source. Biol. Mar. 35: 213-223.
- Hessey, S. J.; Pencer, J. and Wyatt, J. L. 1990. Bacteria1 adhesion and disease activity in *Helicobacter* associated chronic gastritis. Gut. 31: 134-138.
- Heussler, P. 1978. Improvements in pond construction and CO<sub>2</sub> supply for the mass production of microalgae, In: C. J. Soeder and R.. Binsack. (eds.) Microalgae for food and feed. Ergebn. Limnol. II : 254-259.
- Hirno, S.; Uff, M.; Ringer, M.; Wadström, T. 1995. Inhibition of heparan sulphate and other glycosaminoglycan binding to *Helicobacter pylori* by various polysulphated carbohydrates, FEMS Immunol Med. Microbioj. 10: 301-306.
- Hjeltnes, B. and Roberts, R. J. 1994. *Vibriosis*. En: Bacteria1 diseases of fish. V., Inglis; R. J., Roberts; N. R., Bronnage. (eds.). Blackwell Science Ltd. Great Britain. pp107-121.
- Ho. B. and Jiang, B. 1994. The adhesion of *Helicobacter pylori* extract to four mammalian cell lines. Eur. J. Gastroenterol. And Hepatol. 7: 121-124.
- Höök, M.; Kjellen, L.; Johansson, S. and Robinson. J. 1984. Cell surface glycosaminoglycans. Ann. Rev. Biochem. 53: 847-869.
- Höök, M.; Switalski, L. M.; Wadstrom, T. and Lindberg, M. 1988. Interactions of pathogenic microorganisms with fibronectin. En: Fibronectin. D. E., Mosher. (ed). Academic Press. New York. pp: 295-308.
- Huang, J.; Snyth, C. J.; Kennedy, N. P.; Arbuthnott, J. P. and Keeling, P. W. N. 1988. Haemagglutination activity of *Campylobacter pylori*. FEMS. Microbiol. Lett. 56: 109-112.
- Ito, M.; Baba, M.; Sato, A.; Pauwels, R.; De Clercq, E. and Shigeta. 1987. Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*. Antiviral Res. 7: 361-367.
- Itoh, H.; Noria, H.; Amarlo, H.; Zhuang, C.; Mizuno, T. and Ito, H. 1993. Antitumor activity and immunological properties of marine algae polysaccharide, especially fucoidan, prepared from *Sargassum thunbergii* of *phaeophyceas*. Anticancer Reseach. 13: 2045-2052.

- Jahn, W.; Steinbiss, J. and Zetsche, K. 1984. Light intensity adaptation of the phycobiliprotein content of the red algae *Porphyridium*. *Planta* 161: 536-539.
- Jorgensen, J. and Convit, J. 1953. Cultivation of complexes of algae with other freshwater and brackish waters. *Tatuara* 18: 19-35.
- Kanoh, H.; Kitamura, T. and Kobayashi, Y. 1992. A sulfated proteoglycan from the red algae *Gracilariaverrucosais* a hemagglutinin. *Comp. Biochem. Physiol.* 1028: 445449.
- Kaper, J. B.; Lockman, H. and Colwell, R. R. 1981. *Aeromonas hydrophila*: ecology and toxicogenicity of isolates from an estuary. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 359-377.
- Karlsson, K-A. 1991. Glycobiology: a growing field for drug design. *Trends Pharmacol Sci.* 12: 265-272.
- Kelly, M. T., Stroh E. M. D. 1988. Occurrence of *Vibrionaceae* in natural and cultivated oyster populations in the Pacific Northwest. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 9:1-5.
- Kirov, S. M.; Anderson, M. J. and McMeekin, T. A. 1990. A note on *Aeromonas* spp. from chicken as possible food-borne pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 327-334.
- Klein, P. D.; Graham, D. Y.; Gaillour, A.; Opekun, A. R. and Smith, E. O. 1991. Water source as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet.* 337: 1503-1506
- Kleinman, H. K.; McGarvey, M. L.; Lotta, L. A.; Robert, P. G.; Tryggvason, K. and Martin, G. R. 1982. Isolation and characterization of type IV collagen, laminin, and heparin sulfate proteoglycan. *Biochemistry.* 21: 6188-6193.
- Klemm, P. 1985. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* 7: 321-30.
- Kloareg, B. and Quatrano, R. S. 1988. Structure of the cell wall of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 26: 259-315.
- Koistinen, V. 1993. Effects of sulphated polyanions on functions of complement factor H. *Mol. Immunol.* 30: II 3-I 18.
- Korhonen, T. K.; Virkola, R.; Lahteenmaki, K.; Bjorkman, Y.; Kukkonen, M.; Raunio, T.; Tarkkanen, A. M. and Westerlund, B. 1992. Penetration of fimbriate enteric bacteria through basement membranes-A hypothesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 100: 307-312.
- Krakowka, S.; Morgan, D. R.; Kraft, W. G. and Leunk R. D. 1987. Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect. Immun.* 55: 2789-2796.
- Krogfelt, K. A. 1991. Bacterial adhesion-genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* 13: 721-735.
- Kukkonen, M.; Raunio, T.; Virkola, R.; Lahteenmaki, K.; Makela, P. H.; Klemm, P.; Clegg, S. and Korhonen, T. K. 1993. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion-binding of type-1 fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Mol. Microbiol.* 7: 229-237.
- Kushner, D. J. 1987. Microbial life in extreme environments. University of Ottawa, Canada. pp. 280-323.
- Larsen, B.; Haug, A. and Painter, T. J. 1966. Sulphated polysaccharides in brown algae I. Isolation and preliminary characterization of three sulphated polysaccharides from *Ascophyllum nodosum* (L). *Le. Jol. Act Chem Scand* 20: 219-230.

- Lee Y. K., Tan, H. M. & Low Ch. S. 1988. Osmotic adaptation in *Porphyridium cruentum* (*Rhodophyceae*): Changes in fatty acid composition. J. Phycol. 24: 231-237.
- Lee, A.; Fox, J. G., Otto, G. and Murphy, J. 1990. A small animal model of human *Helicobacter pylori* active chronic gastritis. Gastroenterology. 99: 1315-1323.
- Lee, E. T. Y. and Bazin, M. J. 1991. Environmental factors influencing photosynthetic efficiency of the micro red alga *Porphyridium cruentum* (Agardh) Nägeli in light-limited cultures. New Phytology II 8: 513-519.
- Lee, A.; Fox, J. and Hazell, S. 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. Infect. Immun. 61: 1601-1610.
- Líu. T.; Gibbons. R. J.; Hay, D. I. and Skobe, Z. 1991. Binding of *Actinomyces viscosus* to collagen-association with the type-1 fimbrial adhesin. Oral Microbiol. Immunol. 6: 1-5
- Mai, U. E. H.; Geis, G.; Leying, H.; Ruhl, G. and Opferkuch. 1989. Dymorphism of *Campylobacter pylori*. In F. Megraud and H., Lamouliatte. (eds.), Gastroduodenal pathology and *Campylobacter pylori*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. p. 29-33
- Mai, U. E. H.; Shahaman, M. and Colwell, R. R. 1990. Survival of *Helicobacter pylori* in the aquatic environment. En: H., Menge; M., Gregor; G. N. J., Tytgat and C. A. M., McNulty. (eds.) *Helicobacter pylori* 1990. Springer Verlag. Berlin. p. 90-96.
- Markwell. M. 1982 A new solid-state reagent to iodinate proteins. Anal. Biochem. 125: 427-432.
- Marshall, B. J. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet:1273-1275
- Marshall, B. J.; Barret, J. L.; Prakash, C.; MacCallu, R. W. and Guerrant. R. L. 1990. Urea protects *Helicobacter pylori* from the bactericidal effect of acid. Gastroenterol. 99: 697-702.
- Marshall, B. J. 1991. Virulence and pathogenicity of *Helicobacter pylori*. J. Gastroenterol. Hepatol. 6: 121-124.
- McGarey, D. L.; Milanesi, L.; Foley, D. P.; Reyes, B. Jr.; Frye L. C. and Lim, D. V. 1991. The role of motile *Aeromonas* in fish disease, ulcerative disease syndrome (UDS). Experientia 47: 441-444.
- Mégraud, F.; Bonner. F.; Garnier. M. and Lamouliatte, H. 1985. Characterization of *Campylobacter pyloridis* by culture, enzymatic profile and protein content. J. Clin. Microbiol. 22: 1007-1010.
- Mironova, N. V. 1975. The nutritive value of algae as food for *Tilapia mosambica*. J. Ichtyol. 15: 510-514.
- Mohn, F. H. 1978. Improved technologies for the harvesting and processing of microalgae and their impact on production cost. En: C. J. Soeder and R., Binsack. (eds.) "Microalgae for Food and Feed" Ergebn Limnol. 11: 228-253.
- Monfort, P. and Baleux, B. 1990. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. Appl. Environ. Microbiol. 56:1999-2006.
- Neman-Simha, V. and Mégraud, F. 1988. In vitro model for *Campylobacter pylori* adherence properties. Infect. Immun. 56: 3329-3333.
- Newell, D. G. 1991. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. Scand J. Gastroenterol. 26: 31-38
- Neyts, J.; Snoeck. R.; Schols, D.; Balzarini, J., Esko, D., Van Schepdael, A., and De Clercq, E. 1992. Sulfated polymers inhibit the interaction of human cytomegalovirus with cell surface heparan sulfate. Virology. 189: 48-58.

- Nilius, M.; Stöhle, A.; Ode, G. and Malfertheiner. P.** 1993. Cocoid like forms (CLF) of *Helicobacter pylori*. Enzyme activity and antigenicity. Zbl. Bakt. Ser. A, 280: 259-272.
- Noda, H., Amano, H., Arshima, K., Hashimoto, S. and Nisizawa, K.** 1989a. Studies on the antitumor activity of marine algae. Nippon Suisan Gakkaishi 55(7): 1259-1264.
- Noda, ti., Amano, H., Arashima, K., Hashimoto. S. & Nisizawa, K.** 1989b. Antitumor activity of polysaccharides and lipids from marine algae. Nippon Suisan Gakkaishi 55(7): 1265-1271.
- Ohta, S., T. Chang, O. Aozasa, M. Kondo and H. Miyata** 1992. Sustancial production of arachidonic and eicosapentaenoic acids by the red alga *Porphyridium purpureum* cultured in a light/dark cycle. Journal Fermentation and Bioengineering 74: 398-402.
- Palumbo, S. A; Bencivengo, M. M.; Del Corral, F.; Williams, A. C. and Buchanan, R. L.** 1989. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. J. Clin. Microbiol. 27: 854-859.
- Pangburn, M. K.; Atkinson, M. A. and Meri, S.** 1991. Localization of the heparin-binding site on complement factor H. J. Biol. Chem. 266: 16847-16853.
- Parish, C. R.; Coornbe, D. R.; Jakobser, K. B.; Bennett, F. A. and Underwood, P. A.** 1987. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumor metastasis by blocking tumor-cell-derived heparanases. Int. J. Cancer. 40: 511-518.
- Parish, C. R. and Snowden, J. McK.** 1988. Sulphated polysaccharides having metastasis and anti-inflammatory activity. ACT. Application No. WO 88/05301.
- Paulsson, M.** 1987. Noncollagenous proteins of basement membranes. Collagen. Rel. Res. 7: 443-461.
- Poffe, R. and De Beeck. E. O.** 1991. Enumeration of *Aeromonas hydrophyla* from domestic wastewater treatment plants and surface waters. J. Appl. Bacteriol. 71: 366-370.
- Powell, R. C.; Nevels and E. M. and McDowell, M. E.** 1961. Algae feeding in human. J. Nutrit. 75: 7-12.
- Radin, M. J.; Eaton, K. A. and Krakowka, S.** 1990. *Helicobacter pylori* gastric infection gnotobiotic beagle dogs. Infect. Immun. 58: 2606-2612.
- Raepple, E.; Hill, H. U. and Loos, M.** 1976. Mode of interactions of different polyanions with the first (C1, C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement-I. Effect on fluid phase C1 and C1 bound to EA orto EAC4. Immunochemistry. 13: 251-255.
- Ramus, J. S.** 1972. The production of extracellular polysaccharide by the unicellular red alga *Porphyridium aerugineus*. J. Phycol. 8: 97-111.
- Ramus, J.** 1977. Alcian blue: A quantitative aqueous assay for algal acid and sulfated polysaccharides J. Physiol. 13: 345-348.
- Rippey, S. R. and Cabelli, V. J.** 1979. Membrane filter procedure for the enumeration of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters. Appl. Environ. Microbiol. 38:108-113.
- Robinson, J. Goodwin, C. S.; Cooper, M. Burke, V. and Mee, B. J.** 1990. Soluble and cell-associated haemagglutinins of *Helicobacter (Campylobacter) pylori*. J. Med. Microbiol. 33: 277-284.
- Roels, O. A. and Gerard, R. D.** 1970. Artificial upwelling. Mar. Technol. Soc. Proc. Conf. Foods Drugs from the Sea. 102-122.
- Rostand, K. S. and Esko, J.** 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. Infect. and Immunol. 65: 1-8.

- Rune, S. J. 1994. Treatment strategies for symptom resolution, healing, and *Helicobacter pylori* eradication in duodenal ulcer patients. *Scand. J. Gastroenterol.* 29, Supl. 205: 45-47.
- Ruoslahti, E.** 1988. Fibronectin and its receptors. *Ann. Rev. Biochem.* 57: 375-413
- Ryther, J. H. and Tenore, K. R. 1976. Integrated system of mollusk culture. En: O. Devik (ed.) *Harvesting Polluted Waters*, Plenum Press, New York. pp.153-167
- Santos, Y.; Toranzo, A. E.; Barja, J. L.; Nieto, T. P. and Villa, T. G. 1988. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect. Immun.* 56: 3285-3293.
- Schubert, R. H. W. 1991. *Aeromonas* and their significance as potential pathogen in water. *J. Appl. Bacteriol.* 70:131S-135S.
- Shahamat, M.; Mai, U.; Paszko-Kolva, C.; Kessel, M and Colwell, R. R. 1993. Use of autoradiography to assess viability of *Helicobacter pylori* in water. *Applied and Environmental Microbiology.* 59: 1231-1235.
- Shelef, G.; Moraine, R. and Oron, G. 1978. Photosynthetic biomass production from sewage, In: C. J. Soeder and R. Binsack (eds.) *Microalgae for Food and Feed.* *Ergebn, Limnol.* II : 3-13.
- Shotts, E. B.** 1991. Selective isolation methods for fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.* 70:75S-80S.
- Sierburth, J M. 1961. Antibiotic properties of acrylic acid, a factor in the gastrointestinal antibiosis of polar marine animals. *J. Bacteriol.* 82: 72-79
- Sinclair, P. 1991. Virulence factors of *Helicobacter pylori*. *Can. J. Gastroenterol.* 5: 214-218.
- Sjöström, J. E. and Larsson, H. 1996. Factors affecting growth and antibiotic seceptibility of *Helicobacter pylori*: effect of pH and urease on the survival of a wild-type strain and a urease-deficient mutant. *Med. Microbiol.* 44: 425-433.
- Sjöström, J. E.; Fryklund, J.; Köhler, T. and Larsson, H. 1996. In vitro antibacterial activity of omeprazole and its selectivity for *Helicobacter* spp. are dependent on incubation conditions. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy.* 40: 621-626.
- Soeder, C. J. 1980. The Scope of Microalgae for Food and Feed. *En: "Algal Biomass, Production and Use"*. Shelef and C. J. Soeder (eds.). *Elsevier North-Holland Biomedical Press.* pp. 1 I-20.
- Soltész, V.**; Schalén, C. and Mardh, P-A. 1987. New selective medium for *Campylobacter pylori* IV. Kaijser, B. and Falsen, E. (eds.). University of Gothenburg. Sweden. Pp 433-436.
- Spiegelhalder, C.; Gerstenecker, B.; Kersten, A.; Schilz, E. and Kist, M. 1993. Purification of *Helicobacter pylori* superoxide dismutase and cloning and sequencing of the gene. *Infect. Immun.*, 61, 531 S-5325.
- Springer, G. F.; Wurzel, H. A.; McNeal, G. M.; Ansell, N. J. and Doughty, M. F. 1957. Isolation of anticoagulant fractions from crude fucoidin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 404-409.
- Stancioff, D. J. and Renn, D. W. 1975. Physiological effects of carrageenan, En: *Physiological effects of food carbohydrates.* A. Jeanes and J. Hodge. (eds.). American Chemical Society. Washington, D. C. pp 282-295.
- Stanley, J. G.** and Jones, J. B. 1976. Feeding algae to fish. *Aquaculture.* 7: 219-223.
- Stanley, N. F.** 1982. The effect of carrageenan on peptic and tryptic digestion of casein. *Prog. Food Nutr. Sci.* 6: 161-170.

- Suerbaum, S.; Josenhans, C. and Labigne, A. 1993. Cloning and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flaB flagellin gene and construction of *H. pylori* fla A- and fla B-negative mutants by electroporation-mediated allelic exchange. J. Bacteriol., 175: 3278-3288.
- Sugawara, I.; Ishizaka, S. and Möller, G. 1982. Carrageenan, highly sulfated polysaccharides and macrophage-toxic agents: Newly found human T lymphocyte activator. Immunobiol. 163: 527-538.
- Timpl, R.; Rohde, H.; Robey, P. G.; Rennard, S. I.; Foidart, J. M. and Martin, G. R. 1979. Laminin-a glycoprotein from basement membranes. J. Biol. Chem. 252: 9933-9937.
- Trust, T. J. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. Ann. Rev. Microbiol. 40:479-502.
- Trust, T. J.; Doig, P.; Emody, L.; Kienle, Z.; Wadtrom, T. and O' Toole, P. 1991. High-affinity binding of the basement membrane proteins collagen type IV and laminin to the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Infect. Immun. 59: 4398-404.
- Tyrel, D.J., Kilfeather, S., and Page, C.P. 1995. Therapeutic uses of heparin beyond its traditional role as an anticoagulant. TIPS 16: 198-204.
- Usui, T.; Asari, K. and Mizuno, T. 1980. Isolation of highly purified -fucoidan- from *Eisenia bicyclis* and its anticoagulant and antitumor activities. Agric. Biol. Chem. 44: 1965-1966.
- Varki, A. 1993. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. Glycobiology 3: 97-130.
- Wadström, T. 1990. *Helicobacter pylori* haemagglutinins. En: H., Menge; M., Gregor; G. N. J., Tytgat; B. J., Marshall; J. R., Warren. (eds.). Unidentified curve bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. Lancet: 1273
- Warkentin, T.E. 1996. Heparin-induced skin lesions. Brit. J. Hematol. 92: 494-497.
- West, A. P.; Millar, M. R. and Tornpkins, D. S. 1992. Effect of physical environment on survival of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Pathol. 45: 228-231.
- Westerlund, B.; Kuusela, P.; Risteli, L.; Vatio, T.; Rauvala, H.; Virkola, R. and Korhunen, T. K. 1989. The 075X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. Mol. Microbiol. 3: 329-337.
- Wildersmith, C. H. 1992. Bacteria1 overgrowth and gastric dysfunction. Br. J. Anaesth. 69: 545.
- Williams, L. A. and LaRocke P. A. 1985. Temporal occurrence of *Vibrio species* and *Aeromonas hydrophila* in estuarine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 50:1490-1495.
- Wotherspoon, A. C.; Ortiz-Hidalgo, G.; Falzon, M. R. and Isaacson, P. G. 1991. *Helicobacter pylori*-associated gastric and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet 338: II 75-I 176.
- Xiao, L. Yang, C., Patterson, P.S., Udhayakumar, V., and Lal, A.A. 1996. Sulfated polyanions inhibit invasion of erythrocytes by plasmodial merozoites and cytoadherence of endothelial cells to parasitized erythrocytes. Infect. Immun. 64: 1373-1378.

## X. APÉNDICE.

### Apéndice 1. Composición de Medios de Cultivo.

#### a) Microalgas. (Medio F/2, Guillard and Ryther, 1962)

Agua de mar	1000 ml	Metales traza***	
NaNO <sub>3</sub>	75 mg	Agua destilada	1000 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 mg	Na <sub>2</sub> -EDTA	4.36 g
NaSiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O*	30 mg	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.15 g
Tiamina-HCl**	100 g	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	180 mg
Biotina**	0.5 g	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10 mg
Cobalamina**	0.5 g	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	22 mg
Metales traza***	1.0 ml	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10 mg
pH del medio	7.50	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	6 mg

Esterilizar en autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup> (1.1 kg/cm<sup>2</sup>) 120°C durante 15 min. Dejar enfriar. Mantener en frasco ámbar y en refrigeración. Por separado se preparan las \*\*vitaminas y los \*\*\*metales traza. En 1000 ml de agua de mar se disuelven los nitratos, fosfatos y silicatos. Se esterilizan en autoclave a 15 lb/in<sup>2</sup>, excepto las \*\*\*vitaminas que se esterilizan por filtración en membrana de fibra de vidrio GF/C previamente esteril. Mantener en refrigeración.

## b) Bacterias.

## b.1) Medio Gap-Camp. (Soltész et al., 1987)

Medio Básico Gap-camp		Suplementos	
<b>Gc-Agar Base</b>	<b>25.0 g</b>	Cisteína. Hcl	<b>0.5</b>
<b>Bacto-Agar</b>	<b>2.9 g</b>	<b>Sangre de caballo, hematinizada</b>	<b>85 ml</b>
<b>Agua dest.</b>	<b>1000 ml</b>	<b>Suero de caballo, inactivado</b>	<b>100 ml</b>
		IsoVitalex	<b>3.5 ml</b>
		<b>Vancomicina</b>	<b>6.0 mg</b>
		Acido nalidíxico	<b>20.0 mg</b>
		<b>Ketoconazol</b>	<b>3.0 mg</b>

**Se mezclan los componentes** básicos del medio y se calientan a ebullición hasta que se disuelven completamente. Se esterilizan a 121 °C (15 lb/in<sup>2</sup>) por 20 min. Se enfría a una temperatura de 30-35°C y se agregan los suplementos: sangre de caballo y se lleva la mezcla a 80°C por 20 min, inmediatamente después se le adiciona el suero de caballo y se calienta a 56°C por 30 min, se deja enfriar la mezcla e inmediatamente después se le agregan el resto de los suplementos.

**b. 2) Medio agar MacConkey.**

Se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (DIFCO). Se pesan 50 g del medio y se disuelve en 1 litro de agua destilada, se hierve durante 1 min y se esteriliza en autoclave a 121 °C (15 lb/In<sup>2</sup>) durante 15 min.

**b.3) Medio agar TCBS.**

Se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (DIFCO). Se pesan 89 g de medio y se disuelve en 1 litro de agua destilada, calentar hasta la disolución completa No se esteriliza.

**b.4) Medio agar marino 2216**

Se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (DIFCO). Se pesan 37.4 g de caldo marino 2216 y se disuelve en 1 litro de agua destilada, se adiciona agar-agar al 2% y se esteriliza en autoclave a 121 °C (15 lb/In<sup>2</sup>) durante 15 min

Apéndice 2. Obtención de antígenos de *Helicobacter pylori*. (Amini et al., 1996).

Para la obtención de la adhesina de *H. pylori* con afinidad por el sulfato de heparina (HSBP), *H. pylori* fue cultivado en un medio líquido compuesto de caldo de Brucela y suero fetal de ternera al 3%. Después de 4-5 días de incubación, los cultivos fueron centrifugados a  $10,000 \times g/4^{\circ}\text{C}/20 \text{ min.}$  y el sobrenadante fue separado en un recipiente aparte. Posteriormente, las proteínas que fueron secretadas en ese medio de cultivo, se precipitaron con sulfato de amonio al 40, 60, 80 y 100% de saturación; de esta forma, se colectaron cuatro fracciones: HSBP40, HSBP60, HSBP80, HSBP100 las cuales son ricas c-n adhesinas con afinidad por el sulfato de heparina.

Para la obtención de las proteínas inducidas por estrés (Hsp60) de *H. pylori*, que es una proteína con afinidad por IgG y lactoferrina, se procedió de la siguiente manera: Células cultivadas en medio sólido GAB-camp (como se describe anteriormente) fueron lavadas con PBS para luego suspender las bacterias en agua destilada. Después de 2 h de incubación en un baño de hielo, se separó el sobrenadante por centrifugación ( $12,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 min.). La fracción obtenida (extracto con agua) fue pasada a través de una columna de Sepharosa-IgG, de donde la fracción eluída de dicha columna cromatográfica con NaCl 1.0M, fue subsecuentemente pasada por una columna de Ni-Sepharose (cromatografía quelante). Finalmente, la Hsp60 fue eluída de la columna con NaCl 0.1 M.

**Apéndice 3. Producción de anticuerpos policlonales (Amini et al., 1996).**

Para la producción de anticuerpos se utilizaron ratón BAL/c de 8 semanas de edad y conejos Nueva Zelandia de 3 meses de edad; se inocularon vía subcutánea (ratón 20 µg/100 µl de PBS y conejo 40 µg/ 100 µl de PBS) con las diferentes fracciones de los antígenos proteícos aislados de *Helicobacter pylori* mezclando 1 :1 con adyuvante completo de Freund (200 µl volumen total); la inoculación se realizó en tres períodos con espacio de 2 semanas cada aplicación. A las tres semanas de iniciada la inoculación de los organismos, se procedió a sangrarlos, recuperando el suero de cada una de las muestras por centrifugación (3000 r. p. m./10 min).

El título de los antisueros se determinó por la técnica de ELISA y su especificidad por medio de inmunoblot.

**Apéndice 4.** Aislamiento de compuestos de la matriz extracelular de células HeLaS3.(Ho y Jiang 1994).

Las células Hela S3 fueron cultivadas en las condiciones arriba mencionadas, una vez que se tuvieron cultivos confluentes, los células fueron tratadas con tripsina (0.25% en solución modificada de Hank) por 5 min a 37° C para permitir que se despeguen de la superficie plástica de la botella de cultivo y fueron centrifugadas a 4500 r.p.m. durante 20 min a 22°C para retirar el medio de cultivo, el paquete celular fue resuspendido en el mismo volumen con agua destilada y se dejó reposar durante 30 min a 22°C hasta tener el 100% de las células lisadas (comprobado por observación al microscopio de contraste de fases). La solución celular fue centrifugada a 18,000 r.p.m. por 1 hora a 4°C, se retiró el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en una solución de boratos de sodio 0.1 M, pH 9.3, y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

**Apéndice 5. Marcaje de bacterias con  $^{125}\text{I}$ . (Markwell 1982; Fröman et al., 1984).**

Un ml de una suspensión bacteriana de *H. pylori* crecidas en medio GAB-camp, fueron cosechadas, lavadas y suspendidas en PBS (como se describió anteriormente) a una concentración de  $10^{10}$  ufc/ml fueron transferidas a un tubo de poliestireno y se les agrega dos esferas de poliestireno no porosas constituidas de N-cloro-bencenosulfonamida (Iodo-Beads, Pierce) a fin de oxidar las cadenas polipeptídicas expuestas en la superficie bacteriana y facilitar la exposición de residuos de tirosina, para promover la unión del  $^{125}\text{I}$ . La suspensión bacteriana fue incubada durante 5 min a  $22^{\circ}\text{C}$  y luego se agregaron  $4\ \mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$  y se incubó la mezcla durante 20 min adicionales, después del período de incubación la suspensión bacteriana fue removida a un nuevo tubo de poliestireno y fue centrifugada a  $5,000\ \times\ g/22^{\circ}\text{C}/10\ \text{min}$ ; se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue lavado dos veces con 10 ml de PBS conteniendo Tween-20 al 0.05% (previamente enfriado a  $4^{\circ}\text{C}$ ). Finalmente, el paquete bacteriano se resuspendió en el volumen original con amortiguador de fosfatos.

**Apéndice 6. Marcaje de bacterias con biotina (Harlow y Lane, 1988).**

Las cepas bacterianas, se resuspendieron en un regulador de carbonato de sodio 0.1 M, pH 8.0 y se ajustaron espectrofotométricamente a una densidad óptica de 1.0 a 540 nm, dando una concentración final de  $10^9$  ufc/ml. De esta suspensión bacteriana se partió para marcar con Biotina (N-hidroxi-succinil-biotina). Se centrifugó la suspensión bacteriana a 4000 x g por 10 min a 22°C; el paquete bacteriano fue resuspendido en 1 ml del mismo regulador de carbonato de sodio y se le agregaron 130  $\mu$ l de biotina (1 mg/ml resuspendida en Dimetil sulfóxido), incubando durante 2 hr a 22°C en la oscuridad. La suspensión bacteriana se lavó 3 veces con PBS, pH 7.4, centrifugando a 4000 x g durante 10 min a 22°C. Finalmente se resuspendió el paquete bacteriano al volumen inicial en medio de cultivo RPMI 1640.

Apéndice 7. **Cuantificación de proteínas. (Bio Rad Protein Dye Reagent)**

**Microensayo.**

**Se preparan tres diluciones de la proteína estándar (albúmina bovina).**

**Se pipetea 800  $\mu$ l de PBS y se adicionan 200  $\mu$ l de la muestra a analizar y finalmente son adicionados 200  $\mu$ l del reactivo, agitar perfectamente. Incubar de 5 a 20 min. Leer absorbancia a 595 nm.**

## Apéndice 8. Cuantificación de carbohidratos totales

**Método de Fenol-Sufúrico (Dubois et al., 1956).**

Se pesan 5 mg de muestra liofilizada resuspendiéndose en 2 ml de NaOH 1 N y se somete a hidrólisis a ebullición por 1 h. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 10 min.

Del extracto alcalino obtenido se coloca en un tubo 500  $\mu$ l de muestra y 500  $\mu$ l de fenol al 4% y se agita en un agitador tipo Vortex. Inmediatamente se le agrega, resbalando por las paredes del tubo, 2.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se agita con cuidado en el Vortex. Se deja reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se lee contra un blanco tratado igual a las muestra a 485 nm en un espectrofotómetro con cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico.

La curva estándar se prepara a partir de una solución concentrada de 1 mg/ml glucosa anhidra, haciendo un gradiente de concentración desde 0 a 250 mg/ml.

**Apéndice 9. Determinación del contenido de sulfatos en exopolisacáridos.****Método del azul alcian (Ramus, 1977)**

Colocar en un tubo 1 ml del medio extracelular procedente de los diferentes cultivos de microalgas, se le añaden 4 ml de ácido acético 0.5 M pH 2.5 y se agita en Vortex.

Agregar 10  $\mu$ l del colorante Azul Alcian (preparado a una concentración de 1 mg/ml en ácido acético 0.5 M pH 2.5) y agitar nuevamente en el Vortex. Para una reacción de precipitación completa se deja en agitación toda la noche.

Centrifugar los tubos a 3000 r.p.m. durante 30 min y el sobrenadante se separa y se lee a 610 nm. La diferencia entre el blanco es proporcional a la concentración del polianión. A la par se hace la cuantificación del exopolisacárido, se toma una muestra de los diferentes medios extracelulares y se determinan los carbohidratos totales por el método del fenol-sulfúrico.

**Apéndice 10.** Aislamiento y mantenimiento de células de cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). (Modificado de Fuerst et al., 1991)

a. Cultivos primarios de células de tegumento, intestino y branquias.

Bajo condiciones asépticas se removieron los tejidos de los organismos, se hicieron cortes longitudinales y se fraccionaron en pequeñas porciones de aproximadamente 3 mm, se removió el epitelio por 3 incubaciones consecutivas de 15 min cada una, con solución de Hank's libre de magnesio y calcio, conteniendo 0.05 M de EDTA, en agitación constante a 22°C. Posteriormente los tejidos fueron tratados con Dispasa (1.5 mg/ml), preparada en medio RPMI 1640 conteniendo 20 % de suero de caballo, en tres ciclos de 30 min cada uno en agitación constante a 22°C. De cada uno de los ciclos de incubación, el sobrenadante fue colectado y las células linfoides obtenidas fueron lavadas dos veces con el mismo medio de cultivo y finalmente fueron mezcladas. La suspensión celular resultante fue pasada a través de una columna de fibra de vidrio. Para los bioensayos la dilución apropiada de células, fue preparada en el mismo medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 20% de suero de caballo y 40 µg/ml de gentamicina.

Las células fueron mantenidas en placas de 96 pozos, conteniendo medio RPMI 1640, suplementado con 40 µg/ml de gentamicina; 2 mM de L-glutamina y suero de caballo a una concentración de 20% (RPMI 1640-completo). Las placas de cultivo fueron incubadas a 22°C (95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>).

**b) Cultivos primarios de linfocitos T de sangre (Fuerst et al., 1991).**

Se obtuvo sangre de los organismos por punción cardiaca, usando heparina como anticoagulante, la cual se mezcló con PBS pH 7.4 en una relación 1:2 (v/v) y fue mezclada perfectamente; la mezcla fue adicionada cuidadosamente en la parte superior de un tubo de ensaye que contenía una solución de Histopaque 1077 y los tubos fueron centrifugados a 400 x g por 30 min a 22°C. Después de la centrifugación se aspiró cuidadosamente la interface opaca que contiene las células mononucleares, la cual es transferida a un nuevo tubo de ensaye que contenía cloruro de amonio 0.87% para lisar cualquier eritrocito contaminante, incubando a 22 °C por 5 min, inmediatamente después los tubos fueron centrifugados a 250 x g a 22°C durante 10 min, éste paso se repite las veces necesarias hasta eliminar los eritrocitos contaminates. Una vez que se obtuvieron los linfocitos libres de eritrocitos fueron lavados 3 veces con PBS, pH 7.4, centrifugando a 250 x g durante 10 min a 22°C.

Para los bioensayos la dilución apropiada de células, fue preparada en el mismo medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 20% de suero de caballo y 40 µg/ml de gentamicina.

Las células fueron mantenidas en placas de 96 pozos, conteniendo medio RPMI 1640, suplementado con 40 µg/ml de gentamicina; 2 mM de L-glutamina y suero de caballo a una concentración de 20% (RPMI 1640-completo). Las placas de cultivo fueron incubadas a 22°C (95% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>).

**Apéndice II. Reactivos y materiales.**

Los medios de cultivo bacteriológicos (agar GAB-Camp, agar marino 2216, TSB, TCBS, agar sangre y agar MacConkey) fueron adquiridos de Difco Laboratories (Detroit, MI. EEUU).  $^{125}\text{I}$  fue adquirido de Amersham International plc (Buckinghamshire, Inglaterra). La Succimidil-7-amino-4-metil cumarina-3-ácido acético (AMCA-NHS) y las esferas de poliestireno constituidas de N-clorobenzenosulfonamida (Iodo-Beads) se compraron a Pierce (Rockford, IL. EEUU). Estreptavidina marcada con peroxidasa se adquirió de Boehringer Mannheim GmbH Biochemica (Mannheim, Alemania). DEAE-Celulosa se compró a Pharmacia Biotech Inc. (Piscataway, NJ. EEUU). El medio de cultivo para células animales RPMI-1640, los conjugados de IgG con FITC y peroxidasa, el anticuerpo monoclonal contra la proteína de estrés Hsp70 de células eucariotes, la N-hidroxi-succinil-biotina (Biotina-NHS), la dispasa, el orto-fenilenediamino, el suero fetal de ternera, y los diferentes antibióticos se adquirieron de Sigma Chemical CO (St. Louis, MO. EEUU). El resto de reactivos para la preparación de soluciones amortiguadoras y sales e ingredientes para los medios de cultivo fueron adquiridos de diferentes casas comerciales y fueron de grado analítico. Las membranas de ultrafiltración de 0.45  $\mu\text{m}$  se compraron a Millipore Corporation (Bedford, MA. EEUU). Todo el material de plástico estéril para el cultivo de células animales se adquirió de Costar Scientific Corporation (Cambridge, MA. EEUU). Los péptidos sintéticos fueron una donación del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Estrasburgo, Francia.