



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LEVADURAS MARINAS COMO POSIBLES
PROBIÓTICOS PARA CONTROLAR INFECCIONES POR
*Helicobacter pylori***

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

P r e s e n t a

Norma Lilia Gama Valdés

La Paz, B.C.S., Diciembre del 2001.

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11 horas del día 13 del Mes de diciembre del 2001, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"LEVADURAS MARINAS COMO POSIBLES PROBIOTICOS PARA CONTROLAR INFECCIONES POR *Helicobacter pylori*"

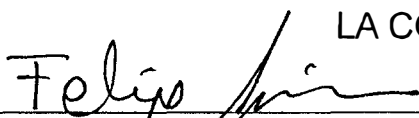
Presentada por el alumno:

NORMA LILIA GAMA VALDES

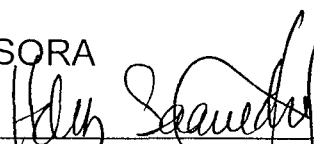
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

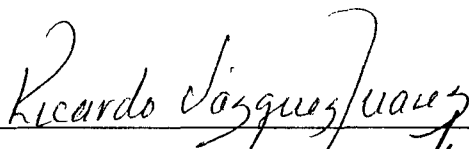
LA COMISION REVISORA



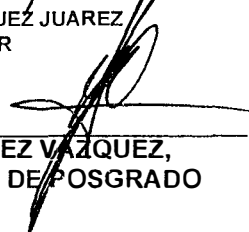
DR. FELIPE ASCENCIO
DIRECTOR DE TESIS



DRA. NORMA Y. HERNANDEZ SAAVEDRA
CO-TUTOR



DR. RICARDO VAZQUEZ JUAREZ
CO-TUTOR



DR. SERGIO HERNANDEZ VAZQUEZ,
DIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DE COMITES

La presente tesis fue dirigida por:

Dr. Felipe Ascencio

Comité Tutorial

Dr. Felipe Ascencio

Dr. Ricardo Vázquez

Prof. Ho Bow

Comité Revisor de Tesis

Dr. Felipe Ascencio

Dra. Norma Y. Hernández

Jurado de Examen de Grado

Dr. Felipe Ascencio

Dra. Norma Y. Hernández

Dr. Hector Nolasco

Dr. Sergio Hernández Vázquez

Director del Programa de Estudios de Posgrado-CIBNOR

RESUMEN

El desarrollo reciente de productos naturales en el área de salud ha tomado gran interés, por lo que se han incrementado los esfuerzos por descubrir las propiedades específicas que tienen distintas biomoléculas contenidas en alimentos, plantas, y microorganismos. Con este conocimiento generado, aunado a los avances en el desarrollo de fármacos, será posible el diseño de productos tales como los nutracéuticos o probióticos que no solo mantengan y normalicen cualquier función fisiológica o metabólica, sino que también la potencialicen, antagonicen o modifiquen de modo que resulte en la prevención y/o tratamiento de enfermedades.

Con el fin de encontrar su aplicación en el tratamiento de un proceso infeccioso, se evaluaron las características probióticas de levaduras aisladas de ambientes marinos. Se analizó e identificó la especificidad de su adhesión a líneas celulares, encontrando que las levaduras son capaces de unirse *in vitro* a células epiteliales de humano, en virtud de que expresan entidades proteicas (adhesinas) que tienen afinidad por componentes de naturaleza glicosídica como ácido siálico y glicosaminglicanos a los que *Helicobacter pylori*, patógeno del humano, reconoce en las células del huésped iniciando así el proceso de infección.

Por los resultados obtenidos concluimos que, las levaduras marinas representan un potencial para el desarrollo de probióticos y nuevas estrategias antimicrobianas alternativas al uso de antibióticos, basado en un concepto de terapia anti-adhesiva de microorganismos al inhibir el proceso de reconocimiento adhesina-receptor entre patógeno-huésped.

Palabras clave: probióticos, levadura, *Helicobacter pylori*, adhesión.

Vo. Bo.


Dr. Felipe Ascencio Valle.

ABSTRACT

As we enter the third millennium, demand for development of natural products for maintaining health have increased exponentially. As we understand and discover the potential benefits of different biomolecules contained in microorganisms, herbal plants, and food crops, coupled to advances in pharmacology and food technology, it should be possible to design products, such as nutraceuticals and probiotics. Probiotics are microorganisms or components of them without pathogenicity, that, when administrated, are beneficial to the health and wellbeing of the host.

One form of research is the treatment of infectious events with substances with probiotic characteristics from yeast isolated from marine environments. To define putative adhesion and colonization factors, we analyzed and identified the specificity of adhesion in epithelial cell lines, finding that yeasts *in vitro* are capable of adhering to human cells. And further, the yeasts produce a number of adhesive proteinaceous components (possible lectins) that enable it to recognize different carbohydrate moieties, such as sialic acid and glycoconjugates. These components are present in the cell membrane of the host and are also recognized by the pathogen, *Helicobacter pylori*, which is found in the human stomach and initiates the infectious process leading to stomach ulcers.

From our findings, we conclude that marine yeasts provide a potential application as probiotic supplements to decrease the use of antibiotics, using them as anti-adhesive therapy to inhibit the recognition process between adhesin-receptor of pathogen and host.

Key words: probiotics, yeast, *Helicobacter. pylori*, adhesion.

DEDICATORIA

Le dedico el esfuerzo de este trabajo a

Mi familia

A la familia Ascencio Gijón

A mis compañeras de casa en Singapur

A los amigos esparcidos por el mundo y a los que no, que por su amistad y su ejemplo me motivan.

Listen to Me in the truth of your soul, in the feelings of your heart, in the quiet of your mind.

Hear Me, everywhere. Whenever you have a question, simply know that I have answered it already.

I will speak to you if you will listen. I will come to you if you will invite Me. I will show you then that I have always been there... all ways.

I will not leave you, I cannot leave you, for you are my creation and my product, My daughter and My son, my purpose and My... self.

Call on Me, therefore, Wherever and whenever you are separate from the place that I am.

I will be there.

With Truth.

And Light.

And Love.

((Conversations with God))

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por el apoyo recibido a través del proyecto institucional PAC II. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca-crédito No. 144478 que me otorgó. Al todo el personal del departamento de estudios de Posgrado-CIBNOR por todo el apoyo que me brindó durante mis estudios en este centro. Al Dr. Felipe Ascencio, por su infinita paciencia, amistad, enseñanza y las oportunidades que me brindó por creer en mí. A la Universidad Nacional de Singapur, Prof. Ho Bow por su confianza, amistad y ayuda. Al equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la NUS por su disposición de enseñanza y ayuda. Han Chon, Ma. de Jesús Romero, Dra. Tony Guzmán-Murillo y Arturo Sierra por su dirección y apoyo técnico. Dr. Ricardo Vázquez y Dra. Norma Hernández por sus comentarios y sugerencias. Al Equipo de trabajo del Laboratorio de Patogénesis Microbiana por hacer de éste un laboratorio alegre y por sus contribuciones útiles en el desarrollo de este trabajo. A los amigos y compañeros de trabajo por su aliento y compañía, sus sentimientos y sonrisas compartidas.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Nutraceuticos y probióticos	1
1.1.1. Naturaleza de la microflora gastrointestinal.....	3
1.1.2. Probióticos como complementos.....	4
1.1.3. Potencial probiótico de levaduras.....	5
1.1.4. Criterios importantes en la selección de un probiótico	7
1.2. Adhesión de microorganismos	8
1.2.1. Interacciones entre microorganismos y células eucariontes.....	8
1.2.2. Métodos para evaluar las interacciones adhesina-receptor	11
1.3. Levaduras.....	13
1.3.1. Impacto biotecnológico.....	13
1.3.2. Levaduras Marinas	13
1.3.3. Pared celular de levaduras	15
1.4. <i>Helicocater pylori</i>	17
1.4.1. Epidemiología.....	17
1.4.2. Patogénesis y virulencia de <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.4.3. Aspectos inmunológicos.....	21
1.4.4. Tratamiento	22
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS	26

4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1. Microorganismos, condiciones de cultivo y almacenamiento	27
4.2. Evaluación de la hidrofobicidad celular, identificación y determinación de la especificidad de lectinas asociadas a levaduras marinas	28
4.2.1. Ensayo de agregación celular por saturación con sulfato de amonio....	28
4.2.2. Ensayo de agregación de levaduras con neoglicoproteínas inmovilizadas en esferas de látex (Ensayo de agregación estándar).....	29
4.2.3. Ensayo de inhibición de la agregación levadura-neoglicoproteína utilizando compuestos glicosídicos como inhibidores.....	29
4.2.4. Efecto de tratamiento químico, físico y enzimático en el reconocimiento de neoglicoproteínas por <i>K. marxianus</i>	30
4.2.5. Electroforesis & Western blot de proteínas de superficie de <i>K. marxianus</i> utilizando como sonda neoglicoproteínas marcadas con biotina ...	31
4.3. Evaluación del grado de adhesión y determinación de la especificidad de la adhesión de levaduras a células epiteliales.....	33
Cultivos de líneas celulares HeLa S3 y KATO III.....	33
4.3.1. Determinación espectrofotométrica de la adhesión de levaduras marcadas con biotina a células epiteliales HeLa S3 y KATO III	34
4.3.2. Efecto de diferentes carbohidratos sobre la adhesión de levaduras a células epiteliales HeLa S3 y KATO III	35
4.4. Evaluación de la actividad de los componentes extracelulares de levaduras marinas sobre la adhesión de <i>H. pylori</i> a células epiteliales de humano	35
4.4.1. Ensayo de inhibición de la adhesión de <i>H. pylori</i> marcado con biotina inhibiendo con componentes de superficie de levaduras marinas	35
4.4.2. Ensayo de desplazamiento de la adhesión de <i>H. pylori</i> adherido a células HeLa S3 y KATO III, utilizando componentes de superficie de levaduras marinas	36
4.5. Tratamiento estadístico de datos.....	36

5. RESULTADOS	37
5.1. Identificación de hidrofobinas y lectinas en levaduras marinas.....	37
5.1.1. Determinación del grado de hidrofobicidad de levaduras mediante ensayo de agregación con sulfato de amonio	37
5.1.2. Ensayo de agregación de levaduras con neoglicoproteínas inmovilizadas en esferas de látex.....	38
5.1.3. Caracterización de la agregación neoglicoproteína-levadura.....	38
5.1.3.1. Inhibición de la agregación neoglicoproteína-levadura.....	38
5.1.3.2. Efecto del tratamiento químico, enzimático y físico de <i>K. marxianus</i> en el reconocimiento de neoglicoproteínas	39
5.1.4. Identificación de la especificidad de lectinas expuestas en <i>K. marxianus</i> por medio de electroforesis y Western blot.....	44
5.2. Caracterización de la adhesión de levaduras a células HeLa S3 y KATO III46	
5.2.1. Adhesión de levaduras a células HeLa S3 y KATO III.....	46
5.2.2. Efecto de compuestos glicosídicos sobre la adhesión de levaduras marinas a células HeLa S3 y KATO III	47
5.3. Efecto de componentes extraídos de pared celular de levaduras sobre la adhesión de <i>H. pylori</i> a células HeLa S3 y KATO III	50
5.3.1. Inhibición de la adhesión de <i>H. pylori</i>	50
5.3.2. Desplazamiento de <i>H. pylori</i> adherido a células HeLa S3 y KATO III ...	50
6. DISCUSIÓN	53
7. CONCLUSIONES	60
8. PERSPECTIVAS	61
9. REFERENCIAS	62
10. APÉNDICE	73
11. ANEXOS	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Hidrofobicidad celular de levaduras marinas	40
Tabla 2. Ensayo de agregación de partículas para identificar lectinas expuestas en superficie celular de levaduras marinas	40
Tabla 3. Inhibición de la agregación neoglicoproteína-levadura <i>Kluyveromyces marxianus</i>	41
Tabla 4. Inhibición de la agregación neoglicoproteína-levadura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	42
Tabla 5. Inhibición de la agregación neoglicoproteína-levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cbs 7764	43
Tabla 6. Efecto de tratamientos físicos y químicos de <i>K. marxianus</i> en el reconocimiento de neoglicoproteínas	44
Tabla 7. Pesos moleculares de proteínas de pared celular de <i>K. marxianus</i> corridas en geles de poliacrilamida al 12%	45

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. SDS PAGE y Western blot de proteínas extracelulares de <i>K. marxianus</i>	45
Fig. 2. Adhesión de levaduras marinas a células epiteliales HeLa S3 y KATO III	46
Fig. 3. Efecto de compuestos glicosídicos sobre la adhesión de levaduras marinas a células epiteliales HeLa S3 y KATO III	48
Fig. 4. Efecto de componentes de superficie de levaduras marinas sobre la adhesión de <i>H. pylori</i> a células HeLa S3 y KATO III	51
Fig. 5. Efecto de componentes de superficie de levaduras marinas sobre el desplazamiento de <i>H. pylori</i> previamente adherido a células HeLa S3 y KATO III	52

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Nutraceuticos y probióticos

Al iniciarse el nuevo milenio, se ha vuelto patente el interés por descubrir sustancias naturales para el desarrollo de nuevos productos, que al administrarse cumplan con un papel fisiológico específico y benéfico, para el control y prevención de enfermedades y, estimulación de la respuesta inmunológica. Este concepto merece y es objeto de investigación científica, no sólo para encontrar e identificar componentes biológicamente activos en los recursos naturales, sino también para tratar de establecer sus mecanismos de acción.

Por otra parte, a pesar de los importantes avances en el desarrollo de nuevos fármacos y antibióticos, las infecciones gastrointestinales continúan siendo uno de los principales problemas clínicos y la mortalidad asociada a microorganismos Gram negativos se calcula entre un 20 y 40%. La industria farmacéutica esta consciente de que a futuro no será capaz de desarrollar más y mejores antibióticos para competir con el dramático incremento de patógenos con resistencia a estos. Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha recomendado un programa global para reducir el uso de antibióticos en áreas como la ganadería, agricultura, acuicultura y salud pública, promoviendo el resurgimiento de viejas terapias naturales como la administración de microorganismos no patógenos para el tratamiento de

infecciones (WHO 1994). Tomando esto en cuenta, la industria farmacéutica ha venido cambiando su visión incrementado su interés en la elaboración de productos naturales y desde hace tiempo se sugiere el uso de probióticos, dado que estos representan una alternativa para la obtención de productos naturales para la prevención y el tratamiento de enfermedades principalmente gastrointestinales, sin presentar efectos colaterales y con un bajo costo de producción (Rolfe 2000 & Lewis *et al.* 1998).

La definición de probiótico ha evolucionado al paso del tiempo. Lilly & Stillwell en 1965 (Lilly *et al.* 1965) citaron el término "probiótico" para describir cualquier sustancia u organismo que contribuyese a mantener el equilibrio microbiano intestinal cuando estudiaban animales de granja. Posteriormente, Fuller (1989) señaló que los probióticos son un suplemento alimentario microbiano vivo que beneficia al huésped animal con una mejoría del balance microbiano intestinal. Schaafsma (1996), define el probiótico como organismos vivos que tras su ingestión en cierto número, ejercen efectos benéficos mas allá de los inherentes a la nutrición básica. Los suplementos de probióticos son modificadores de la composición y/o de la actividad de la microflora (Fuller 1999). Otros autores señalan que los probióticos pueden no necesariamente ser únicamente organismos vivos, sino que pueden incluir también partículas o porciones de microorganismos inactivados con nula o muy baja patogeneidad que, cuando son administrados ejercen una actividad fisiológica específica benéfica.

Los alimentos y/o productos que contienen microorganismos vivos son ingeridos diariamente por millones de personas en el mundo, y así ha sido desde hace siglos. Las bacterias y levaduras utilizadas como probióticos tienen bajo potencial de toxicidad y se han utilizado en individuos inmunodeprimidos como recién nacidos con desnutrición (Oberhelman *et al.* 1999) y pacientes con VIH (Wolf *et al.* 1998) sin que se hayan registrado problemas.

1.1.1. Naturaleza de la microflora gastrointestinal

La flora gastrointestinal del humano, es una población heterogénea formada por más de 500 especies distintas de bacterias que se encuentran en el tubo digestivo. Esta flora ejerce múltiples funciones que se pueden clasificar en 2 categorías principales: *i*) metabólicas-nutricionales; y *ii*) protectoras (Bengmark 1998; Gibson *et al.* 1995; Fuller 1991).

***i*) Metabólicas-nutricionales.** La flora gastrointestinal interviene en funciones tales como, regulación de la acidez (pH) del contenido intestinal, degradación del colesterol, digestión de lactosa, metabolismo de numerosos medicamentos, síntesis de algunas vitaminas particularmente B12, K y ácido fólico; rescate colónico de nutrientes (esencialmente carbohidratos y proteínas) que no han sido digeridos y absorbidos por el intestino delgado y que llegan al colon. Este fenómeno resulta en la producción de ácidos grasos de cadena corta, también llamados volátiles, que son absorbidos por el colon. Este mecanismo limita la

pérdida de energía que representaría la excreción de estos nutrientes por las deposiciones (Gibson *et al.* 1995).

ii) Protectoras. La microflora gastrointestinal, tiene la capacidad de modular el sistema inmune del intestino y ejercer una exclusión competitiva, es decir crear protección frente a microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* y *Shigella* (Bengmark 1998). Esto lo pueden lograr de diferentes maneras: 1) compitiendo para el espacio físico y nutrientes; 2) produciendo sustancias antibióticas activas frente a estos patógenos; 3) estimulando el sistema inmune del intestino; 4) contribuyendo a la acidificación de contenido del colon, lo cual es desfavorable para el crecimiento de patógenos, 5) inactivando ciertas toxinas liberadas por microorganismos (Gibson *et al.* 1995; Fuller 1991).

1.1.2. Probióticos como complementos

Todos los estudios realizados en humanos indican que los probióticos no se instalan definitivamente en el tubo digestivo, sino que, una vez terminada la ingestión regular del producto que los contiene, el probiótico quedará eliminado completamente en 15 a 60 días (Johansson *et al.* 1993 & Ouwehand *et al.* 1999b), por lo tanto, un aporte regular del probiótico es recomendable para mantener el equilibrio de la flora en el tubo digestivo y lograr los efectos deseados sobre la salud.

En determinadas circunstancias, por ejemplo en la terapia con algunos antibióticos, desnutrición o trastornos en el sistema digestivo, el balance de la flora normal queda en desequilibrio. La administración de probióticos ayudaría a restablecer la flora benéfica y normalizar las funciones del sistema digestivo. Estos pueden ser administrados con distintos fines como, i) potencializar funciones fisiológicas específicas. En general cada efecto es específico de una cepa particular, por ejemplo un *Lactobacillus* que mejora la digestión de la lactosa no necesariamente va a proteger el intestino frente a patógenos, ii) profiláctico, iii) terapéutico, tal es el caso de la administración de *Saccharomyces boulardii* para el tratamiento de diarrea crónica o recurrente (Guarino *et al.* 1997; Elmer *et al.* 1996 & Kirchelle *et al.* 1996) y *Lactobacillus casei* GG para el tratamiento de *H. pylori* (Micchetti *et al.* 1999; Aiba *et al.* 1998; Coconnier *et al.* 1998 & Kabir *et al.* 1997) y diarrea por rotavirus (Guarino *et al.* 1997).

1.1.3. Potencial probiótico de levaduras

En humanos, los microorganismos más utilizados son principalmente bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium sp* (Salminen *et al.* 1998) y sus mecanismos de acción han sido muy bien estudiados. En contraste, se han realizado muy pocos estudios para descubrir las propiedades probióticas que las levaduras presentan, pues estas no se consideran como flora natural del tracto gastrointestinal. No obstante, las levaduras presentan ciertas características que las vuelven atractivas para estudiar su potencial probiótico. Las levaduras son microorganismos que crecen fácilmente con requerimientos mínimos en el

medio de cultivo, por lo que su producción resulta relativamente de bajo costo. Algunas especies de levaduras tienen la capacidad de crecer en rangos amplios de temperatura (que van desde los 0 a 47°C) (Phaff 1990), pH (2.2 a 8.6) y salinidad (Hernández-Saavedra 1995a). Por otro lado, algunos géneros de levaduras o biomoléculas de éstas, se han utilizado ya como agentes bioterapéuticos. La administración oral de algunas especies de *Saccharomyces* ha mostrado una eficacia en la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Lewis *et al.* 1998). En general, la pared celular de levaduras esta formada en gran parte por estructuras de β -glucanos. Estas moléculas, actualmente son utilizadas por la industria farmacéutica como inmunomoduladores terapéuticos en pacientes inmunocomprometidos (Ross *et al.* 1999; Miura *et al.* 1999). Por otro lado, algunas especies de levaduras representan un potencial para la producción de poliaminas. Las poliaminas son moléculas presentes en todas las células vivas y se requieren principalmente en aquellos tejidos con alto recambio celular y de crecimiento (Bardocz 1993) y se ha observado que estas moléculas son un factor importante en la maduración intestinal (Greco *et al.* 2000). Actualmente, se ha estudiado la administración de levaduras productoras de poliaminas (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis* y *Debaryomyces hansenii*) en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces (Tovar *et al.* 2000) y en humanos, se encontró que la administración oral de *S. boulardii* incrementaba la actividad enzimática en el borde del cepillo de la mucosa duodenal (Buts *et al.* 1994) y ejercía un efecto positivo sobre la maduración del enterocito (Jahn *et al.* 1996).

1.1.4. Criterios importantes en la selección de un probiótico

Para la selección de un probiótico es importante tomar aspectos de inocuidad, funcionales y biotecnológicos (Saalera 2000).

Una cepa se cataloga como inocua cuando:

- No se ha asociado con eventos de patogeneidad
- No poseen genes de resistencia a antibiótico

Los aspectos funcionales de los probióticos deberán ser estudiados *in vitro* y los resultados deberán ser respaldados después en estudios controlados *in vivo*. El probiótico se considera funcional cuando presenta las siguientes propiedades:

- Tolerancia a ácido y jugo gástrico
- Tolerancia a sales biliares
- Adherencia a superficies epiteliales y persistencia por lo menos temporal en el sistema digestivo
- Promueve una inmunoestimulación sin efecto inflamatorio
- Ejerce actividad antagonista contra patógenos como *H. pylori*, *Salmonella* sp. *Listeria monocytogenes* y *Clostridium difficile*
- Antimutagénicas y anticarcinogénicas

Para su aplicación biotecnológica se toman en cuenta aspectos relacionados en su proceso de producción tales como:

- Estabilidad y viabilidad a través del proceso y almacenamiento
- Propiedades sensoriales
- Resistencia a fagos

De los principales criterios de selección es su capacidad de adherirse por lo menos temporalmente a las células epiteliales del tracto digestivo (Salminen *et al.* 1996; Ouwehand *et al.* 1999a & Saalera *et al.* 2000). La capacidad de adhesión de los microorganismos es un factor que les permite evadir ser expulsados entre el moco gástrico y escapar de otros mecanismos de defensa no específicos del huésped logrando una colonización exitosa.

1.2. Adhesión de microorganismos

1.2.1. Interacciones entre microorganismos y células eucariontes

La adhesión de los microorganismos a las células es dependiente de las diferentes propiedades físicas de las moléculas presentes en su superficie. Estas moléculas denominadas adhesinas son principalmente de origen proteico (Jones 1977) y son capaces de unirse a los receptores del huésped. Una adhesina, por ejemplo bacteriana, puede poseer múltiples sitios de unión y a su vez algunos microorganismos pueden poseer múltiples adhesinas (Logan 1996). En las uniones adhesina-receptor están involucrados mecanismos inespecíficos y específicos. Las asociaciones inespecíficas están generadas por fuerzas electrostáticas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, en cambio, las uniones específicas, están mediadas por lectinas que reconocen de manera específica a su receptor (Logan 1996).

Interacciones específicas

a) Naturaleza de las lectinas. Las lectinas son estructuralmente un diverso grupo de proteínas y glicoproteínas que se unen reversiblemente a residuos específicos de carbohidratos (Clark *et al.* 2000). Aglutinan células de origen animal y vegetal, precipitan polisacáridos, glicoproteínas y glicolípidos. Las lectinas poseen sitios hidrofóbicos y son tal vez estos los que están mediando su principal fuerza de interacción (Kennedy *et al.* 1995). Es interesante descubrir las propiedades bioadhesivas de las lectinas, ya que en un momento dado serían una herramienta útil para el transporte de fármacos y vacunas administrados por vía oral a sitios específicos de la mucosa.

b) Naturaleza de los receptores. La membrana de la célula eucarionte contiene normalmente entre un 2 y un 10% de carbohidratos, en forma de glicolípidos y glicoproteínas. Los residuos de azúcar de las glicoproteínas y de los glicolípidos de membrana se localizan siempre en la parte externa, cumpliendo importantes funciones celulares (Strayer 1995). Los residuos de azúcar asociados a las glicoproteínas pueden ser hexosas (generalmente D-galactosa o D-manosa), methylpentosas (L-fucosa), N-acetylhexosaminas, ácido siálico o ácidos urónicos (Logan 1996) y son posibles sitios de reconocimiento para la unión de microorganismos.

Interacciones inespecíficas

a) Hidrofobicidad. Es sabido que La hidrofobicidad celular esta asociada a la capacidad de células microbianas de muchos grupos taxonómicos para adherirse a numerosos tipos de superficies, incluyendo tejido animal (Doyle et al. 1990). En el fenómeno hidrofóbico, las moléculas no polares expuestas del microorganismo tenderán a asociarse con moléculas no polares del sustrato en vez del agua.

Las estructuras más comunes que contribuyen en la hidrofobicidad son moléculas proteicas, que tienen al descubierto dominios no polares, conferidos por los grupos R de los aminoácidos hidrofóbicos, sin embargo en este fenómeno también están involucrados lípidos e hidratos de carbono con residuos no polares (Doyle 2000).

Ya que la interacción hidrofóbica se favorece en presencia de altas concentraciones de sal (que desplazan el agua que solvata las zonas hidrofóbicas), la hidrofobicidad de la superficie celular de microorganismos, puede ser estudiada por el método de agregación celular por sulfato de amonio (SAT) (Lindahl *et al.* 1981), en el que la hidrofobicidad relativa puede ser determinada por las concentraciones de sulfato de amonio requerida para precipitar la célula (bajas concentraciones de sal es equivalente a una mayor hidrofobicidad).

Existen métodos más sensibles que SAT (*i.e.* adhesión microbiana a hidrocarburos, determinación del ángulo de contacto, adhesión microbiana a microesferas hidrofóbicas y cromatografía por interacción hidrofóbica, entre otros) sin embargo, SAT es relativamente sencillo por lo que es comúnmente utilizado (Doyle 2000).

1.2.2. Métodos para evaluar las interacciones adhesina-receptor

Existen varios métodos para estudiar las interacciones entre adhesinas y receptores. El método más simple consiste en llevar a cabo la adhesión del microorganismo a partículas con una superficie artificialmente cubierta y observar la agregación o aglutinación. Otro método consiste en estudiar la adhesión del microorganismo marcado con fluorescencia, biotina, o radioactividad a células cultivadas *in vitro*, proteínas extracelulares o proteínas presentes en el compuesto de interés. Como modelo para los estudios de adhesión *in vitro* de microorganismos a epitelio del tracto gastrointestinal del humano, se utilizan líneas celulares tales como Caco-2 de epitelio intestinal (Kimoto *et al.* 1999), HT-29 de carcinoma de colon (Adlerberth *et al.* 1996), HT-29-MTX de carcinoma de colon secretoras de moco (Tuomola 1999), KATO III y HeLa S3 de cáncer gástrico y cervicouterino respectivamente (Guzmán-Murillo *et al.* 1997) o bien moco gastrointestinal (Ouwehand *et al.* 1999a) o proteínas presentes en éste (Ascencio *et al.* 1998).

En este tipo de ensayos, las condiciones experimentales pueden ser fácilmente controladas y la adhesión fácilmente cuantificada. La inhibición de la adhesión a preparaciones celulares, utilizando residuos de carbohidratos apropiados como inhibidores, también es un método utilizado que evalúa la especificidad de las lectinas (Logan 1996).

Variables en el diseño experimental para estudiar interacciones adhesina-receptor

Muchos factores influyen en la evaluación de la interacción adhesina-receptor. La composición del medio de cultivo, pH o la presencia de agentes antimicrobianos, puede afectar la expresión de adhesinas funcionales por lo que la afinidad de la adhesión podría variar modificando el número total de microorganismos adherentes. Por otro lado, Vázquez-Juárez *et al.* (1993), Savage (1992) & Cook *et al.* (1988) observaron que la expresión de factores de colonización se ve influenciada por la fase de crecimiento del microorganismo. Sin embargo, algunas cepas presentan una adhesión mayor en fase exponencial mientras que otras cepas en fase estacionaria por lo que no es posible generalizar en que estadio de crecimiento se presentará una mayor adhesión, sino que esto dependerá de la cepa estudiada y la naturaleza del receptor. Por lo tanto, no existen parámetros establecidos que permitan evaluar la adhesión, sino que habrá que monitorear y controlar cada una de las variables para el diseño de un modelo adecuado para evaluar la adhesión y su especificidad (Logan 1996).

1.3. Levaduras

1.3.1. Impacto biotecnológico

Las levaduras son microorganismos eucariontes, generalmente denominados como inocuos. Actualmente, los avances científicos y tecnológicos, han permitido que el impacto de las levaduras vaya mas allá de las aplicaciones tradicionales como la producción de bebidas alcohólicas y alimentos, alcanzando ahora el sector salud y otras áreas biotecnológicas económicamente redituables ya que, tanto la célula como tal, así como sus componentes celulares y sus productos metabólicos son una alternativa como fuente proteica, vitaminas, factores de crecimiento e inmunomoduladores.

S. cerevisiae ha sido tecnológicamente muy útil, siendo una de las especies más explotadas en la industria. Sin embargo, algunas levaduras no convencionales con un estatus denominado como inocuo (*i.e. Kluyveromyces sp.*), están jugando un papel importante en los procesos biotecnológicos modernos, especialmente para la expresión de proteínas recombinantes, elaboración de biofármacos (Walker 2000) y vacunas (Schreuder *et al.* 1996).

1.3.2. Levaduras Marinas

Debido a que las levaduras tienen la capacidad de metabolizar diferentes substratos presentes en diversos hábitats, se les ha identificado y aislado de diferentes ambientes incluyendo el marino (Phaff 1990). Se denominan levaduras marinas a aquellas capaces de construir y perpetuar poblaciones en el

medio marino o aquellas en las que su condición óptima de reproducción y crecimiento ocurren en el mar o a la concentración normal de sales del mar, siendo de 2.4-4.0% de cloruro de sodio principalmente (Kohlmeyer *et al.* 1979).

Hernández-Saavedra *et al.*, reportaron que especies de levaduras marinas como *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces hansenii*, *Cryptococcus albidus* var. *Albidus* y *Rhodotorula mucilaginosa* toleran amplios rangos de salinidad y especies del género *Candida* y *Udeniomyces* presentan una excelente capacidad de adaptación a ambientes con diferente salinidad, temperatura y concentración de oxígeno (Hernández-Saavedra *et al.* 1995a; Hernández-Saavedra *et al.* 1995b; Hernández-Saavedra *et al.* 1992). Esta característica de gran capacidad de adaptación a un amplio rango de variables del medio y su simple forma de cultivo las vuelve atractivas para su aplicación en los procesos biotecnológicos.

La aplicación de levaduras marinas se había limitado a ambientes marinos como fuentes de proteína y probióticos para camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Aguirre 1990), como fuentes de poliaminas en peces (Tovar *et al.* 2000) y como agentes de biodegradación (Rhishipal *et al.* 1998), sin embargo, ahora sus aplicaciones van más allá de solo acuicultura y eventos de biorremediación. García-González *et al.* (1999), evaluaron el efecto de la aplicación de superóxido dismutasa aislada de una cepa de levadura marina (*Debaryomyces hansenii*) encontrando un efecto antiinflamatorio y una disminución en la incidencia e

intensidad de la artritis en modelos animales con inflamación y artritis inducida. Posteriormente la SOD aislada de esta misma fuente se utilizó para la elaboración de cremas comerciales con efectos antiinflamatorios (García-González 1998).

1.3.3. Pared celular de levaduras

Las biomoléculas presentes en la pared celular le brindan a la célula protección física, estabilidad osmótica, soporte enzimático, permeabilidad selectiva y la habilidad de interactuar y/o adherirse a otras células u otras superficies (Stratford 1994).

En su totalidad, la pared celular de levaduras esta formada por un 90% de polisacáridos, 5-10% de proteínas y un porcentaje muy pequeño de lípidos (Moradas-Ferreira *et al.* 1994).

Los polisacáridos de la pared celular están conformados por β -glucanos que son polímeros constituidos por residuos de glucosa y en las levaduras se presentan glucanos con enlaces exclusivamente de tipo β -(1,3) y β -(1,6) siendo los primeros los que forman más de la mitad de la pared celular; quitina, que es un polisacárido formado por cadenas lineares de N-acetylglucosamina enlazadas por uniones β -(1,4); y mananas que en su mayoría se encuentran unidas a una fracción peptídica formando glicoproteínas (Stratford 1994).

Las proteínas que conforman la pared celular son principalmente aquellas asociadas a los polímeros de manosa. Algunas proteínas, además de formar parte integral de la pared celular, poseen actividad enzimática y algunas otras están involucradas en adhesiones celulares (Smits *et al.* 1999). Los lípidos presentes son básicamente ácidos grasos, fosfolípidos y grasas neutras (Hernández-Saavedra 1991).

Estudiar la identidad y distribución de los componentes de la pared celular de levaduras es importante para entender sus funciones estructurales, así como su papel funcional en las interacciones con el huésped. Estos componentes pueden ser aislados por métodos físicos o químicos. Físicos como el uso de perlas de vidrio o sonicado, seguido por centrifugación diferencial del homogenizado para separar los componentes de la pared de otros componentes citoplasmáticos. Entre los métodos químicos se puede utilizar el tratamiento de la célula con β -mercaptoethanol (β -ME), duodecil sulfato de sodio (SDS), o dithiothreitol (DTT) y combinarlos con enzimas como liticasa o proteasa (Casanova *et al.* 1991). Una vez aislados los componentes solubles, se ha utilizado electroforesis en gel de poliacrilamida para analizarlos.

1.4. *Helicobacter pylori*

1.4.1. Epidemiología

El *H. pylori* es un bacilo espiralado Gram negativo, patógeno del humano, que ha desarrollado sofisticadas estrategias para colonizar principalmente las células epiteliales que recubren el antro del estómago. Su infección genera en el 100 % de los casos gastritis crónica la cual representa un mayor riesgo para el desarrollo de úlcera péptica, cáncer gástrico, linfoma gástrico asociado a las mucosas (Sipponen *et al.* 1985) y en algunos casos, después del tratamiento de la infección, se puede desarrollar enfermedad de reflujo gastroesofágico (Xia *et al.* 1998).

En la última década ha quedado patente que la infección por *H. pylori* es una de las más prevalentes a nivel mundial: aproximadamente el 50% de la población adulta de países industrializados, y 90% en países del tercer mundo se encuentra infectada (Farthing 1998).

Muchos aspectos de la epidemiología de la infección por *H. pylori* son tópicos de gran controversia, entre ellos los mecanismos de transmisión, sus reservorios y la predisposición de adquirir la infección de acuerdo a los factores genéticos. Sin embargo está bien establecido que la mayor prevalencia de la infección se observa en grupos de bajo nivel socioeconómico y en adultos afroamericanos e hispanos (Parsonnet 1998). También se sabe que *H. pylori* puede llegar a colonizar la mucosa gástrica desde la niñez y se sugiere que sin la ayuda de

fármacos las defensas del huésped son incapaces *per se* de contrarrestar la infección, de tal forma que una vez adquirida ésta persistirá a lo largo de la vida del individuo (Buck 1990).

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en distintas localidades urbanas y rurales de nuestro país, revelan que, al menos un 66% de la población presenta infección por esta bacteria, siendo la edad el más grande factor de riesgo, jugando un papel igualmente importante el bajo grado de educación y nivel socioeconómico. Por otro lado, la relación entre la infección por *H. pylori* y el cáncer gástrico en la ciudad de México indica la presencia de la bacteria en el 87.2% de los casos estudiados, y se calcula que con la erradicación de la infección en la población general la incidencia de cáncer gástrico podría reducirse hasta en un 26.6% (López-Carrillo *et al.* 1997).

1.4.2. Patogénesis y virulencia de *Helicobacter pylori*

Los mecanismos de patogénesis del *H. pylori*, están relacionados con los siguientes factores:

a) Movilidad. *H. pylori* ha desarrollado un aparato flagelar muy eficiente que le brinda una gran motilidad, de esta forma, puede ubicarse rápidamente dentro de la capa de moco que recubre las células epiteliales de la mucosa gástrica y duodenal, o migrar hacia el interior de la mucosa y colonizar al hospedero, situándose entre las uniones intracelulares lo cual impide que sea eliminada por el huésped. Ha quedado establecido que mutantes aflagelados muestran que la

movilidad se correlaciona con una pérdida de virulencia en modelos animales (Schauer *et al.* 1994).

b) Adherencia a mucosa gástrica. En general, la adhesión es ventajosa para la supervivencia del patógeno y para favorecer la liberación de ureasa, VacA y otros metabolitos tóxicos, directamente sobre células epiteliales, causando daño del tejido durante los eventos iniciales de la infección (Suervaum *et al.* 1995).

La adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica esta mediada por una serie de complejas interacciones entre las moléculas expuestas en la superficie tanto de la bacteria como de las células del huésped. Con el tiempo se han identificado las moléculas de superficie de *H. pylori* involucradas en los eventos de adhesión. Evans *et al.* (1988), identificó una lectina de superficie de 20 KDa que reconoce ácido siálico específicamente la configuración NeuAC(α 2-3)Gal. También se han identificado proteínas que se unen al antígeno Lewis B, presentes en las células gástricas epiteliales (Borén *et al.* 1993) y adhesinas con afinidad para glicosaminglicanos como heparina y haparán sulfato (Ascencio *et al.* 1993; Ascencio *et al.* 1995; Ruiz-Bustos *et al.* 2001). Por otro lado, estructuras como polisacáridos sulfatados (LPS) y residuos de manosa presentes en la superficie de la bacteria, pueden ser reconocidos en su superficie por proteínas expuestas en las células del huésped (Wadström *et al.* 1996).

c) Actividad mucolítica. Una de las características más relevantes de ésta bacteria es la gran actividad de ureasa, enzima que hidroliza la urea en amoníaco y agua, con una constante de disociación muy baja y alta afinidad por el sustrato, proporcionando un entorno casi neutro para que el germen pueda crecer, reproducirse y sobrevivir en el ambiente hostil del lumen gástrico mientras alcanza la capa de moco y células epiteliales en donde las condiciones son más favorables. La presencia de urea y amonio se han asociado directamente con daño o muerte celular promoviendo la liberación de citocinas y una respuesta inflamatoria (Smoot *et al.* 1990; Kawano *et al.* 1992). Por otro lado, las altas concentraciones de amonio sobre la mucosa gástrica tienen, a su vez otros efectos nocivos de gran importancia. En primer lugar la acumulación de éste compuesto favorece la retrodifusión de iones de hidrógeno hacia el epitelio y, por otra parte, lesiona la integridad de la capa de moco.

H. pylori sintetiza enzimas como lipasas, fosfolipasa A y proteasas que contribuyen a destruir glicoproteínas (mucinas) del moco gástrico. Debido a que tales mucinas proteolíticamente degradadas pierden su viscosidad normal y propiedades gelificantes, se daña la integridad de la mucosa y se compromete el perímetro de defensa del tejido gástrico (Piñol *et al.* 1999).

d) Toxina vacuolizante VacA y gen *cagA*. Algunas cepas de *H. pylori* expresan una citotoxina (VacA) que causa una vacuolización citoplasmática en cultivos celulares inhibiendo la proliferación celular y ocasionando la muerte de

células epiteliales. La citotoxina corresponde a una fracción proteica de 87 KDa, cuyo genotipo ha sido denominado *vacA*. Otra proteína (de 120 a 128 KDa) asociada a la expresión de la citotoxina, y codificada por el gen *cagA*, denominada como proteína asociada a la citotoxina no presenta toxicidad por sí misma, pero parece intervenir en la expresión de la toxina vacuolizante (Parsonnet 1998). Se configura así un genotipo, por el que ambos genes deberían estar expresados para dar lugar a un fenotipo de bacteria patógena.

1.4.3. Aspectos inmunológicos

En la etapa en la que el microorganismo llega y penetra a la mucosa gástrica donde se asienta y se multiplica, se estimula una respuesta inmunológica local, expresada en un aumento de inmunoglobulina A (IgA) secretora contra sustancias tóxicas que la bacteria posee o libera (*i.e.* polisacárido, citotoxina vacuolizante) (Piñol *et al.* 1999).

La persistencia del *H. pylori* en la mucosa gástrica es un fenómeno que se asocia con cambios histopatológicos y la presencia de infiltrado inflamatorio de tipo crónico. La infección por *H. pylori* produce un daño en el epitelio mucosecretor gástrico seguido de la permeación de células inflamatorias, especialmente linfocitos, polimorfonucleares y macrófagos. Las células epiteliales, tras la adhesión bacteriana, liberarán interleucina-8 que junto con factores citotóxicos de la bacteria, van a favorecer la activación de los polimorfonucleares y la consiguiente liberación de proteasas y metabolitos

reactivos de oxígeno. Esta situación provoca un estallido oxidativo de carácter inflamatorio, que podría dañar el ADN e inducir mutaciones en las células germinales mucosas, que de no repararse culminaría con la aparición de cáncer gástrico (Drake *et al.* 1995; Nguyen *et al.* 1992; Shiao *et al.* 1994).

1.4.4. Tratamiento

a) Tratamiento tradicional. Los regímenes para controlar infecciones de *H. pylori* han evolucionado. En un principio se inició con una monoterapia, pero como la presencia de esta bacteria en mucosa gástrica esta estrechamente relacionada con el desarrollo de úlcera péptica, en la terapia actual, se incluyen antibióticos (metronidazol, tetraciclina, claritromicina o amoxicilina), así como medicamentos para disminuir la secreción de ácido gástrico (cimetidina, ranitidina, famotidina y nizatidina), inhibidores de la bomba de protones (omeprazol y lansoprazol) y un protector del revestimiento gástrico (subsalicilato de bismuto) (Harris 1998).

En la actualidad, la forma más eficaz de tratar el problema consiste en administrar durante dos semanas lo que se conoce como terapia triple o cuádruple. Estas exigen tomar uno o dos antibióticos para inhibir la bacteria, un supresor de la secreción de ácido y un protector del revestimiento gástrico. Ambos regímenes implican dosis altas (lo que al paciente le puede resultar complicado porque exige tomar hasta 20 pastillas al día), durante periodos de

tiempo prolongados (dos semanas aproximadamente), elevándose el costo del tratamiento y generando efectos secundarios (Harris 1998).

In vitro la bacteria parece ser muy sensible a un gran número de antibióticos, lo que sugiere que es un organismo cuya infección es fácil de controlar; sin embargo *in vivo*, debido a su hábitat la bacteria no es un blanco fácil. Sumado a esto, *H. pylori* se ha vuelto rápidamente resistente ante la mayoría de los antibióticos utilizados para su tratamiento (Bazzoli *et al.* 1999; Mégraud 1998) por lo que el éxito del tratamiento tradicional varía entre un 28 y 95%.

b) Propuestas de tratamientos alternativos. La terapia ideal para controlar infecciones por *H. pylori* debe ser simple, segura, que brinde un 100% de eficacia y que sea de bajo costo; sin embargo el régimen del tratamiento ideal no ha sido definido, aunque se han descrito distintas propuestas alternativas al antibiótico que están en desarrollo con el fin de prevenir, disminuir y controlar la infección. Entre estas propuestas, se encuentra el desarrollo de vacunas de segunda generación (Kleanthous *et al.* 1998; Ruiz-Bustos Bustos *et al.* 2000; Sutton *et al.* 2000). Por otro lado ácidos grasos poliinsaturados (linolénico omega-3 principalmente), han mostrado ejercer *in vitro* una actividad antibacteriana contra *H. pylori* al lisar aparentemente su pared celular (Thompson *et al.* 1994).

También se han propuesto compuestos que bloquean la interacción entre patógeno-huésped al inhibir el reconocimiento adhesina-receptor (Lambert *et al.* 1996). Éstos compuestos son principalmente carbohidratos componentes de membranas celulares como ácido siálico, compuestos sulfatados como heparán sulfato que es un glicosaminoglicano de superficie celular que participa en funciones de reconocimiento (Strayer 1995) y compuestos fucosilados de tal forma que compitan por adhesinas del patógeno o receptores celulares quedando bloqueadas para una posterior adhesión. Este conocimiento ha derivado en el estudio de productos que pueden poseer sustancias activas y efectivas en el tratamiento de *H. pylori*. Resultados exitosos *in vitro* se han obtenido al tratar de bloquear la adhesión con polisacáridos sulfatados extraídos de microalgas (Guzmán-Murillo 1997), y componentes de la leche bovina que logran inhibir significativamente la adhesión de la bacteria a compuestos como mucinas (Hirno *et al.* 1998) y antígeno Lewis B (Yoshiyuki *et al.* 1999).

Otra propuesta profiláctica y de tratamiento en la infección de *H. pylori* es la administración de bacterias probióticas. Estudios han demostrado que bacterias ácido lácticas y productos de su metabolismo como ácido láctico, acético y peróxido de hidrógeno, ejercen una actividad contra *H. pylori in vitro* (Yehonhee *et al.* 1999; Midolo *et al.* 1995; Coconnier *et al.* 1998) e *in vivo* (Miccheti *et al.* 1999; Aiba *et al.* 1998; Coconnier *et al.* 1998 & Kabir *et al.* 1997).

2. HIPÓTESIS

Las levaduras marinas y/o sus compuestos celulares tales como proteínas externas de pared celular, poseen propiedades probióticas, que al competir por receptores análogos inhiben la adhesión de *Helicobacter pylori* a células epiteliales *in vitro*, ejerciendo la posibilidad de inhibir una colonización posterior y las subsecuentes lesiones gástricas *in vivo*.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar las características probióticas de levaduras marinas para prevenir y/o controlar infecciones producidas por *Helicobacter pylori*.

Objetivos Especificos

Medir la hidrofobicidad celular de diferentes especies de levaduras marinas.

Identificar lectinas de superficie de diferentes especies de levaduras marinas.

Identificar la especificidad de lectinas expuestas asociadas a *K. marxianus*.

Evaluar el grado de adhesión de levaduras marinas a líneas celulares HeLa S3 y KATO III.

Determinar la especificidad de la adhesión de levaduras marinas a células HeLa S3 y KATO III.

Evaluar la actividad que tienen los componentes extracelulares de levaduras marinas sobre la adhesión de *H. pylori* a líneas celulares de humano HeLa S3 y KATO III.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Microorganismos, condiciones de cultivo y almacenamiento

a. Levaduras

Las levaduras utilizadas en este estudio fueron aisladas de ambientes marinos y pertenecen a la colección de levaduras del CIBNOR. Las especies estudiadas fueron *Aureobasidium pullulans*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula holstii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Leucosporidium scottii*, *Pichia philogaea*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorua mucilaginosa* 002, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* cbs 7764 y *Udeniomyces puniceus*.

Las cepas de levaduras se almacenaron a -80°C en medio peptona glucosa (YPG) (Apéndice 1.a.), conteniendo 15% (v/v) de glicerol. Se cultivaron en YPG, agar 2% (p/v) y se incubaron a temperatura ambiente por 48 horas. Para utilizarse en los bioensayos las levaduras se ajustaron espectrofotométricamente a una densidad óptica (D.O.) de 1.0 a 540nm.

b. Cepas de *Helicobacter pylori*

Las cepas de *H. pylori* utilizadas en este estudio fueron amablemente donadas por Prof. Ho Bow y el Hospital de la Universidad Nacional de Singapur. Las cepas 55, 116, 166, 275, 286 y 291 fueron aisladas de pacientes con enfermedad esofágica de reflujo, 1126 de paciente con úlcera péptica, RH54 de

paciente con cáncer gástrico, 51932 y 51110 fueron adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las cepas de *H. pylori* se almacenaron a -80°C en infusión de cerebro corazón (BHI), (Apéndice 1.b.1.), conteniendo 15% (v/v) de glicerol. Las cepas se cultivaron en medio selectivo chocolate agar, conteniendo 5% (v/v) sangre de caballo (Apéndice 1.b.2.) y se incubaron a 37°C durante 3 ó 4 días bajo condiciones microaerófilas (5% O_2 , 10% CO_2 y 85% N_2).

4.2. Evaluación de la hidrofobicidad celular, identificación y determinación de la especificidad de lectinas asociadas a levaduras marinas

4.2.1. Ensayo de agregación celular por saturación con sulfato de amonio

El ensayo se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Ljungh *et al.* (1986). Las diferentes cepas de levaduras se resuspendieron en 500 μL de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 (PBS) (Apéndice 2.a.1), se lavaron y el pellet se resuspendió en 500 μL de la misma solución. En un portaobjeto, 10 μL de sulfato de amonio a distintas molaridades (4 M, 2 M, 1 M y 0.2 M) se mezclaron con un volumen igual de la suspensión de levadura. Los controles negativos de cada levadura se prepararon mezclando 10 μL de PBS en vez de sulfato de amonio. Después de 2 minutos, se registró el grado de agregación visible con valores arbitrarios de 3 para una agregación muy positiva, ligeramente positiva con valor de 1 y de 0 para una agregación negativa.

4.2.2. Ensayo de agregación de levaduras con neoglicoproteínas inmovilizadas en esferas de látex (Ensayo de agregación estándar)

El ensayo se realizó de acuerdo al método descrito por Naidu *et al.* (1988). 10 μ L de neoglicoproteínas inmovilizadas en perlas de látex (Apéndice 3) se colocaron en un portaobjeto, se tomó una alícuota de levadura fresca y se mezcló con las microesferas. Después de dos minutos se evaluó cualitativamente la reacción de agregación y los resultados se registraron con valores de 3 para una agregación muy positiva, ligeramente positiva con valor de 1 y de 0 para una agregación negativa.

4.2.3. Ensayo de inhibición de la agregación levadura-neoglicoproteína utilizando compuestos glicosídicos como inhibidores

El ensayo de la inhibición de la agregación de levaduras se realizó siguiendo el protocolo descrito por Ascencio *et al.* (1990). La actividad de la agregación de las microesferas se bloqueó con gelatina soluble (en una concentración final de 1 mg/ml), carbohidratos (N-acetyl-ácido neuramínico 4 mg/mL (NANA), N-acetyl glucosamina 1M, N-acetyl galactosamina 4 mg/mL, N-acetyl-glicolin ácido neuramínico 0.5 mg/mL), glicoconjugados (asialofetaina 4 mg/mL, lactoferrina 4 mg/mL, orosomucoide 10 mg/mL, fetuina 4 mg/mL, mucina 4 mg/mL, keratina 1mg/mL, ácido hialurónico 4 mg/mL) o polisacáridos sulfatados (heparán sulfato 1 mg/mL, dextrán sulfato 4 mg/mL, condroitín sulfato 4 mg/mL, carragenano 4 mg/mL, N-acetyl glucosamina SO₄ 10 mg/mL). 100 μ L del inhibidor fueron preincubados con el mismo volumen de una suspensión de levadura fresca (con

una densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 540nm) por una hora a 37°C y se mezclaron con las neoglicoproteínas inmovilizadas en las microesferas de látex. Los resultados de las agregaciones fueron registrados de la misma manera que en el ensayo de agregación estándar.

4.2.4. Efecto de tratamiento químico, físico y enzimático en el reconocimiento de neoglicoproteínas por *K. marxianus*

Para todos los tratamientos *K. marxianus* se resuspendió en PBS y se ajustó a una densidad óptica de 1 leída una longitud de onda de 540 nm, se lavó y resuspendió en 1 mL de solución correspondiente cada tipo de tratamiento.

Químico. Para los tratamientos químicos se resuspendieron en PBS con pH 2, 4, 6, 8 y 10; NaCl 0.01, 0.1 y 1M; para el tratamiento con ácido sulfúrico las levaduras se resuspendieron en PBS y se agregó H₂SO₄ para obtener una molaridad final de 0.75M, se incubaron durante 1 hora. Se lavaron y resuspendieron lavadas en PBS para los ensayos posteriores.

Enzimático. Las levaduras fueron resuspendidas en PBS conteniendo 1mg/mL de proteinasa K. Se incubaron durante 1 hora a 37°C, se lavaron y resuspendieron en PBS.

Físicos. Las levaduras fueron resuspendidas en PBS e incubadas durante 20 minutos a 37, 60, 80 y 100°C.

Las levaduras tratadas se mezclaron con las neoglicoproteínas siguiendo el mismo protocolo descrito para el ensayo de agregación estándar.

4.2.5. Electroforesis & Western blot de proteínas de superficie de *K. marxianus* utilizando como sonda neoglicoproteínas marcadas con biotina

a. Extracción de proteínas de superficie

Extracción con perlas de vidrio o sonicado. Las levaduras se resuspendieron en PBS, fueron lavadas y sonicadas (equipo Cole Parmer) en baño de hielo a 80 Watts por 45 ciclos de 30 segundos cada uno, o fueron agitadas en vórtex durante 5 ciclos de 1 minuto cada uno con perlas de vidrio (diámetro 425-600 microns). Se centrifugó a $250 \times g$ durante 20 minutos, se recuperó el sobrenadante y se dializó en membranas Spectra/Por mwco 6000-8000, contra PBS durante 48 horas a 4°C y posteriormente se realizó la cuantificación de proteínas, determinada con el reactivo de Bio-Rad Protein Dye (Apéndice 4) y se almacenaron a 4°C hasta su uso.

Extracción por β -ME. La extracción de componentes de pared celular de levaduras con β -ME se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Casanova *et al.* (1991). Las levaduras se lavaron y el pellet fue resuspendido en 30 ml de una solución conteniendo β -ME al 1% (v/v) (165 mL agua destilada, 1.8 g bicarbonato de amonio, pH 8.6, 1% β -ME) durante 30 minutos. Se centrifugó, se

recuperó el sobrenadante y se congeló a -20°C para posteriormente liofilizar, cuantificar proteínas y ser utilizadas en estudios posteriores.

b. Análisis electroforético (SDS-PAGE) y Western Blot

Muestras de extractos de proteínas de *K. marxianus* obtenidas por β -ME, fueron tratadas por 5 minutos a 100°C en solución desnaturizante con SDS y β -ME, cargadas en geles discontinuos de poliacrilamida al 12 % (Laemmli 1970). Se corrió en condiciones desnaturizantes a 75 Volts por 90 minutos. El gel se tiñó con azul de Coomassie o se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P) utilizando un sistema semihúmedo por 90 minutos a 200 mA y como solución de transferencia 48 mM Tris, 39 mM glicina (pH 9.2), 20% metanol. Posteriormente la membrana fué teñida con rojo de Ponceau por 1 minuto, desteñida con agua destilada y bloqueada con 5% (p/v) de leche descremada durante 90 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween 20 al 0.005% (PBS-Tween) y se incubó con la neoglicoproteína marcada con biotina N-hydroxysuccinimida (Apéndice 5), disuelta en PBS pH 7.2 (1:500) durante 60 minutos. La membrana fué lavada 3 veces con PBS-Tween e incubada durante 60 minutos con POD-estreptavidina diluida en PBS (1:5000). Por último la membrana se lavó 3 veces con PBS-Tween y se reveló utilizando 4-Chloronaphtol (0.06 g 4-Chloronaphtol, 20 ml metanol frío, 100 ml de PBS, 60 μL . H_2O_2) como sustrato. Los pesos moleculares de las proteínas fueron calculados por regresión lineal en el programa Quantitative One.

4.3. Evaluación del grado de adhesión y determinación de la especificidad de la adhesión de levaduras a células epiteliales

Cultivos de líneas celulares HeLa S3 y KATO III

Líneas celulares HeLa S3 y KATO III aisladas de carcinoma gástrico humano y carcinoma epitelial respectivamente, fueron compradas en ATCC. Se iniciaron los cultivos con una densidad de 2.1×10^6 células/mL para HeLa S3 y 1.4×10^6 células/mL para Kato III en frascos para cultivo celular de 25 cm^2 con 3 ml medio RPMI-1640 completo (Apéndice 1.c.). Los frascos se incubaron a 37°C (95% de humedad relativa y 5% CO_2). Las células se lavaron con un regulador salino de fosfatos pH 7.2 (PBS A) (Apéndice 2.a.2.). Para ser removidas las células fueron tratadas con 1 mL de tripsina (0.25% en solución modificada de Hank's) por 5 minutos a 37°C . Las células tripsinizadas fueron lavadas con PBS A y resuspendidas en 10 mL de medio de cultivo fresco y posteriormente transferidas a una nueva botella de cultivo de 75 cm^2 . El medio de las células fue reemplazado por medio fresco aproximadamente cada 3 días para HeLa S3 y 5 días para Kato III hasta la obtención de cultivos semiconfluentes (Guzmán-Murillo 1997).

Para los bioensayos de adhesión se utilizaron placas de 96 pozos y en cada pozo se incubaron 100 μL de una suspensión de 4×10^7 células/mL en medio RPMI-1640 completo. Las placas se incubaron a 37°C hasta la obtención de cultivos semiconfluentes para cada línea celular (Guzmán-Murillo 1997).

Posteriormente las células se fijaron con 100 μ L de metanol frío y se bloquearon con 100 μ L de PBS-BSA 1% (p/v) incubando por 30 minutos a 37°C, se lavaron 3 veces con PBS-Tween y almacenaron a 4°C hasta su uso para los subsecuentes ensayos (Guzmán-Murillo 2001).

4.3.1. Determinación espectrofotométrica de la adhesión de levaduras marcadas con biotina a células epiteliales HeLa S3 y KATO III

Los ensayos de adhesión se realizaron de acuerdo al método de Guzmán-Murillo-Murillo *et al.* (2001). Cultivos celulares semiconfluentes (~ 0.5 a 1.0×10^5 células por pozo) crecidos en placas de 96 pozos se incubaron 1 hora a 37°C con 100 μ L de levadura marcada con biotina N-hydroxysuccinimida (Apéndice 6). Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween para remover levaduras no adheridas. Cien μ L de peroxidasa de rábano (POD) conjugada con estreptavidina (diluida 1:2000 en PBS) fueron incubadas en cada pozo por 90 minutos a 37°C. Después de lavar las placas 3 veces con PBS-Tween se agregó a cada pozo 100 μ L de 4mM o-phenylenediamine (OPD) en solución amortiguadora de citratos (Apéndice 2.b.). Las placas se incubaron en la oscuridad por 20 minutos. Se paró la reacción por la adición de 100 μ L de 2 M H_2SO_4 y el desarrollo de color se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro Bio-Rad 3550-UV. Se realizaron 3 réplicas con un triplicado cada una. Los resultados se reportaron en unidades de densidad óptica.

4.3.2. Efecto de diferentes carbohidratos sobre la adhesión de levaduras a células epiteliales HeLa S3 y KATO III

1 mL de levadura marcada con biotina (Apéndice 6) se incubó por 60 minutos a 37°C con NANA, N-acetyl galactosamina, dextrán sulfato, dextrán, fucoidán, carragenano, mucina, gelatina (a una concentración final de 1 mg/mL), N-acetyl galactosamina, galactosa, glucosa, manosa, fucosa, sacarosa y maltosa (a una concentración final de 0.1M). Se incubaron 100 µl de cada suspensión en pozos con cultivos celulares semiconfluentes (~0.5 a 1.0 X 10⁵ células por pozo) de células HeLa S3 y KATO III, por 1 hora a 37°C. Se lavó tres veces con PBS-Tween y se siguió el protocolo descrito para el ensayo de adhesión a partir de la incubación con POD. Como control se realizó la adhesión reemplazando el inhibidor por PBS. Se realizaron 3 réplicas con un triplicado cada una. Los resultados se reportan en porcentaje de adhesión relativa respecto al control.

4.4. Evaluación de la actividad de los componentes extracelulares de levaduras marinas sobre la adhesión de *H. pylori* a células epiteliales de humano

4.4.1. Ensayo de inhibición de la adhesión de *H. pylori* por componentes de superficie de levaduras marinas

Para el ensayo de inhibición de la adhesión de *H. pylori*, 50 µL de una suspensión de proteínas de superficie celular (obtenidas por sonicación) de *K. marxianus*, *L. scottii*, *H. holstii* y *S. cerevisiae* se preincubaron en placas semiconfluentes de células HeLa S3 y KATO III, por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100 µL de una suspensión de *H. pylori* (cepas 55,

116, 166, 275, 286, 291, 51932, 51110, RH54 y 1126) biotinado (Apéndice 6) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween y se continuó con el protocolo de adhesión a partir de la incubación con POD.

4.4.2. Ensayo de desplazamiento de *H. pylori* previamente adherido a células HeLa S3 y KATO III, utilizando componentes de superficie de levaduras marinas

100 µL de una suspensión de *H. pylori* 51110 y 51932, fueron incubados con células HeLa S3 y KATO III durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se agregaron 100 µL de componentes de pared celular de *H. holstii*, *K. marxianus*, *L. scottii*, *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae*. Se incubó durante 1 hora a 37°C, se lavaron las placas tres veces con PBS-Tween y se continuó con el protocolo de adhesión a partir de la incubación con POD.

4.5. Tratamiento estadístico de datos

Para analizar estadísticamente los resultados en los ensayos de adhesión, se obtuvo la media aritmética ± el error estándar de cada grupo de datos, se realizó un análisis de varianza y prueba de t para comparaciones múltiples. Considerándose como nivel de significancia estadística $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Identificación de hidrofobinas y lectinas en levaduras marinas

La relevancia de estos ensayos radican en el estudio de la hidrofobicidad celular y el tamizaje de lectinas asociadas extracelularmente a levaduras marinas con el fin de definir posibles factores de adhesión de levaduras y el efecto de sus componentes celulares sobre la adhesión de *H. pylori* a células epiteliales.

Cabe mencionar que las levaduras resuspendidas en PBS, se observaron bajo el microscopio para determinar el estado de coagregación natural, a excepción de *Kluyveromyces marxianus* (la cual presentaba una actividad floculante aun, al haber sido recientemente resuspendida), todas las levaduras se observaban como células independientes o agrupaciones de 2 a 4 células (Anexo 1).

5.1.1. Determinación del grado de hidrofobicidad de levaduras mediante ensayo de agregación con sulfato de amonio

En el presente estudio la mayoría de las levaduras resultaron ser altamente hidrofóbicas, excepto *Hansenula holstii*, *Leucosporidium scottii* y *Rhodotorula mucilaginosa* en las cuales la agregación fue dependiente de la concentración de sulfato de amonio. *Debaryomyces melissophilus*, *K. marxianus*, *S. cerevisiae* cbs 7764 y *U. puniceus* mostraron una actividad floculante (Tabla 1).

5.1.2. Ensayo de agregación de levaduras con neoglicoproteínas inmovilizadas en esferas de látex

Para identificar lectinas expuestas en la superficie celular de las levaduras marinas, se realizó un ensayo de agregación de partículas utilizando microesferas de látex unidas a neoglicoproteínas. A excepción de *L. scottii*, las levaduras presentaron una reacción de agregación positiva con respecto al control cuando se combinaron con neoglicoproteínas de galactosa, glucosa, fucosa, N-acetyl galactosamina, N-acetyl glucosamina y N-manopiranososa. *K. marxianus* mostró una actividad de autoagregación en todos los casos incluyendo los controles y *L. scottii* solo mostró una reacción ligeramente positiva para N-acetyl glucosamina (Tabla 2).

5.1.3. Caracterización de la agregación neoglicoproteína-levadura

5.1.3.1. Inhibición de la agregación neoglicoproteína-levadura

Con el fin de identificar compuestos que son reconocidos por lectinas asociadas a la pared celular de levaduras, se observó el efecto de diferentes compuestos glicosídicos como monosacáridos, polisacáridos, proteoglicanos y glicoproteínas sobre la actividad de reconocimiento de levaduras a neoglicoproteínas. Como modelo de estudio, se seleccionó *K. marxianus*, *R. mucilaginosa* y *S. cerevisiae* cbs 7764. De los utilizados, ningún monosacárido inhibió la agregación, sin embargo, compuestos como dextrán sulfato, fucoidán, carragenano, heparán sulfato, ácido hialurónico, lactoferrina, mucina y asialofetuina fueron carbohidratos

que en común inhibieron el reconocimiento de las neoglicoproteínas por las tres levaduras, mientras que fetuina inhibió solo la actividad de *K. marxianus* y *S. cerevisiae* cbs 7764 (Tabla 3, 4 y 5).

5.1.3.2. Efecto del tratamiento químico, enzimático y físico de *K. marxianus* en el reconocimiento de neoglicoproteínas

Con el fin de entender mejor que tipo de componente celular de la levadura esta involucrada en el reconocimiento hacia diferentes neoglicoproteínas se aplicó a la levadura diferentes tratamientos físicos, químicos y enzimáticos, tomando a *K. marxianus* como modelo. Entre los tratamientos el calentamiento a 80 y 100°C, tratamiento con proteinasa K y H₂SO₄ reducen los valores de reconocimiento hacia la mayoría de los neoglicoproteínas, mientras que los tratamientos de pH, fuerza iónica, calentamiento a 37 y 60°C interfirieron sólo levemente con los valores obtenidos (Tabla 6).

Tabla 1. Hidrofobicidad celular de levaduras marinas

ESPECIE	CONCENTRACION DE SULFATO DE AMONIO				
	4 M	2 M	1 M	0.2 M	CTRL
<i>D. melissophilus</i>	AA	AA	AA	AA	AA
<i>H. holstii</i>	2	2	1	0	0
<i>K. marxianus</i>	AA	AA	AA	AA	AA
<i>L. scottii</i>	3	2	0	0	0
<i>P. philogaea</i>	3	3	2	1	1
<i>R. glutinis</i>	3	3	3	2	2
<i>R. mucilaginoso</i>	2	1	1	1	1
<i>R. mucilaginoso</i> 002	2	1	1	1	1
<i>S. cerevisiae</i>	3	3	3	2	1
<i>S. cerevisiae</i> cbs 7764	AA	AA	AA	AA	AA
<i>U. puniceus</i>	AA	AA	AA	AA	AA

AA autoagregación, 0 agregación negativa, 1 agregación ligeramente positiva, 2 agregación positiva, 3 agregación muy evidente

Tabla 2. Ensayo de agregación de partículas para identificar lectinas expuestas en superficie celular de levaduras marinas, utilizando microesferas de látex unidas a neoglicoproteínas

ESPECIE	PERLAS DE LATEX UNIDAS A -									Esfera sin cubrir
	GAL	GLU	NA GAL	NA GLU	NA MAN	FUC	HEP	BSA	GEL	
<i>A. pullulans</i>	3	3	3	3	3	3	0	0	3	1
<i>D. melissophilus</i>	2	2	2	3	3	3	0	0	0	0
<i>H. holstii</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>K. marxianus</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>L. scottii</i>	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0
<i>P. philogaea</i>	3	3	3	3	3	3	0	0	2	0
<i>R. glutinis</i>	2	2	2	2	2	2	0	1	0	0
<i>R. mucilaginoso</i>	0	2	2	2	2	2	0	0	0	0
<i>R. mucilaginoso</i> 002	3	3	3	1	3	1	0	0	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	3	3	3	3	3	3	0	0	2	2
<i>S. cerevisiae</i> cbs 7764	3	3	3	3	3	3	0	1	2	0
<i>U. puniceus</i>	3	3	3	3	3	3	3	0	3	0

0 agregación negativa, 1 agregación ligeramente positiva, 2 agregación positiva, 3 agregación muy evidente

Tabla 3. Inhibición de la agregación de neoglicoproteína-levadura *Kluyveromyces marxianus*

INHIBIDOR	MICROESFERAS DE LATEX UNIDAS A -								
	GAL	GLU	NA GAL	NA GLU	NA MAN	FUC	HEPARINA	BSA	GEL
CONTROL	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NANA	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NA Gal	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NA Glc	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Galactosa	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Glucosa	3	2	3	3	3	3	0	0	0
Manosa	3	3	3	3	3	2	0	0	0
Fucosa	3	3	2	3	3	3	0	0	0
NA Glu SO ₄	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NA glicolin ácido neuramínico	2	2	3	3	3	3	0	0	0
Dextrán	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Dextrán sulfato	1	2	0	0	2	0	0	0	0
Fucoidán	1	1	0	0	2	0	0	0	0
Carragenano	2	3	2	1	0	0	0	0	0
Condroitin sulfato	3	3	3	2	0	3	0	0	0
Keratina	3	3	3	3	0	3	0	0	0
Heparán sulfato	2	3	3	0	0	1	0	0	0
Acido hialurónico	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Lactoferrina	3	1	0	1	0	3	0	0	0
Fetuina	3	0	0	1	3	3	0	0	0
Mucina	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Asialofetuina	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Orosomucoide	2	2	2	1	2	1	0	0	0
Gelatina	0	0	1	0	0	2	0	0	0

0 agregación negativa, 1 agregación ligeramente positiva, 2 agregación positiva 3 agregación muy evidente

Tabla 4. Inhibición de la agregación de neoglicoproteína-levadura *Rhodotorula mucilaginosa*

INHIBIDOR	PERLAS DE LATEX UNIDAS A -								
	GAL	GLU	NA GAL	NA GLU	NA MAN	FUC	HEPARINA	BSA	GEL
CONTROL	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NANA	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NA Gal	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NA Glc	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Galactosa	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Glucosa	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Manosa	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Fucosa	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NA Glu SO ₄	3	3	3	3	3	3	0	0	0
NA glicolin ácido neuraminico	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Dextrán	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Dextrán sulfato	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fucoidán	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Carragenano	0	1	0	0	2	0	0	0	0
Condroitín sulfato	1	3	3	2	2	1	0	0	0
Keratina	3	3	3	3	3	3	0	0	0
Heparán sulfato	1	0	0	0	0	2	0	0	0
Acido hialurónico	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactoferrina	2	3	2	0	3	0	0	0	0
Fetuina	3	3	3	2	3	2	0	0	0
Mucina	2	0	0	0	0	2	0	0	0
Asialofetuina	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Orosomucoide	3	3	3	3	3	2	0	0	0
Gelatina	3	3	2	3	3	2	0	0	0

0 agregación negativa, 1 agregación ligeramente positiva, 2 agregación positiva 3 agregación muy evidente

Tabla 5. Inhibición de la agregación de neoglicoproteína-levadura *Saccharomyces cerevisiae* cbs 7764

INHIBIDOR	PERLAS DE LATEX UNIDAS A -								
	GAL	GLU	NA GAL	NA GLU	NA MAN	FUC	HEPARINA	BSA	GEL
CONTROL	3	3	3	3	3	0	0	0	2
NANA	3	3	3	2	3	2	0	0	2
NA Gal	3	3	3	2	3	2	0	0	2
NA Glc	3	3	3	3	3	2	0	0	2
NA Glu SO ₄	2	3	3	3	3	2	0	0	2
NA glicolín ácido neuraminico	3	3	2	1	3	0	0	0	1
Dextrán	3	3	2	2	3	2	0	0	1
Dextrán sulfato	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Fucoidán	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Carragenáno	1	1	1	0	1	0	0	0	1
Condrolín sulfato	1	3	2	1	3	0	0	0	3
Keratina	3	3	3	3	3	1	0	0	1
Heparán sulfato	0	0	3	0	1	0	0	0	2
Acido hialurónico	0	0	2	0	0	0	0	0	1
Lactoferrina	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Fetuina	1	1	0	0	1	0	0	0	1
Mucina	1	0	0	1	1	0	0	0	1
Asialofetuina	2	2	2	2	2	0	0	0	1
Orosomucoide	3	3	2	2	3	0	0	0	1
Gelatina	3	3	3	2	3	0	0	0	2

0 agregación negativa, 1 agregación ligeramente positiva, 2 agregación positiva 3 agregación muy evidente

Tabla 6. Efecto de tratamientos físicos y químicos de *K. marxianus* en el reconocimiento de neoglicoproteínas

TX	PERLAS DE LATEX UNIDAS A -							
	GAL	GLU	NA GAL	NA GLU	NA MAN	FUC	HEPARINA	BSA
Control	3	2	2	1	1	0	0	0
pH 2	1	2	3	0	3	0	0	1
pH 6	3	2	2	3	3	2	1	1
pH 8	3	2	3	3	3	2	2	1
pH 10	3	2	3	3	3	2	2	1
NaCl 0.01 M	3	2	2	3	2	0	1	1
NaCl 0.1 M	3	2	2	3	3	1	2	1
NaCl 1 M	3	2	3	3	3	0	3	1
37 ° C	3	2	2	1	1	1	1	0
60 ° C	1	0	0	1	0	1	0	0
80 ° C	1	0	0	0	0	0	0	0
100 ° C	0	0	0	0	0	0	0	0
Proteinasa K	0	0	0	0	0	0	1	0
H ₂ SO ₄	0	1	3	0	0	0	1	0

5.1.4. Identificación de la especificidad de lectinas expuestas en *K. marxianus* por medio de electroforesis y Western blot

Los productos obtenidos de *K. marxianus*, fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % (Fig. 5). Se obtuvieron bandas con pesos moleculares de 81, 64, 49, 41, 39, 37, 32, 30, 22.5 y 21.5 KDa (Tabla 7).

Después de la electroforesis, se realizó la transferencia a membrana de nitrocelulosa y se hibridó con neoglicoproteínas marcadas con biotina como sonda, utilizando 4-cloronaphthol como sustrato, observando con todas las sondas una reacción positiva en 3 de las bandas con pesos moleculares de 178, 43 y 34 KDa como se muestra en la Fig. 5.

Tabla 7. Pesos moleculares de las proteínas obtenidas de *K. marxianus* corridos en geles de poliacrilamida al 12%

Pesos moleculares de proteínas de pared celular de <i>K. marxianus</i>	
Marcador	<i>K. marxianus</i>
	81
250	64
150	49
100	41
75	39
50	37
37	32
25	30
	22.5
	21.5

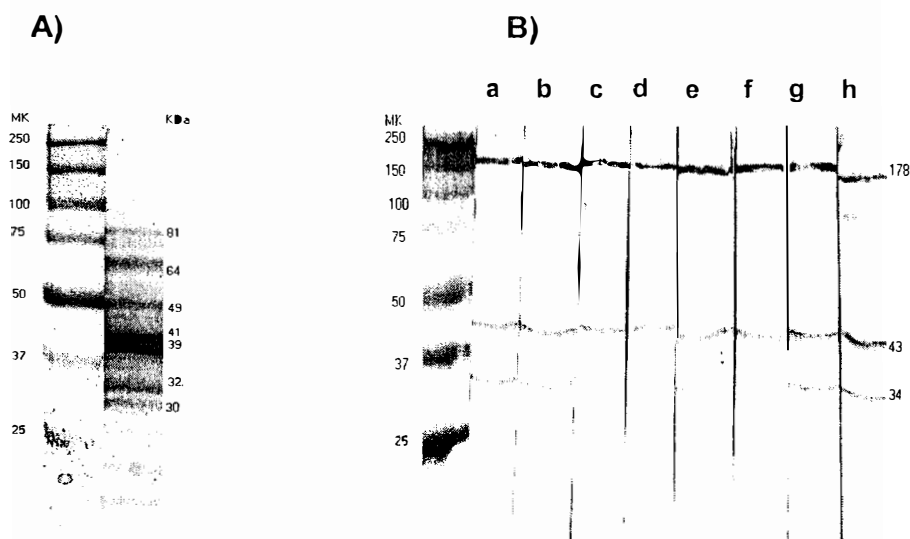


Fig. 1. A) SDS-PAGE de proteínas de superficie de *K. marxianus* obtenidas por β -mercaptoethanol B) Electrotransferencia de proteínas de *K. marxianus* utilizando como sondas a) albúmina bovina galactosamina, b) albúmina bovina glucosamina, c) albúmina bovina p-aminophenil-N-acetil-galactosamina, d) albúmina bovina p-aminophenil-N-acetil glucosamina, e) albúmina bovina fucosilamina, f) albúmina bovina-aminophenil manopiranososa, g) heparina y h) gelatina.

5.2. Caracterización de la adhesión de levaduras a células HeLa S3 y KATO III

5.2.1. Adhesión de levaduras a células HeLa S3 y KATO III

Debido a que la capacidad de adhesión al tracto gastrointestinal es uno de los criterios importantes en la selección de un probiótico, las levaduras fueron evaluadas por su habilidad de adhesión a células epiteliales de humano HeLa S3 y KATO III (Figura 2). Entre las especies estudiadas *Kluyveromyces marxianus*, *Rhodotorula mucilaginosa* y *Udeniomyces puniceus* fueron las que mostraron mayor adhesión a ambas líneas celulares, mientras que *Aureobasidium pullulans* y *Leucosporidium scottii* mostraron la menor adhesión.

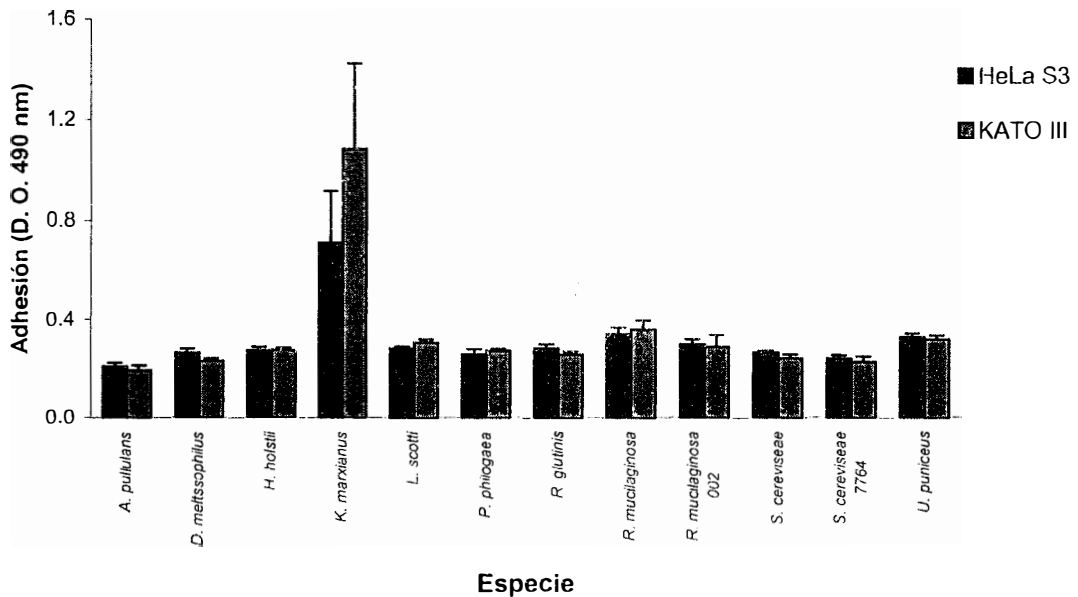
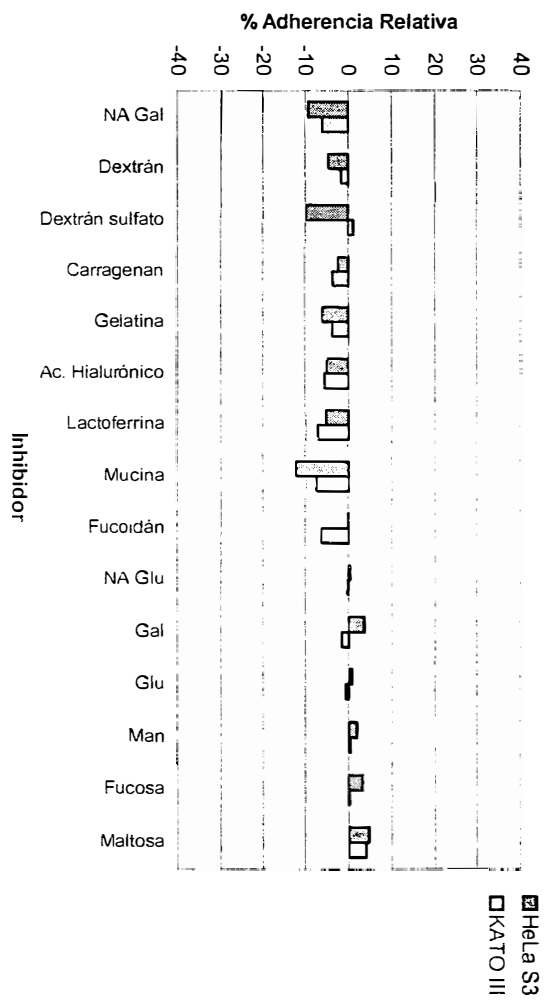


Fig. 2. Adhesión de levaduras marinas a células epiteliales HeLa S3 y KATO III. La adhesión esta expresada en unidades de D.O. leída a 490 nm.

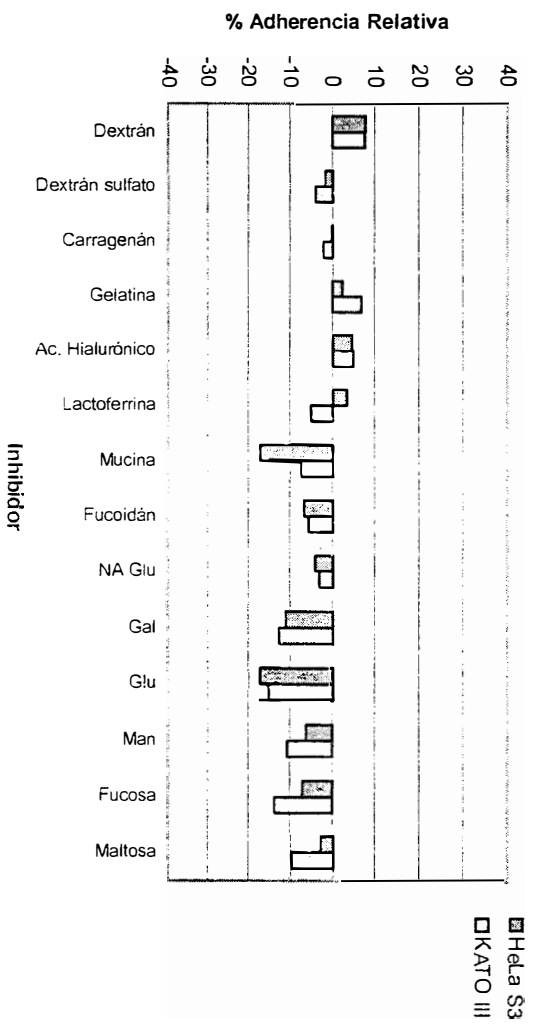
5.2.2. Efecto de compuestos glicosídicos sobre la adhesión de levaduras marinas a células HeLa S3 y KATO III

La adhesión de *K. marxianus*, *L. scottii*, *R. mucilaginosa* y *H. holstii* fué evaluada ante la previa exposición a carbohidratos, asumiendo que éstos serían reconocidos por estructuras presentes en la superficie celular de las levaduras, bloqueándolas para posteriormente reconocer receptores de la célula epitelial, identificando de esta manera la especificidad de las adhesinas presentes en las levaduras. La adhesión de las levaduras no se inhibió significativamente ante la presencia de carbohidratos, sin embargo, se observó que la adhesión de *K. marxianus* disminuye respecto al control ante la presencia de N-acetyl galactosamina, dextrán sulfato, lactoferrina y mucina. La adhesión de *L. scottii* a ambas líneas celulares se ve disminuida ante la presencia de mucina, fucoidán, galactosa, manosa y fucosa, mientras que dextrán promueve la adhesión de levaduras a ambas líneas celulares y glucosa sólo a células HeLa S3. Respecto a la adhesión de *R. mucilaginosa* disminuye en ambas líneas celulares ante la presencia de dextrán sulfato, carragenano, ácido hialurónico, lactoferrina, mucina, fucoidán, galactosa y manosa. Por último la adhesión de *H. holstii* a ambas células se ve disminuida ante la presencia de mucina, glucosa y manosa, mientras que la adhesión se promueve por lactoferrina; se observa una disminución de la adhesión por N-acetil galacosamina, galactosa y fucosa solo en Hela S3, mientras que la adhesión a KATO no parece ser modificada (Fig. 3).

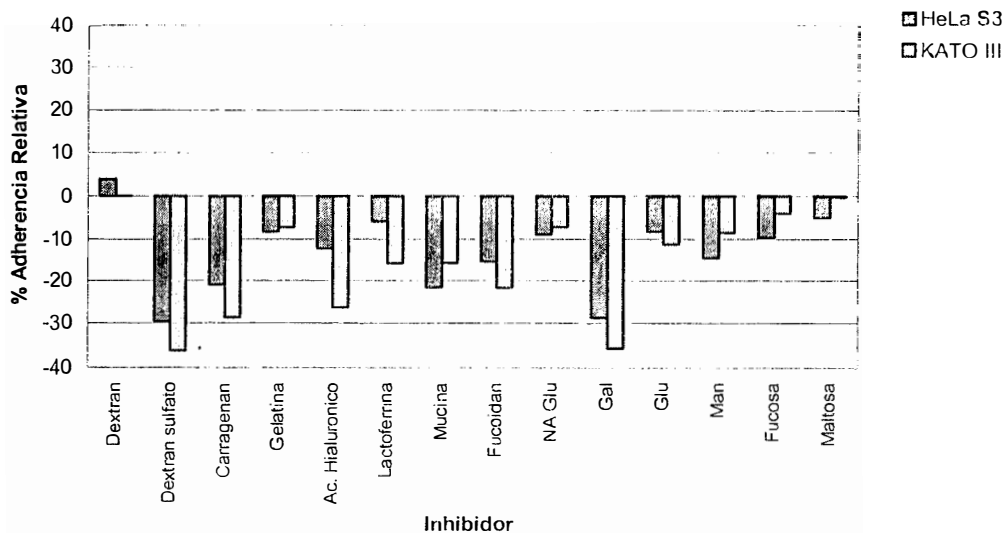
a)



b)



c)



d)

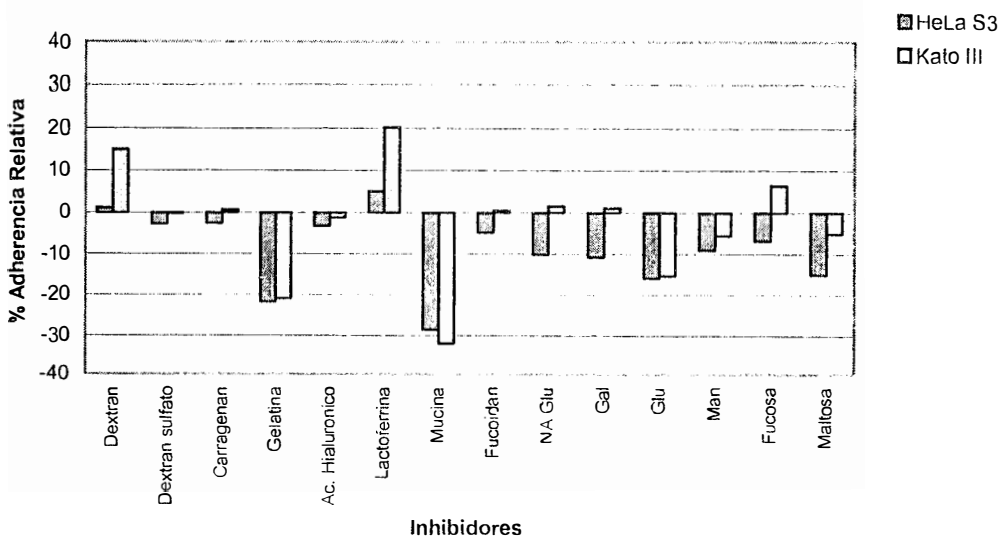


Fig. 3. Efecto de compuestos glicosídicos sobre la adhesión de a) *K. marxianus*, b) *L. scotti*, c) *R. mucilaginosa* y d) *H. holstii* a líneas celulares HeLa S3 y KATO III. La adhesión está reportada como porcentaje de adhesión relativa respecto al control. Las barras negativas significan una inhibición de la adhesión, mientras que las barras positivas significan una promoción de la adhesión.

5.3. Efecto de componentes extraídos de pared celular de levaduras sobre la adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3 y KATO III

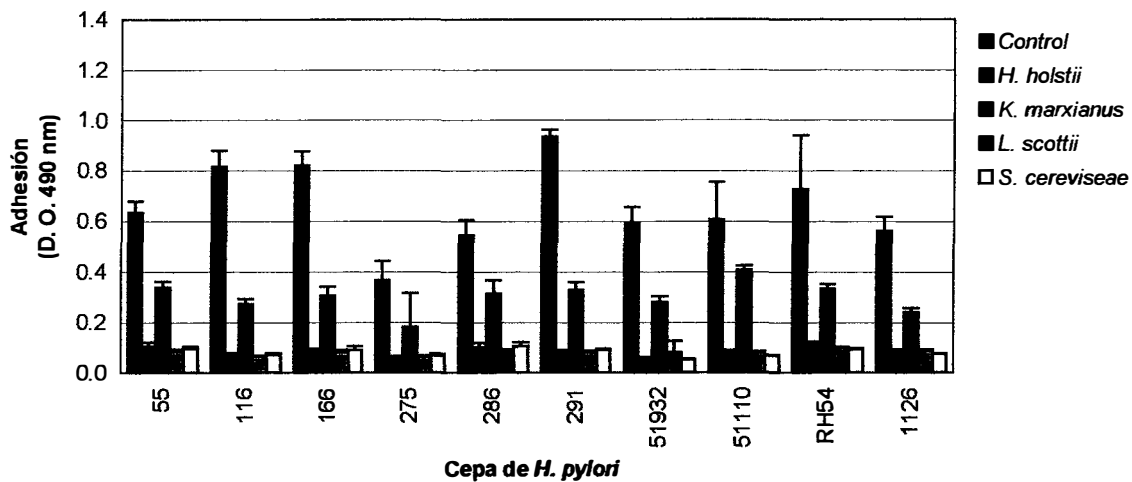
5.3.1. Inhibición de la adhesión de *H. pylori*

Se estudió la adhesión de 10 diferentes cepas de *H. pylori* a células HeLa S3 y KATO III ante la presencia de componentes de superficie celular de levaduras *K. marxianus*, *H. holstii*, *L. scottii* y *S. cerevisiae*. La figura 4 muestra los resultados obtenidos y se observa que la mayor adhesión a ambas líneas celulares la muestran *H. pylori* 116, 166, 291 y RH54, mientras que la menor adhesión la presenta *H. pylori* 275. La previa incubación de células HeLa S3 y KATO III con los componentes extracelulares de las levaduras incluidas en este estudio, disminuyen la adhesión significativamente ($p < 0.05$) de las diferentes cepas de *H. pylori* respecto al control para todos los casos en ambas líneas celulares.

5.3.2. Desplazamiento de *H. pylori* adherido a células HeLa S3 y KATO III

En la figura 5 se observa que los componentes extracelulares de las levaduras promueven el desplazamiento significativamente ($p < 0.05$) respecto al control de *H. pylori* 51932 y 51110 previamente incubado en células HeLa S3 y KATO III.

a)



b)

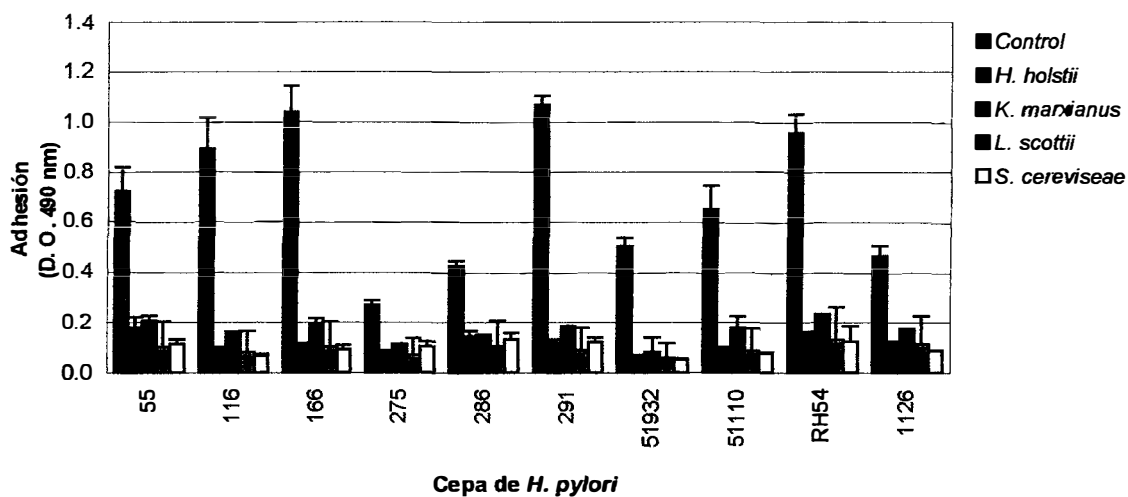
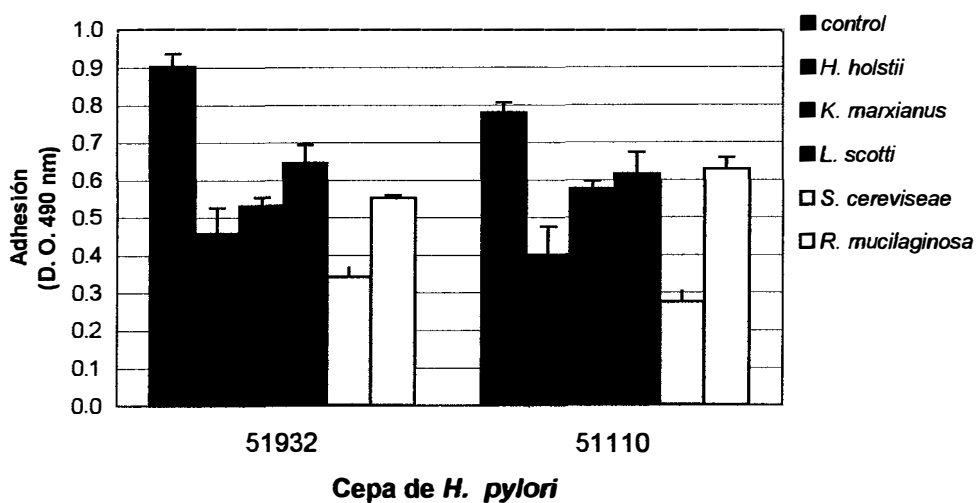


Fig. 4. Efecto de componentes de superficie de levaduras marinas sobre la adhesión de *H. pylori* a células a) HeLa S3, y b) KATO III. Los resultados se reportan D.O. Leída a 490 nm.

a)



b)

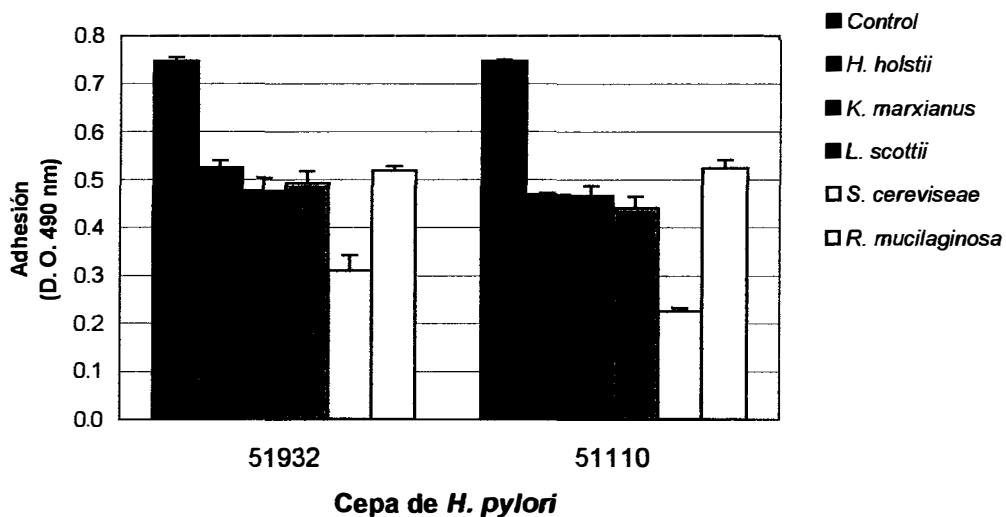


Fig. 5. Efecto de componentes de superficie de levaduras marinas sobre el desplazamiento de *H. pylori* previamente adherido a células a) HeLa S3 y, b) KATO III. Los resultados se reportan en D.O. leída a una longitud de onda de 490 nm.

6. DISCUSIÓN

Aunque continuamente se proponen nuevas especies y cepas específicas de probióticos, no se puede asumir su potencial sino hasta que su inocuidad y eficacia hayan sido cuidadosamente evaluadas. Por esta razón hemos decidido estudiar las características probióticas de las levaduras marinas bajo bases científicas.

El presente trabajo ofrece un conocimiento básico acerca de los posibles componentes celulares involucrados en los eventos de adhesión entre levaduras y células epiteliales de humano y al efecto inhibitorio que ejercen los componentes extracelulares de levaduras marinas sobre la adhesión de *H. pylori* a dichas células, haciendo evidente su potencial biotecnológico en la industria de biofármacos y nutraceuticos cuyo desarrollo afectaría positivamente la salud pública de nuestro país.

Estudios realizados principalmente con cepas de *Saccharomyces* y *K. marxianus* indican que el incremento de la floculación esta fuertemente correlacionado con el incremento de la hidrofobicidad celular (Teixeira *et al.* 1995), por tal motivo, en este estudio hemos considerado que las cepas autoagregables presentan algún grado de hidrofobicidad celular.

Resulta interesante notar que tanto la hidrofobicidad celular, así como las interacciones de reconocimiento de neoglicoproteínas podían disminuirse al realizar un tratamiento proteolítico o térmico en las levaduras, lo que sugiere que tales características están conferidas por compuestos proteicos.

Algunos autores proponen que las interacciones hidrofóbicas juegan un papel importante en el evento de adhesión (Doyle 2000 & Mack *et al.* 1999), sin embargo a excepción de los resultados obtenidos con *K. marxianus* en este estudio, la hidrofobicidad celular de las cepas no se correlacionó con la adhesión. Resultados similares se han obtenido en ensayos de adhesión levaduras a células de humano (Hazen 1989). Esto sugiere que en el evento de adhesión participan varios mecanismos tales como fuerzas iónicas y van der Waals que pueden fortalecer o debilitar la atracción entre dos superficies y el mecanismo de reconocimiento específico mediado por adhesina-receptor que propone ser el mecanismo predominante que media la adhesión más fuerte.

Nuestros resultados sobre la agregación de neoglicoproteínas inmovilizadas en microesferas de látex por levaduras marinas, la inhibición de dicho proceso, los análisis de SDS-PAGE/Western blot de componentes aislados de *K. marxianus* y, dado que la adhesión de las levaduras a células HeLa S3 y KATO III puede ser bloqueada por glicoconjugados nos ayuda sustentar la hipótesis de la adhesión de levaduras a células humanas mediante interacciones tipo lectinas.

La importancia de evaluar la capacidad de adhesión de levaduras aisladas de ambientes marinos a células epiteliales de humano HeLa S3 y KATO III radica en que las levaduras que muestren capacidades adhesivas a la mucosa intestinal poseen el potencial para la elaboración de suplementos probióticos para uso humano tanto como para animal, ya que una vez adherido el microorganismo puede permanecer por más tiempo en el tracto digestivo, compitiendo por espacio contra patógenos y/o liberando productos bacteriostáticos. Sin embargo no sería conveniente descartar aquellas levaduras que presentan una capacidad de adhesión menor, pues aun serían capaces de intervenir en la adhesión de patógenos y la composición de la microflora gastrointestinal a través de sus metabolitos *in situ*, coagregación celular, etc., influenciando de una forma positiva la salud del huésped.

Los componentes proteicos extracelulares de las levaduras inhibieron la adhesión y promovieron el desplazamiento de *H. pylori* adherido a células HeLa S3 y KATO III, probablemente compitiendo diferentes entidades glicosídicas tales como heparán sulfato, mucina, lactoferrina y fucoidán. Cabe mencionar que también se realizaron ensayos de inhibición y desplazamiento de la adhesión *H. pylori* a células epiteliales, utilizando como inhibidores los productos del metabolismo de las levadura y no se obtuvo ningún efecto significativo, sin embargo estos compuestos se utilizaron sin haber sido purificados del medio de cultivo y los ensayos se realizaron sin identificar los compuestos presentes. No obstante, resultaría interesante, más que el efecto antiadhesivo, estudiar el efecto

bacteriostático que los productos metabólicos de levaduras ejercen sobre el patógeno.

Uno debe tener en cuenta que los métodos utilizados en este estudio para evaluar adhesiones, son modelos que tal vez no sean la representación más acertada de la mucosa gastrointestinal, sin embargo, los modelos *in vitro* tienen el potencial de sugerir las capacidades adhesivas de las cepas *in vivo* (Johansson *et al.* 1993; Alander *et al.* 1999). Por otro lado, la acidez y concentraciones iónicas presentes a través del tracto digestivo del humano, tal vez no sean las mejores condiciones para la sobrevivencia y reproducción de la levadura, sin embargo, para que ésta pueda ejercer un efecto benéfico al competir por receptores celulares, no debe ser necesariamente viable y, por otra parte, en los resultados obtenidos se observó que las diferentes concentraciones de cloruro de sodio no afectaron el reconocimiento de las neoglicoproteínas por las levaduras, por lo que es posible pensar que, aún cuando la levadura requiere NaCl para su óptimo desarrollo, las concentraciones iónicas del tracto digestivo no afectarán el comportamiento de reconocimiento adhesina-receptor.

En nuestro laboratorio se han realizado estudios sobre la aplicación de vacunas en ratones para la prevención y control de infecciones producidas por *H. pylori* en ratones experimentalmente infectados como alternativa profiláctica del proceso infeccioso (Ruiz-Bustos 2000). También, se ha venido investigando el efecto de polisacáridos sulfatados aislados de microalgas como una estrategia importante

en la terapia antiadhesiva durante el tratamiento de *H. pylori* (Guzmán-Murillo-Murillo 1997), sin embargo las levaduras presentan la ventaja de su simple forma de cultivo y la importante cantidad de biomasa que se obtiene al monitorear adecuadamente su producción, así como la fácil extracción de sus componentes extracelulares que resultarían de gran interés entre los avances científicos y biotecnológicos para el desarrollo de nuevos tratamientos naturales.

En adición, la utilización de levaduras marinas para prevenir y/o controlar infecciones por microorganismos gastrointestinales, *i.e H. pylori*, podría resultar en una respuesta multifactorial, pues además ejercer una exclusión competitiva, pueden actuar directamente en el huésped al estimular el sistema inmune no específico y favorecer los procesos de digestión, absorción y/o asimilación de nutrientes.

Actualmente existen en el mercado fórmulas de probióticos a base a distintas especies bacterianas, principalmente de los géneros *Lactobacilos* y *Streptotococos* y sus mecanismos de acción han sido muy bien estudiados, sin embargo, poco se ha estudiado sobre las características probióticas de levaduras no convencionales a pesar de las ventajas que éstas representan sobre los microorganismos bacterianos, en términos de producción de biomasa, requerimientos nutricionales, tolerancia y estabilidad que presentan ante las condiciones del entorno debido a sus características metabólicas; gran proporción de masa celular como proteínas con un perfil de aminoácidos esenciales, sin

compuestos tóxicos ni carcinogénicos. En la producción de levaduras a mayor escala con el propósito del desarrollo de nutraceuticos, se podrían establecer las condiciones que favorecieran la mayor producción de biomasa, así como una mayor expresión de los componentes con efecto inhibitorio, y al mismo tiempo pensar en la producción de metabolitos y compuestos de valor agregado (como inmunomoduladores potenciales, enzimas y/o lectinas) y la menor producción de metabolitos no deseados. Por otra parte, los avances de la ingeniería genética prometen la posibilidad de la generación de un probiótico que ejerza beneficios extras al conseguir la expresión de determinantes antigénicos para la producción de vacunas recombinantes o la expresión de enzimas que le permitan intervenir en la digestión de un rango más amplio de fibras o digerir los nutrientes de la dieta de una manera más eficiente, o bien conseguir una mayor producción de determinada adhesina y promover el evento de adhesión.

Para la producción del inhibidor, también sería necesario establecer cual es el método de extracción que permitiera su mayor aprovechamiento, así como la técnica de purificación con el menor costo y ponderar los costos de producción total para analizar si tal actividad resulta rentable. De cualquier forma, resulta atractivo pensar en el uso de compuestos naturales para disminuir la administración de antibióticos en infecciones bacterianas y evitar la generación de cepas resistentes.

Aunque a nivel internacional se han realizado investigaciones de microbiología marina, es apenas recientemente cuando en México, la comunidad científica empieza a prestar atención sobre el potencial biotecnológico de los recursos marinos (Hernández-Saavedra 1990), por lo tanto, nuestra contribución fortalecerá un área de investigación poco desarrollada en nuestro país y los beneficios esperados se traducirán un impacto positivo en la salud pública.

7. CONCLUSIONES

Las distintas cepas de las especies estudiadas deben evaluarse individualmente y no extrapolar los resultados entre especies.

Los resultados confirman que la hidrofobicidad celular no es el mecanismo predominante para mediar el evento de adhesión.

K. marxianus muestra 3 bandas proteicas de 170, 40 y 31 KDa que tienen gran afinidad por neoglicoproteínas. Estas proteínas identificadas en *K. marxianus* probablemente sean lectinas candidatas para futuros estudios.

Este estudio sugiere que levaduras marinas tienen la capacidad de adherirse a células epiteliales del humano, y tal vez la capacidad de adaptarse al tracto gastrointestinal humano, presentando un potencial de probiótico.

Las levaduras marinas expresan componentes proteicos adhesivos que le permiten a la levadura reconocer diferentes entidades glicosídicas tales como ácido hialurónico, heparán sulfato, carragenanos, mucina, lactoferrina y fucoidán e interactuar de una forma no específica con moléculas hidrofóbicas.

Los extractos extracelulares de los distintos géneros de levaduras utilizadas en este estudio produjeron distinto poder inhibitorio sobre la adhesión de *H. pylori* a células HeLa S3 y KATO III, posiblemente compitiendo por receptores análogos tales como heparán sulfato, mucina y fucoidán.

8. PERSPECTIVAS

Caracterización bioquímica de las diferentes adhesinas de *K. marxianus* que presentaron afinidad no selectiva por neoglicoproteínas y comparación en banco de datos con otras adhesinas de levaduras.

Analizar la participación de estas adhesinas en los procesos de adhesión celular, así como en el proceso de adhesión competitiva con *H. pylori* por los receptores celulares de HeLa S3 y KATO III y en un modelo animal apropiado como el de ratones BALB/c experimentalmente infectados con *H. pylori*.

Analizar el potencial de levaduras marinas y sus componentes celulares y exocelulares, en la estimulación del sistema inmune no específico, así como el favorecimiento del proceso de digestión, absorción de nutrientes y el efecto bacteriostático de sus productos metabólicos en modelos animales.

9. REFERENCIAS

Adlerberth I., Ahrné S., Johansson M., Molin G., Hanson L. & Wold A. (1996). A mannose-specific adherence mechanisms in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied and Environmental Microbiology*; 2: 2244-2251.

Aguirre G. (1990). Evaluación nutricional de diferentes levaduras como fuentes de proteína y/o probiótico en la alimentación del camarón blanco *Penaeus vannamei*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, Nuevo León.

Aiba Y., Suzuki N., Kabir A., Takagi A. & Koga Y. (1998). Lactic acid-mediated supresion of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *The American Journal of Gastroenterology*; 93: 2097-2101.

Alander M., Satokari R., Korpela R., Saxelin M., Vilpponen-Salmela T., Mattila-Sandholm T. & von Wright A. (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*; 65: 351-354.

Ascencio F., Ljungh Å. & Wadström T. (1990). Particle agglutination assays to identify fibronectin and collagen cell surfaces receptors and lectins in *Aeromonas* and *Vibrio* species. *Applied and Environmental Microbiology*; 56: 1926-1931.

Ascencio F., Fransson L. & Wadström T. (1993). Affinity of the gastric pathogen *Helicobacter pylori* for the N-sulphated glycosaminoglycan heparan sulphate. *Journal of Medical Microbiology*; 38: 240-244

Ascencio F., Hansson H., Larm O. & Wadström T. (1995). *Helicobacter pylori* interacts with heparin and heparin-dependent growth factors. *Immunology Medical Microbiology*; 12: 265-272.

Ascencio F. Martinez-Arias W. Romero M.J. & Wadström T. (1998). Analysis of the interaction of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* and *A. sobria* with mucins. *Immunology and Medical Microbiology*; 20: 219-229.

Bardocz S. (1993). The role of dietary polyamines. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47, 683-690.

Bazzoli F., Berretti D., De Luca L., Nicolini G., Pozzato P., Fossi S. & Zagari M. (1999). What can be learnt from the new data about antibiotic resistance? Are there any practical clinical consequences of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance?. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*; 11: S39-S42.

Bengmark S. (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*; 42: 2-7.

Borén T., Falk P., Roth K.A., Larson G. & Normark S. (1993). Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. *Science*; 262: 1982-1985.

Buck G.E. (1990). *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. *Clinical Microbiology Reviews*; 3: 1-12.

Buts J., De Keyser N. & Raedemaeker L. (1994). *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. *Pediatric Research*; 36: 522-527.

Casanova M. & Chaffin L. (1991). Cell wall glycoproteins of *Candida albicans* as released by different methods. *Journal of General Microbiology*; 137: 1045-1051.

Clark M., Hirst B. & Jepson M. (2000). Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 43: 207-223.

Coconnier M.H., Lievin V., Hemery E. & Servin A. (1998). Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Applied and Environmental Microbiology*; 64: 4573-4580.

Cook R., Harris R. & Reid G. (1988). Effect of culture media and growth phase and the morphology of *Lactobacilli* on their ability to adhere to epithelial cells. *Current microbiology*; 17: 159-166.

Doyle R.J. (2000). Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and Infection*; 2: 391-400.

Doyle R.J. & Rosenberg M. (1990). Microbial cell surface hydrophobicity. American Society of Microbiology, Washington, D. C.

Drake I.M., Warland D., Charswell N., et al. (1995). Reactive oxygen species (ROS) activity and damage in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. Effect of eradication therapy. *Gut*; 37(1 Suppl): A155.

Elmer G., Surawicz C. & McFarland L. (1996). Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections; *JAMA* 275: 870-876.

Evans D.G., Evans D.J. Jr., Moulds J.J. & Graham D.Y. (1988). N-acetylneuraminylactose, binding fibrillar haemagglutinin of *Campylobacter pylori*: a putative colonization factor antigen. *Infection and Immunity*; 56: 2896-2906.

Farthing M. (1998). *Helicobacter pylori* infection: an overview. *British Medical Bulletin*; 54: 1-6.

Fuller R. (1999). Modulation of the intestinal microflora by probiotics. En: *Probiotics, Other Nutritional Factors and Intestinal Microflora*. Hanson L.A. & Yolken R.H. (eds). Lippincott-Raven, Philadelphia. Workshop Series; 42: 33-45.

Fuller R. (1991). Probiotics in human medicine. *Gut*; 32: 439-442.

Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*; 66: 365-378.

García-González A. & Ochoa J.L. (1999). Anti-inflammatory activity of *Debaryomyces hansenii* Cu,Zn-SOD. *Archives of Medical Research*; 30: 69-73.

García-González A. (1998). Utilidad de la superóxido dismutasa de *Debaryomyces hansenii* en modelos animales de inflamación. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México.

Gibson G. & Roberfroid M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*; 125: 1401-1412.

Greco S., Hugueny I., George P., Perrine P. & Louisot P. (2000). Influence of spermine on intestinal maturation of the glycoprotein glycosylation process in neonatal rats. *Journal of Biochemistry*; 34: 69-75.

Guarino A., Canani R., Spagnuolo M., Albano F. & Di Benedetto L. (1997). Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and viral excretion in children with mild diarrhea. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*; 25: 516-519.

Guzmán-Murillo A.M. & Ascencio F. (2001). Enzyme-linked, biotin-streptavidin bacterial-adhesion assay for *Helicobacter pylori* lectin-like interactions with cultured cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*; 11: 35-39.

Guzmán-Murillo A.M. (1997). Efecto de polisacáridos sulfatados de microalgas en adhesión de bacterias patógenas a líneas celulares humanas y de peces. Tesis de Maestría. IPN. La Paz, México.

Harlow E. & Lane D. (1988). *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Harris A. (1998). Current regimens for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Bulletin*; 54: 195-205.

Hazen K.C. (1989). Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. *Infection and Immunity*; 57: 1894-1900.

Hernández-Saavedra N.Y. (1990). Levaduras marinas aisladas en la Costa Occidental de Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. UNAM. ENEP Iztacala, México.

Hernández-Saavedra D. (1991). Composición química de la pared celular de distintos géneros de levaduras marinas. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México.

Hernández-Saavedra N.Y., Hernández-Saavedra D. & Ochoa J.L. (1992). Distribution of *Sporobolomyces* (Kluyver et van Niel) genus in the Western Coast of Baja California Sur, Mexico. *System Appl Microbiol*; 15: 319-322.

Hernández-Saavedra N.Y., Ochoa J. L. & Vázquez-Dulhalt R. (1995a). Osmotic adjustment in marine yeast. *Journal of Plankton Research*; 17: 59-59.

Hernández-Saavedra N.Y., Hernández-Saavedra D. & Ochoa J.L. (1995b). Factor affecting the distribution of the genus *Candida* (Berkhout) along the West Coast of Baja California Sur, Mexico. *System. Appl. Microbiol*; 18: 109-112.

Hirno S., Kelm S., Iwersen M., Hotta K., et al. (1998). Inhibition of *Helicobacter pylori* sialic acid-specific haemagglutination by human gastrointestinal mucins and milk glycoproteins. *Immunology and Medical Microbiology*; 20: 275-281.

Jahn H., Ullrich R., Schneider T., Liehr R., Schieferdecker L., Holst H. & Zeitz M. (1996). Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy humans volunteers. *Digestion*; 57: 95-104.

Johansson M.L., Molin G., Jeppson B., Mobaek S., Ahrné S. & Bengmark S. (1993). Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Applied and Environmental Microbiology*; 59: 15-20.

Jones G.W. (1977). The attachment of bacteria to the surfaces of animal cells. En: *Microbial Interactions*. Reissing J.L. (ed). Chapman and Hall. London. Pag. 139.

Kabir A., Aiba Y., Kamiya S., Takagi S., Miwa T. & Koga Y. (1997). Prevention of *Helicobacter* infection by *lactobacilli* in a gnotobiotic murine model; *Gut*. 41: 49-55.

Kawano S., Tsujii M., Fusamoto H., et al. (1992). Chronic effect of intragastric amonia on gastric mucosal structures in rats. *Dig Sis Sci*; 102: 1881-1888.

Kennedy J.F., Palva P.M., Corella M.T., Cavalcanti M.S. & Coelho L.C. (1995). Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*; 26: 219-230.

Kimoto H., Kurisaki J., Tsuji N.M., Ohmomo S. & Okamoto T. (1999). *Lactococci* as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology*; 29: 313-316.

Kirchelle A., Fruhwein N. & Toburen D. (1996). Treatment of persistent diarrhea with *S. boulardii* in returning travelers. Results of a prospective study. *Fortschr Med*; 114: 136-140.

Kleanthous H., Lee C. & Monath T. (1998). Vaccine development against infection with *Helicobacter pylori*. *British Medical Bulletin*; 54: 229-241.

Kohlmeyer E. & Kohlmeyer J. (1979). *Marine Ecology: The higher fungi*. Academic Press. New York. pp 556-606.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-685.

Lambert J. & Midolo P. (1996). Novel therapies for *Helicobacter pylori* infection. En: *Helicobacter pylori*, Basic Mechanisms to Clinical Cure. Hunt R. & Tytgat G. (eds). AXCAN Pharma and Lluwer Academic Publishers. Great Britain. pp 347-383.

Lewis S. & Freedman A. (1998). Review article: the use of biotherapeutic agents in the prevention and treatment of gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacology Therapy*; 12: 807-822.

Lilly D.M. & Stillwell R.H. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*; 47: 747-748.

Lindahl M., Faris A., Wadström T. & Hjerton S. (1981). A new test based on "salting out" to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochem Biophys; Acta* 677: 471- 476.

Ljungh Å., Österlind M. & Wadström T. (1986). Cell surface hydrophobicity of group D *Viridans streptococci* isolated from patients with septicemia. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr; Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A* 261: 286-296.

Logan R.P. (1996). Adherence of *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacology Therapy*; 10: S3-S15.

López-Carrillo L., Fernández-Ortega C., Robles Díaz G., Rascon Pacheco R.A. & Ramírez Iglesias T. (1997). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Mexico. A challenge for prevention and population control. *Rev. gastroenterol; Mex.* 62: 22-28.

Mack D.R. & Sherman P.M. (1999). Hydrophobicity and the gastrointestinal tract: methods of determination, its source and implications for bacterial adherence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 15: 355-363.

Mégraud F. (1998). Antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* infection. *British Medical Bulletin*; 54: 207-216.

Michetti P., Dorta G., Wiesel P., Brassart D., Verdu E., Herranz M., Felley C., Porta N., Rouvet M., Blum A. & Corthésy-Theulaz I. (1999). Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (*Johnsonii*) La 1 on *Helicobacter pylori* infections in humans; *Digestion*; 60: 203-209.

Midolo P., Lambert J., Hull R., Luo F. & Grayson, M. (1995). *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*; 79: 475-479.

Miura T., Ohno N., Miura N.N., Adachi Y., Shimada S. & Yadomae T. (1999). Antigenic-specific response of murine immune system toward a yeast β -glucan preparation, zymosan. *Immunology and Medical Microbiology*; 24: 131-139.

Moradas-Ferreira P. Fernandes P.A. & Costa M.J. (1994). Yeast flocculation – the role of cell wall proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*; 2: 159-164.

Naidu A. S., Paulsson M. & Wadström T. (1988). Particle agglutination assay for rapid detection of fibronectin, fibrinogen and collagen receptors on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*; 26: 1549-1554.

Nguyen T., Brunson D., Crespi J., et al. (1992). DNA damage and mutations in human cell exposed to nitric oxide in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*; 89: 3030-3039.

Oberhelman R.A., Gillman R.H., Sheen P. et al. (1999). A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *Journal of Pediatrics*; 84: 15–20.

Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V. Grönlund M.M. Isolaur E. & Salminen S.J. (1999a). Adhesion of probiotic microorganisms to intestinal mucus. *International Dairy Journal*; 9: 623-630.

Ouwehand A.C., Kirjavainen P.V., Shortt C. & Salminen S. (1999b). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*; 9: 43-52.

Parsonnet J. (1998). *Helicobacter pylori*. *Emerging Infectious Diseases*; 12: 185-197.

Phaff H.J. (1990). Isolation of yeast from natural sources. En: *Environmental Biotechnology*. Labeda P.(ed). Mc graw Hill, USA. Pp 53-79.

Rhishipal R. & Philip R. (1998). Selection of marine yeasts for the generation of single cell protein from prawn-shell waste. *Bioresource Technology*; 65:255-256.

Piñol J.F. & Paniagua E.M. (1999). Mediadores bacterianos de la inflamación en la gastritis crónica por *Helicobacter pylori*. *Rev Cubana Med*; 38:276-283.

Rolfe R.D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*; 130: S396-S402.

Ross G.D., V tvička V., Yan J., Xia Y. & V tvičková J. (1999). Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer. *Immunopharmacology*; 42: 61-74.

Ruiz-Bustos B.E. (2000). Inmunidad sitemica y de mucosa inducida contra infecciones por *Helicobacter pylori* en ratones Balb/c. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México.

Ruiz-Bustos-Bustos E., Ochoa J.L., Wadstöm T. & Ascencio F. (2001). Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. *Journal of Medical Microbiology*; 50: 1-8.

Ruiz-Bustos-Bustos E., Sierra A., Romero M.J., Rodríguez-Jaramillo C. & Ascencio F. (2000). Protection of BALB/c mice against experimental *Helicobacter pylori* infection by oral immunisation with *H. pylori* heparan sulphate-binding proteins coupled to cholera toxin β -subunit. *Journal of Medical Microbiology*; 49: 535-541.

Saalera M., Mogensen G., Fondén R., Mättö J. & Mattila-Sandholm T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*; 84: 197-215.

Salminen S., Laine M., Von Wright A., Vuopio-Varkila J., Korhonen T. & Mattila-Sandholm T. (1996). Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Biosci Microflora*; 15: 61-67

Salminen S., Von Wright A., Morelli L. et al. (1998). Demonstration of safety probiotics-a review. *International Journal of Food Microbiology*; 44: 93-106.

Savage D.C. (1992). Growth phase, cellular hydrophobicity and adhesion *in vitro* of *Lactobacilli* colonizing the keratinizing gastric epithelium in mouse. *Applied and Environmental Microbiology*; 58: 1992-1995.

Schaafsma G. (1996). State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr Newsl*; 5: 23-24.

Schauer D.B. & Flox J.G. (1994). Examining the surface of a gastric pathogen. *Trends in Microbiology*; 2: 219-220.

Shiao Y., Rugge M., Correa P., et al. (1994). P53 alterations in gastric precancerous lesions. *American Journal of Pathology*; 144: 54-57.

Schreuder M.P., Mooren A.T., Toscka Y., Theo Verrips C. & Klis F.M. (1996). Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends in Biotechnology*; 14: 115-120

Sipponen P., Kekki M., Haapakoski J., Ihamäki T. & Sirula M. (1985). Gastric cancer risk in chronic atrophic gastritis: statistical calculations of cross-sectional data. *International Journal of Cancer*; 35: 173-177.

Smits G.J., Kapteyn J.C., Van Den Ende H. & Klis F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Current Opinion in Microbiology*; 2: 348-352

Smoot D.T., Mobley H., Chippendale G.R. et al. (1990). *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infect Immunol*; 58: 1992-1994.

Sutton P. & Lee A. (2000). Review article: *Helicobacter pylori* vaccines-the current status. *Aliment Pharmacology Therapy*; 14: 1107-1118.

Stratford M. (1994). Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast*; 10: 1741-1752.

Strayer L. (1995). *Bioquímica*. Reverté. Barcelona, España. pp 280.

Suervaum S. & Wadström T. (1995). Bacterial pathogenic factors. En: *Helicobacter pylori* year 1995. Malferteiner P., Mégraud F., Michetti P. & Price A. (eds). *Current Science*. pp 13-21.

Teixeira J.A., Oliveira R., Azeredo M., Sousa M. & Sil C. (1995). Cell wall surface properties and flocculence of a *Kluyveromyces marxianus* strain. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*; 5: 197-203.

Thompson L., Cockayne A. & Spiller R.C. (1994). Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on the growth of *Helicobacter pylori* : a possible explanation of the effect of diet on peptic ulceration. *Gut*; 35: 1557-1561.

Tovar R.D., Zambonino I.J., Cahy C., Gatesoupe F.J. & Vázquez J.R. (2000). Efecto de la administracion de levaduras en el proceso de maduración del tracto digestivo de peces. *Avances en Nutrición Acuícola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. 19-22 Noviembre, 2000. Mérida, Yucatán, México. pp 33-46.

Tuomola E. (1999). *In vitro* adhesion of probiotic lactic acid bacteria. Ph.D. Thesis, Turku Finland.

Vázquez-Juárez R. Ascencio F. Andlid T. Gustafsson L. & Wadström T. (1993). The expression of potential colonization factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 39: 1135-1141.

Walker G.M. (2000). *Yeast physiology and biotechnology*. Walker G.M. (ed). John Wiley & Sons. England. pp 265-320.

WHO. (1994) Scientific Working Group on Monitoring and Management of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. Geneva: WHO.

Wadström T., Hirno S., & Boren T. (1996). Biochemical aspects of *Helicobacter pylori* colonization of the human gastric mucosa. *Aliment Pharmacology Therapy*; 10: S17-27.

Wolf B.W., Wheeler K.B., Ataya D.G. & Garleb K.A. (1998). Safety and tolerance of *Lactobacillus reuteri* supplementation to a population infected with the Human Immunodeficiency Virus. *Food and Chemical Toxicology*; 36: 1085-1094.

Xia HH-X. & Talley N.J. (1998). *Helicobacter pylori* infection, reflux esophagitis, and atrophic gastritis: An unexplored triangle. *American Journal of Gastroenterology*; 93: 394-400.

Yeonhee L., Shin E., Lee J. & Park J. (1999). *Lactobacillus acidophilus* inhibits the *Helicobacter pylori* adherence. *Journal of Microbiol Biotechnol*; 9: 794-797.

Yoshiyuki H., Toru K. & Motonobu M. (1999). Bovine milk inhibits both adhesion of *Helicobacter pylori* to Sulfatide and *Helicobacter pylori*-induced vacuolation of Vero Cells. *Digestive Diseases and Sciences*; 44: 1696-1702.

10. APÉNDICE

Apéndice 1. Composición de medios de cultivo.

a. Levaduras

YPG

Glucosa	20 g
Peptona	20 g
Extracto de levadura	10 g
Agua destilada	1000mL
Ajustar pH a 5.6	

b. *Helicobacter pylori*

1. BHI

Extracto de levadura	4g
Caldo de cerebro corazón	38g
Agua destilada	900mL
Suero de caballo	10% (v/v)

Se mezclan el extracto de levadura, cerebro corazón y agua destilada. Se esterilizan a 121°C (15lb/ln²) por 20 minutos. El suero de caballo se agrega fresco antes de usar el medio.

2. Chocolate Agar Selectivo

Agar sangre	40 g
Agua destilada	950mL
Sangre de bovino	5% (v/v)
Vancomicina	6 mg/L
Acido nalidíxico	20 mg/L
Anfotericina B	2 mg/L

Se disuelve el agar sangre en el agua. Se esteriliza a 121°C (15lb/In²) por 20 minutos. Se deja enfriar a una temperatura de 55°C para agregar la sangre de bovino y calentar en baño maría a 80°C durante 10 minutos agitando constantemente. Se deja enfriar a una temperatura de 55°C para adicionar los antibióticos, vaciar posteriormente a cajas Petri y almacenarse a 4°C hasta su uso.

c. RPMI 1640 Completo

RPMI 1640 (SIGMA) líquido con NaHCO₃ y HEPES Sin glutamina

Gentamicina	40 µg/mL
L-glutamina	2 mM
Suero fetal de ternero	10% para HeLa
	15% para KATO

Apéndice 2. Composición de soluciones amortiguadoras.**a. Solución amortiguadora de fosfatos****1. PBS**

NaCl 0.015M

KH₂PO₄ 0.015M

K₂HPO₄ 3H₂O 0.015 M

Ajustar pH a 7.2

2. PBS A

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

KH₂PO₄ 10 mM

Na₂HPO₄ 1.7 mM

Ajustar pH a 7.2

Autoclavear

b. Solución amortiguadora de citratos, para OPD

Fosfato de sodio	50 mM
Ácido cítrico	20 mM
OPD	4 mM
Peróxido de hidrógeno	0.004% (v/v)

Preparar la solución amortiguadora de citratos y ajustar pH a 5. Agregar la OPD y el peróxido de hidrógeno para utilizarse inmediatamente.

Apéndice 3. Inmovilización de neoglicoproteínas en microesferas de látex (Ascencio *et al.* 1990).

50 μL de microesferas de látex en suspensión (diámetro de la perla de 0.8 μm) se resuspendieron en 450 μL de solución amortiguadora de glicina 0.17M, pH 8.2. Se centrifugó a 6000 $\times g$ por 10 minutos. El pellet fué resuspendido en 500 μL de PBS conteniendo una concentración de 1mg/mL de neoglicoproteína y se incubó horizontalmente a 30°C y 50 RPM durante 12 horas. Se lavó tres veces con PBS y el pellet se resuspendió en 500 μL PBS-albúmina 0.01% (p/v) para prevenir la adhesión no específica y se almacenó a 4°C hasta su uso. El control se preparó utilizando PBS en vez de neoglicoproteínas.

Apéndice 4. Determinación de proteínas (Bio Rad Protein Reagent).

La concentración de proteínas fué determinada con el reactivo de Bio-Rad Protein Dye. En un tubo Eppendorf se mezclaron 100 μ L de la muestra con 700 μ L de PBS y 200 μ L del reactivo. Se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. La densidad óptica se midió a 595 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). Como estándar se utilizó albúmina sérica bovina (BSA).

Apéndice 5. Marcaje de neoglicoproteínas (Harlow *et al.* 1988).

Las neoglicoproteínas se marcaron con biotina N-hydroxysuccinimida de acuerdo al método de Harlow *et al.* (1988). 500 µg de cada neoglicoproteína se disolvieron en 1 mL de solución amortiguadora de borato de sodio 0.1M pH 8.8. Por cada miligramo de glicoproteína se adicionaron 75 µg de biotina diluida en dimetil sulfóxido (DMSO) (100 µL de DMSO por cada miligramo de biotina) y se incubó a temperatura ambiente por 4 horas. Se agregaron 20 µL de NH₄CL 1M por cada 250 µg de biotina y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se dializó contra PBS durante 24 horas a 4°C. Se determinó la concentración de proteínas y se guardó el stock conjugado a 4°C hasta su uso.

Apéndice 6. Marcaje de microorganismos con biotina (Harlow *et al.*1988).

Las levaduras y/o *H. pylori* se marcaron con biotina de acuerdo a la técnica descrita por Harlow *et al.* (1988). Las levaduras o células bacterianas fueron resuspendidas en una solución de bicarbonato de sodio 0.1M, pH 8, a una concentración final de 10^{10} ufc/mL, se centrifugaron a 6000 x g durante 15 minutos a 22°C y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de la misma solución y se adicionaron 130 µL biotina diluida en DMSO (1mg de biotina en 1 mL de dimetil sulfóxido) y se incubó por 2 horas a 22°C en la oscuridad. Para lavar se agregaron 9 mL de PBS y se centrifugó a 6000 x g durante 20 min a 22°C y se repitió el lavado 3 veces. Finalmente los microorganismos se resuspendieron en 2.5 mL de PBS y se utilizaron frescos para los bioensayos de adhesión.

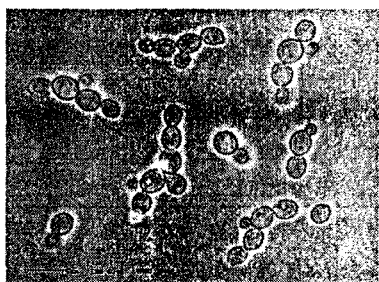
11. ANEXOS

Aureobasodium pullulans



<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/yeast.htm#crest>

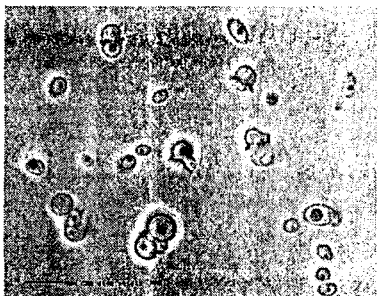
Debaryomyces melissophilus



Debaryomyces melissophilus cbs 6344

http://www2.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP?WCI=Online_consult_specimens_Searched&URL=ConsultSPEC

Hansenula holstii



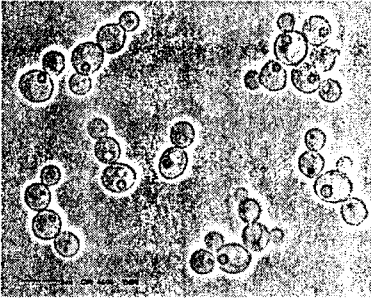
Hansenula holstii cbs 4140

http://www2.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP?WCI=Online_consult_specimens_Searched&URL=ConsultSPEC

Leucosporidium scottii

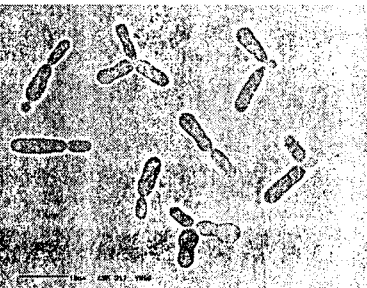
Leucosporidium scottii cbs 5930

http://www2.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP?WCI=Online_consult_specimens_Searched&URL=ConsultSPEC

Pichia philogaea

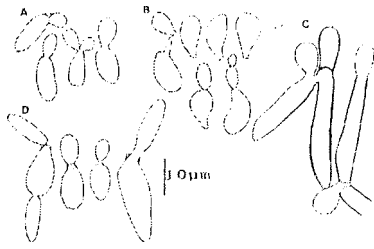
Pichia philogaea cbs 6696

http://www2.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP?WCI=Online_consult_specimens_Searched&URL=ConsultSPEC

Rhodotorula glutinis

Rhodotorula glutinis cbs 317

http://www2.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP?WCI=Online_consult_specimens_Searched&URL=ConsultSPEC

Udeniomyces puniceus

Sporobolomyces puniceus cbs 5689

http://www2.cbs.knaw.nl/yeast/WebC.ASP?WCI=Online_consult_specimens_Searched&URL=ConsultSPEC