



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**FUCOIDAN Y SUS OLIGOSACÁRIDOS COMO MODULADORES
DE SUPERVIVENCIA Y DE FACTORES DE VIRULENCIA
ASOCIADOS A *QUORUM SENSING* EN *Campylobacter jejuni***

Por:

Sharon Palafox Félix

TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Sharon Palafox Félix, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort
Directora de Tesis



Dra. Rosina Cabrera Ruiz
Integrante del comité de tesis



Dra. Verónica Mata Haro
Integrante del comité de tesis



Dr. José Andrei Sarabia Sainz
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Fucoïdan y sus Oligosacáridos como Moduladores de Supervivencia y de Factores de Virulencia Asociados a *Quorum Sensing* de *Campylobacter jejuni*” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Sharon Palafox Félix, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**
Coordinación de Programas Académicos


Dr. Pablo Wong-González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para realizar mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. y a la Coordinación de Ciencia de los Alimentos por permitirme realizar mis estudios de posgrado en sus instalaciones, además del apoyo económico otorgado.

Al financiamiento otorgado a través del proyecto A1-S-25043 “Síntesis y evaluación de antagonistas glicomiméticos para *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* enteropatogénica, transformando glicanos extraídos de algas marinas”.

A la Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfot por guiarme en la dirección de este trabajo. Además del apoyo y la empatía brindada durante estos tiempos difíciles de pandemia, y más que nada, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio.

A la Dra. Rosina Cabrera Ruiz por su guía y participación en la realización de este trabajo. Además, de su apoyo y atención durante mi estancia de investigación en Pachuca, Hidalgo.

A los miembros del comité de tesis, la Dra. Verónica Mata Haro y el Dr. Andre-i Sarabia Sainz, por su asesoría, recomendaciones y tiempo invertido en revisión del presente documento.

Al Dr. Alfonso García Galaz por capacitarme en las técnicas de crecimiento de *C. jejuni* y facilitarnos su área de trabajo.

A la M.C. Giovanna Sandoval Larios por capacitarme en las técnicas de obtención de oligosacáridos de fucoïdan por hidrólisis ácida, y su posterior caracterización por DLS y FTIR-ATR. Además de su guía y amistad brindada.

A la M.C. Ana María Guzmán Partida y a la Q.B. Rosa Idalia Armenta Corral por la atención y las diferentes capacitaciones recibidas para el manejo de equipo e interpretación de resultados.

A la Dra. Luz Vázquez Moreno y Plataforma Analítica Institucional (PAI-10363), por facilitar el uso de equipo e instalaciones para completar la realización de esta tesis.

Al Dr. José Ángel Huerta Ocampo, responsable del Laboratorio de Bioquímica de Proteínas y Glicanos por facilitarme materiales y reactivos, asesorarme y estar siempre al pendiente durante la pandemia.

A la Dra. Mayra de la Torre Martínez por facilitarme instalaciones e infraestructura durante mi

estancia de Investigación en la Coordinación del CIAD, Hidalgo.

A mis compañeros de maestría, especialmente a Carolina y Esmeralda, gracias brindarme su amistad incondicional, además de estar conmigo durante los momentos más difíciles.

A mis compañeros de laboratorio, Héctor, Martha, Lino y Ale, gracias por su ayuda y amistad.

A Zitaly y Doris, por brindarme su apoyo y amistad durante mi estancia en Pachuca.

A Oscar, Michel y Alexis, por su apoyo durante mi periodo en la maestría.

A mis mejores amigas Ytzayanna y Gabriela, gracias por su amistad y apoyo incondicional, además de enseñarme la importancia de la salud mental. Veo como hemos crecido juntas en cada paso en nuestra vida, y agradezco que cada vez nos acerquemos un poco más.

Agradezco a los médicos, enfermeras, científicos y personal indispensable que lucharon durante esta pandemia para mantener la esperanza. Por todas las personas que perdieron la batalla, y no lograron ver los avances contra esta enfermedad. Gracias.

Por último, pero no menos importante, les agradezco a mis pequeños de cuatro patas por acompañarme durante las noches de desvelo. Porque en lugar de nosotros rescatarlos, ellos me rescataron a mí, principalmente durante los tiempos difíciles en esta pandemia.

DEDICATORIA

A mis padres, pues siempre les agradeceré por permitirme enfocar en mis estudios, siempre apoyarme y estar para mí. Soy lo que soy gracias a sus esfuerzos y sacrificios.

A mis hermanitas, por su ayuda y cariño brindado durante mi vida.

A mi familia, que a pesar del distanciamiento, la pandemia nos enseñó la importancia de permanecer unidos.

A Julio, gracias por el apoyo y por acompañarme durante todos estos años, pero más que nada, gracias por hacerme una mejor persona.

“Esto también pasará”

2019-...

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
CONTENIDO	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
2.1. <i>Campylobacter jejuni</i>	15
2.1.1. Características Generales	15
2.1.2. Etiología, Incidencia e Importancia Económica.....	17
2.1.3. Patogenia en Humanos.....	18
2.1.4. Proceso de Infección y Mecanismos de Virulencia.....	18
2.2.3. Producción de Biopelículas en <i>Campylobacter jejuni</i>	20
2.3. Mecanismos de Comunicación en <i>Campylobacter jejuni</i> Relacionados con Factores de Virulencia.....	21
2.3.1. <i>Quorum Sensing</i> en <i>Campylobacter jejuni</i>	21
2.3.1.1. Regulación de Factores de Virulencia Mediada por <i>Quorum Sensing</i>	23
2.3.2. <i>Quorum Quenching</i> Dirigido a <i>Campylobacter jejuni</i>	23
2.3.2.1. Fucosa como Elementos del <i>Quorum Quenching</i>	24
2.4. Fucoïdan como Fuente de Fucosa para Modular Factores de Virulencia Asociados con <i>Quorum Sensing</i>	25
2.4.1. Fuente y Características Estructurales del Fucoïdan	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo General	27
4.2. Objetivos Específicos	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1. Materiales	28
5.2. Preparación de Oligosacáridos de Fucoïdan.....	28
5.2.1. Caracterización de Fucoïdan y sus Oligosacáridos por Dispersión Dinámica de la Luz	29
5.2.2. Análisis de Espectroscopía FTIR-ATR	29

CONTENIDO (continuación)

5.3. Cultivo de <i>Campylobacter jejuni</i>	30
5.4. Establecimiento de las Condiciones de Crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i>	30
5.5. Efecto del Fucoïdan y sus Oligosacáridos en el Crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i>	32
5.6. Efecto de Fucoïdan y sus Oligosacáridos Sobre Factores de Virulencia de <i>Campylobacter jejuni</i> Relacionados con <i>Quorum Sensing</i>	33
5.6.1. Ensayo de Formación de Biopelículas y su Caracterización.....	33
5.6.2. Ensayos de Movilidad Bacteriana	34
5.6.3. Ensayo de Adhesión.....	35
5.7. Análisis de Datos	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. Caracterización de Fucoïdan de <i>Ascophyllum nodosum</i>	37
6.2. Caracterización de los Oligosacáridos de Fucoïdan de <i>Ascophyllum nodosum</i>	39
6.3. Establecimiento de las condiciones de crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i>	41
6.4. Efecto de Fucosa, Fucoïdan y sus Oligosacáridos Sobre el Crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i>	44
6.5. Ensayo de Formación de Biopelículas y su Caracterización	47
6.5.1. Efecto de la presencia de fucoïdan y sus oligosacáridos en la formación de biopelículas	52
6.6. Movimiento Bacteriano de <i>Campylobacter jejuni</i>	54
6.7. Análisis de Adhesión.....	56
7. RESUMEN DE HALLAZGOS Y CONCLUSIÓN	58
7.1. Resumen de Hallazgos	58
7.2. Conclusión	58
7.3. Recomendaciones.....	58
8. REFERENCIAS	59
9. ANEXO	67
9.1. Ajuste de Curvas de Crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> en Presencia de Diferentes Concentraciones de Fucosa, Fucoïdan y Oligosacáridos de Fucoïdan.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) de <i>Campylobacter jejuni</i>	16
2 Diseño de experimento para determinar la cinética de crecimiento de <i>C. jejuni</i>	31
3 Diseño de experimento para determinar efecto de la adición de fucoïdan y sus oligosacáridos sobre la cinética de crecimiento de <i>C. jejuni</i>	32
4 Diseño de experimento para ensayos de formación de biopelícula de <i>C. jejuni</i>	33
5 Espectro FTIR-ATR típico de fucoïdan de <i>Ascophyllum nodosum</i>	38
6 Caracterización parcial de fucoïdan de <i>Ascophyllum nodosum</i>	39
7 Comparación de los espectros FTIR-ATR del fucoïdan nativo de <i>Ascophyllum nodosum</i> y sus hidrolizados.....	40
8 Curva de crecimiento de <i>C. jejuni</i> en caldo Brucella.....	43
9 Comportamiento del crecimiento de <i>Campylobacter jejuni</i> en caldo Brucella.....	44
10 Cinética de crecimiento de <i>C. jejuni</i> con diferentes concentraciones de fucosa, fucoïdan y oligosacáridos de fucoïdan.....	45
11 Cinéticas del crecimiento de <i>C. jejuni</i> comparando las diferentes concentraciones utilizadas de fucosa, fucoïdan y oligosacáridos de fucoïdan.....	46
12 Espectro FTIR-ATR típico para <i>C. jejuni</i> ATCC 43442.....	48
13 Formación de biopelículas de <i>C. jejuni</i> cultivado en medio Brucella, mediante la técnica del cristal violeta.....	49
14 Comparación entre los espectros FTIR-ATR típicos de <i>C. jejuni</i> ATCC 43442 y sus biopelículas.....	50
15 Micrografías de las biopelículas de <i>C. jejuni</i> a diferentes magnificaciones.....	51
16 Análisis composicional de las biopelículas de <i>C. jejuni</i>	52
17 Efecto del fucoïdan y sus oligosacáridos en la formación de biopelículas de <i>C. jejuni</i>	53
18 <i>Campylobacter jejuni</i> sembrado por estriado en placa en agar Brucella estándar y Muller Hinton estándar.....	54
19 Efecto de la presencia de fucosa, fucoïdan y oligosacáridos de fucoïdan en el fenotipo de movilidad de <i>Campylobacter jejuni</i>	55
20 Efecto de la presencia de fucoïdan y sus oligosacáridos en la adhesión de <i>C. jejuni</i> a p-xileno.....	57

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Condiciones para la evaluación de fenotipos de movilidad en <i>C. jejuni</i>	34
2	Caracterización de los oligosacáridos de fucoïdan por dispersión dinámica de la luz.....	41
3	Composición de los medios de cultivo.....	42
4	Diferencias entre tratamientos de la velocidad específica de crecimiento de las cinéticas de <i>C. jejuni</i>	47

RESUMEN

Campylobacter jejuni es el principal agente etiológico de la gastroenteritis infecciosa humana en el mundo. Afecta a todas las personas, aunque los niños, ancianos y personas inmunocomprometidas, son más susceptibles. Causa diarrea, vómito y fiebre y en algunos casos, desencadena complicaciones neurológicas. Estos microorganismos se comunican e interactúan mediante *quorum sensing* (QS), coordinando su crecimiento y activando genes implicados en la expresión de factores de virulencia como formación de biopelículas, motilidad y adherencia. El QS puede bloquearse a partir del *quorum quenching* (QQ), atenuando dichos factores. Entre los candidatos a QQ se encuentra la fucosa y otras sustancias fucosiladas, debido a que han demostrado actuar como quimioatrayentes y receptores de adhesión para *C. jejuni*. En contraparte, existen reportes de que la fucosa puede ser utilizada como fuente de carbono del patógeno, promoviendo su crecimiento. En esta tesis se estudió el efecto de la presencia de fucoïdan, oligosacáridos de fucoïdan (OFuc) y fucosa sobre el crecimiento, formación de biopelículas, motilidad y adhesión de *C. jejuni*. Los OFuc se obtuvieron mediante hidrólisis ácida controlada; sus espectros de infrarrojo mostraron gran similitud con los del fucoïdan, evidenciando la disminución de grupos sulfato. El tamaño coloidal del fucoïdan fue de 750 ± 42 nm y el de los OFuc de 757 ± 68 nm. El fucoïdan presentó carga superficial de -66.6 ± 0.5 mV, en cambio, la carga de los OFuc fue de -44.5 ± 10.4 mV. No se observó efecto en el crecimiento de *C. jejuni* en presencia de diferentes concentraciones (5-100 $\mu\text{g/mL}$) de fucosa u OFuc, mientras que el fucoïdan disminuyó la tasa de velocidad de crecimiento del patógeno, a concentraciones mayores a 25 $\mu\text{g/mL}$. Todas las curvas de crecimiento se ajustaron a un modelo de crecimiento exponencial. La formación de biopelículas fue atenuada en presencia de fucoïdan y OFuc en modo concentración dependiente, lo mismo que la adherencia del patógeno. Por otro lado, la presencia de los compuestos fucosilados no tuvo efecto en los fenotipos de motilidad del patógeno (swimming, swarming y fitness) ni a ninguna de las concentraciones (5-100 $\mu\text{g/mL}$) de las moléculas estudiadas. Estos resultados son un indicio de que el fucoïdan y los OFuc podrían estar modulando procesos de QS en *C. jejuni*. Sin embargo, se requiere de mayores estudios para probarlo.

Palabras clave: *Campylobacter jejuni*, virulencia, biopelículas, *quorum sensing*, compuestos fucosilados.

ABSTRACT

Campylobacter jejuni is the main etiological agent of human infectious gastroenteritis in the world. It affects all people, although children, the elderly, and immunocompromised people are more susceptible. It causes diarrhea, vomiting, and fever, and in some cases, triggers neurological complications. These bacteria communicate and interact through *quorum sensing* (QS), coordinating their growth and activating genes involved in the expression of virulence factors such as biofilm formation, motility, and adherence. QS can be blocked from *quorum quenching* (QQ), mitigating these virulence factors. Among the QQ candidates are fucose and other fucosylated substances, since they have been shown to act as chemo-attractants and adhesion receptors for *C. jejuni*. On the other hand, there are reports that fucose can be used as a carbon source for the pathogen, promoting its growth. The effect of the presence of fucoidan, fucoidan oligosaccharides (OFuc) and fucose on the growth, biofilm formation, motility, and adhesion of *C. jejuni* were evaluated in this thesis. The OFuc were obtained by controlled acid hydrolysis; their infrared spectra showed great similarity with those of fucoidan, showing the decrease of sulfate groups. The particle size of the fucoidan was 750 ± 42 nm and that of the OFuc was 757 ± 68 nm. The fucoidan presented surface charge of -66.6 ± 0.5 mV, while the charge of the OFuc was -44.5 ± 10.4 mV. No effect was observed on the growth of *C. jejuni* in the presence of different concentrations (5-100 $\mu\text{g/mL}$) of fucose or OFuc, while fucoidan decreased the growth rate of the pathogen at concentrations greater than 25 $\mu\text{g/mL}$. All growth curves were fitted to an exponential growth model, using GraphPad Prism software. Biofilm formation was attenuated in the presence of fucoidan and OFuc in a concentration-dependent manner, as was pathogen adherence. On the other hand, there was no effect on the motility phenotypes of the pathogen (swimming, swarming and fitness) neither in the controls nor at any of the concentrations (5-100 $\mu\text{g/mL}$) of the studied molecules. These results are an indication that fucoidan and OFuc could be modulating QS processes in *C. jejuni*. However, further studies are required to prove it.

Key words: *Campylobacter jejuni*, virulence factors, biofilms, *quorum sensing*, fucosylated compounds

1. INTRODUCCIÓN

Campylobacter jejuni es el principal agente etiológico de la gastroenteritis infecciosa humana a nivel mundial. Produce la enfermedad denominada campilobacteriosis que, en la mayoría de los casos, presenta una duración de 3 a 6 días, en los cuales, la rehidratación es determinante para la recuperación del paciente. A pesar de estos cuidados, la infección puede complicarse derivando en enfermedades como colecistitis, pancreatitis, peritonitis y hemorragia gastrointestinal (OMS, 2018). También pueden presentarse complicaciones neurológicas, como los síndromes de Guillain-Barré y Miller Fisher (Kaakoush *et al.*, 2015a; Igwaran y Okoh, 2019). Este patógeno forma biopelículas en superficies abióticas y en los alimentos contaminados; dichas biopelículas, le permiten sobrevivir en ambientes hostiles, mientras puede ingresar a los organismos que infectan (Reeser *et al.*, 2007). Una vez dentro del organismo humano, *C. jejuni* se adhiere a los enterocitos del yeyuno y del íleon, como primer mecanismo de infección. La bacteria cuenta con un sistema sensor de moléculas quimioatrayentes y de uno a dos flagelos polares móviles, que lo dirigen hacia los sitios de infección; la fucosa actúa como molécula quimioatrayente (Dwivedi *et al.*, 2016). Una vez que alcanza yeyuno e íleon, *C. jejuni* se adhiere al intestino, a través de un biorreconocimiento bioquímico establecido por sus adhesinas superficiales, que reconocen receptores moleculares localizados en la superficie de la membrana plasmática de los enterocitos. En *C. jejuni*, se han documentado adhesinas que reconocen proteínas y otras que reconocen carbohidratos complejos o glicanos, entre los que se encuentran moléculas fucosiladas (Mahdavi *et al.*, 2014). La formación de biopelículas y los mecanismos de virulencia de *C. jejuni*, están ligados a los sistemas de *quorum sensing* (QS) de la bacteria. El QS es un conjunto de sistemas de comunicación célula – célula, que permiten la regulación de la expresión génica bacteriana en respuesta a la densidad celular. El QS puede controlarse en presencia de moléculas específicas (efecto *quorum quenching*, QQ) afectando la comunicación bacteria-bacteria y, para el caso específico de este trabajo, modulando la formación de biopelículas y los factores de virulencia de *C. jejuni*. Una molécula candidata para el QQ es la fucosa, que, para el caso del patógeno en estudio, ha demostrado interferir con la formación de biopelículas, actuar como quimioatrayente y ser reconocida por las adhesinas tipo lectina FlaA (en inglés, major flagella subunit protein) y MOMP (en inglés, outer membrane protein), ubicadas en la superficie del patógeno (Ruiz-Palacios *et al.* 2003; Mahdavi *et al.*, 2014).

Una fuente natural de fucosa es el fucoïdan de las algas pardas, es por ello que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del fucoïdan y sus oligosacáridos en la supervivencia y factores de virulencia asociados a *quorum sensing* en *Campylobacter jejuni*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Campylobacter jejuni*

2.1.1. Características Generales

El orden *Campylobacterales* está constituido por las familias *Campylobacteraceae*, *Nautiliaceae*, *Hydrogenimonaceae* y *Helicobacteraceae*; pertenece a la clase *Epsilonproteobacterias*, filo de Proteobacterias (Vandamme *et al.*, 2005; Lastovica *et al.*, 2014). El género de *Campylobacter* (del griego, bacilo curvo), está compuesto por bacterias Gram-negativas, caracterizadas por su morfología bacilar delgada, curva o en espiral, con dimensiones que varían entre 0.2 a 0.8 μm de ancho y 0.5 a 5 μm de largo, dependiendo de la especie (Keener *et al.*, 2004). Algunas especies son móviles, debido a la presencia de uno o dos flagelos bipolares. Como excepciones se encuentran *C. showae*, que es multiflagelada y *C. gracilis* y *C. hominis* que carecen de flagelo y por tanto son inmóviles (Lastovica *et al.*, 2014; Bolton, 2015; Kaakoush *et al.*, 2015b).

Existe controversia respecto al número de especies dentro del género de *Campylobacter*. Inicialmente, este género fue clasificado como *Vibrio* spp. por formar bacilos en espiral. Los avances en la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal y los análisis filogenéticos, reorganizaron la taxonomía de *Campylobacter* obteniendo su clasificación actual (Fonseca *et al.*, 2016). Lastovica *et al.* (2014), declaran que el género de *Campylobacter* comprende 20 especies y 11 subespecies. Otros autores describen 16 especies y 6 subespecies (On, 2001). Clasificaciones más recientes establecen que el género *Campylobacter* contiene 26 especies y 9 subespecies. De estas, 12 se consideran patógenas, las más importantes son *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. concisus*, *C. curvus* y *C. lari* (Bhunja, 2018).

C. jejuni es un patógeno entérico comúnmente identificado en alimentos y agua contaminados. Según las estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se encuentra entre las cuatro principales causas de diarrea y es la principal causante de gastroenteritis a nivel mundial (OMS, 2018). Es una especie termófila, que crece entre 37 y 42 °C (Keener *et al.*, 2004). Sin embargo,

existe evidencia de que puede sobrevivir a temperaturas de congelación (Kim *et al.*, 2017). Por otro lado, es capaz de crecer en un rango de pH de 4.9 a 9.0, siendo el rango óptimo un pH de 6.5 a 7.5 (Keener *et al.*, 2004).

C. jejuni es una bacteria móvil, microaerófila, zoonótica y termófila, que no esporula. Su forma característica es la de un bacilo delgado y curvo (Figura 1), aunque también se describen formas de S, espirales y cocoides. La forma cocoide se observa en cultivos viejos o en condiciones de estrés (Vandamme *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011). Esta bacteria mide entre 0.5 y 5 μm de longitud con un diámetro entre 0.2 y 0.5 μm (Vandamme *et al.*, 2005); cuenta con uno o dos flagelos polares que le dan movilidad y le permiten adherirse al intestino delgado (Igwaran y Okoh, 2019). Requiere una atmósfera especial de 5% de O_2 , 10% de CO_2 y 85% de N_2 para crecer en condiciones de laboratorio (Vandamme *et al.*, 2005). Es un microorganismo ureasa negativo, oxidasa y catalasa positivos. Su principal fuente de energía son los aminoácidos. Puede hidrolizar hipurato, indoxilo, acetato y reduce nitratos. Sin embargo, no puede oxidar o fermentar carbohidratos (Vandamme *et al.*, 2005).

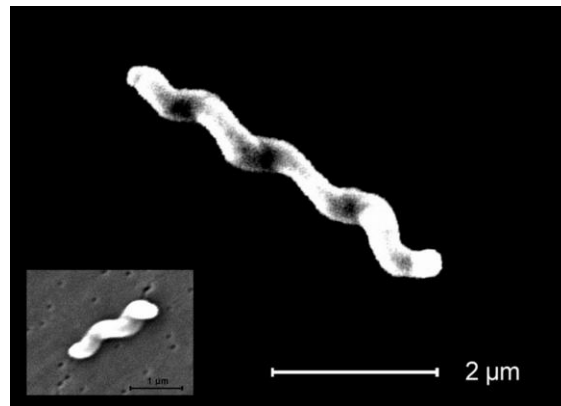


Figura 1. Imagen de microscopio electrónico de barrido (SEM) de *Campylobacter jejuni*. Fuente: Carr (2011).

Algunas cepas de *C. jejuni* presentan resistencia a antibióticos betalactámicos de amplio espectro como las cefalosporinas, ampicilina, carbenicilina y piperacilina. Además, la mayoría de las cepas son resistentes a la cefalotina y a las fluoroquinolonas (Keener *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2018). Este patógeno es ampliamente adaptable a diferentes condiciones ambientales, pero es sensible al oxígeno y a la deshidratación (Keener *et al.*, 2004).

2.1.2. Etiología, Incidencia e Importancia Económica

Campylobacter jejuni se transmite por zoonosis y por vía fecal-oral; los animales infectados y sus productos (carne, leche) son la principal vía de transmisión. Las aves son el reservorio principal y, por tanto, el mayor problema se presenta por consumo de pollo contaminado. El agua y los alimentos contaminados por heces o por manipuladores de alimentos portadores del patógeno, también pueden ser una vía de transmisión. La transmisión de humano a humano es inusual (Acheson y Allos, 2001; OMS, 2018). *C. jejuni* es la especie responsable del 95% de los brotes epidémicos y esporádicos de campilobacteriosis (Bhunja, 2018). La dosis mínima infectiva de *C. jejuni* es de 360 UFC. El síntoma de diarrea puede presentarse en una dosis de 800 UFC (Kaakoush *et al.*, 2015a).

C. jejuni es la causa más común de gastroenteritis aguda en lactantes e infantes menores de 2 años, tanto en México como en el mundo (Larrosa-Haro *et al.*, 2010). Sin embargo, la tasa de infección varía por país y por región debido a diferencias en el grado de industrialización, en la susceptibilidad, prácticas higiénicas y alimentarias de cada población y, en la disponibilidad de reservorios naturales para el patógeno. Las metodologías de detección, el alcance del perfil de caso estudiado y la rigurosidad de los protocolos de control, también influyen en las estadísticas reportadas (Kaakoush *et al.*, 2015a).

La infección por *C. jejuni* tiene gran importancia económica, tanto por la incapacidad temporal que provoca y que se ve reflejada en ausentismo escolar y laboral, como por las pérdidas económicas debidas al retiro de alimentos contaminados (Bolton, 2015). En México, Zaidi *et al.* (2012) demostraron una contaminación significativa con *C. jejuni*, en carne de pollo y res; también encontraron contaminación de ensaladas listas para consumir. Una preocupación adicional es el aumento en la resistencia a antibióticos observado en las especies de *Campylobacter*, especialmente a la ciprofloxacina (Zaidi *et al.*, 2012). La suma de estos hechos revela la necesidad de encontrar alternativas para el control de la infección por *C. jejuni*.

2.1.3. Patogenia en Humanos

La infección por *C. jejuni* se caracteriza por diarrea aguda, frecuentemente sanguinolenta, fiebre y dolor abdominal (Acheson y Allos, 2001). Normalmente, la enfermedad tiene una duración de 3 a 6 días, siendo la hidratación constante el tratamiento más frecuente. Sin embargo, debe darse un seguimiento puntual a la evolución del paciente, ya que algunos de estos, pueden desarrollar complicaciones como colecistitis, pancreatitis, peritonitis y hemorragia gastrointestinal masiva. En estos casos se recomienda tratamiento con antibióticos (Acheson y Allos, 2001; OMS, 2018). Un reducido número de pacientes presenta complicaciones extraintestinales que derivan en meningitis, endocarditis, artritis reactiva, osteomielitis y sepsis neonatal (Acheson y Allos, 2001). La complicación neurológica más importante desencadenada por *C. jejuni* es el síndrome de Guillain-Barré (Igwaran y Okoh, 2019). Debido a lo anterior, es importante conocer los mecanismos de infección y virulencia de este patógeno. En este sentido, los fenómenos de colonización, adhesión, invasión y producción de toxinas, así como la glicosilación, y la motilidad mediada por flagelos, están muy relacionados con la patogenicidad de *C. jejuni* (Lastovica *et al.*, 2014).

2.1.4. Proceso de Infección y Mecanismos de Virulencia

La patogenicidad de *Campylobacter* se basa en la expresión de diferentes factores de virulencia de naturaleza variable, relacionados con factores intrínsecos (genéticos) y extrínsecos, como ciertas situaciones de estrés (Igwaran y Okoh, 2019). La infección por este patógeno está mediada por mecanismos de adherencia, colonización, invasión y producción de toxinas. Además, *C. jejuni* es la única bacteria conocida al momento, capaz de utilizar la N-glicosilación de su flagelo, para unirse a más de 30 proteínas de las células epiteliales del hospedero (Lastovica *et al.*, 2014). Actualmente existen investigaciones que han demostrado la capacidad de *C. jejuni* para adherirse y colonizar una serie de líneas celulares cultivadas *in vitro* (Wang *et al.*, 2015; John *et al.*, 2017). Los factores determinantes de la virulencia de *C. jejuni*, incluyen quimiotaxis, motilidad mediada por flagelo, adherencia bacteriana a la mucosa intestinal, producción de enterotoxinas y citotoxinas,

además de la regulación de la captación de hierro (Silva *et al.*, 2011; Perez-Perez y Kienesberger, 2013).

Los flagelos de *Campylobacter* le permiten una rápida motilidad (Fonseca *et al.*, 2016). En *C. jejuni*, el flagelo responde a quimiotaxis, actuando como sensor para aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta y otros componentes presentes en el microambiente. Tanto la quimiotaxis como la proteína flagelina, dirigen a la bacteria al sitio de colonización facilitando la invasión de la célula hospedera (Bolton, 2015; Igwaran y Okoh, 2019). *Campylobacter* utiliza el mecanismo de quimiotaxis para localizar quimioatrayentes primarios como mucinas que son el constituyente principal de la mucosa intestinal. En la mucina humana y en la superficie de las células epiteliales, puede encontrarse L-fucosa, la cual es el único quimioatrayente tipo carbohidrato para *C. jejuni* (Dwivedi *et al.*, 2016). Otros quimioatrayentes descritos son sustratos metabólicos como: α -cetoglutamato, L-aspartato, L-asparagina, L-cisteína, L-glutamato, piruvato, L-serina (Bolton, 2015). Asimismo, se ha demostrado que *C. jejuni* se une a estructuras fucosiladas (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2009) y esta unión es inhibida por estructuras que contienen fucosa, como los oligosacáridos de la leche humana (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003).

El flagelo de *C. jejuni* está compuesto por dos flagelinas homólogas, FlaA y FlaB. La flagelina principal, FlaA, es la responsable de la adherencia, colonización del tracto gastrointestinal e invasión de las células hospederas. El flagelo también secreta al antígeno invasivo de *C. jejuni* (Cia) que se exporta hasta el citosol de las células hospederas. Esto facilita la unión del patógeno jugando un papel importante en la adhesión e invasión a las células hospederas, en la secreción de proteínas, la auto aglutinación y en la formación de biopelículas (Lastovica *et al.*, 2014; Fonseca *et al.*, 2016).

La adhesión bacteriana es el primer paso de la infección; *C. jejuni* se une a las células epiteliales por medio de adhesinas expresadas en la superficie del patógeno (Bolton, 2015). Esto desencadena una serie de eventos patogénicos, que incluyen la invasión intracelular, translocación a través de la barrera intestinal, interacción con las células inmunes e inducción de daño a los tejidos del hospedador (Kaakoush *et al.*, 2015b). Las principales adhesinas de *C. jejuni*, involucradas en la adhesión son JlpA y CadF; CadF reconoce a fibronectina mientras que JlpA se une a la proteína de choque térmico Hsp 90 (Bolton, 2015; (Kaakoush *et al.*, 2015b). Después de la adhesión se lleva a cabo el proceso de invasión, el cual aún no ha sido completamente elucidado. Algunas investigaciones sugieren que *C. jejuni* induce la apertura de la membrana, seguido de la entrada a

la célula hospedera, primero con su punta flagelar y luego por el extremo flagelar opuesto (Ó Cróinín y Backert, 2012).

Existen tres tipos principales de reconocimientos adhesina-receptor: las interacciones proteína-proteína, hidrofobina-proteína y lectina-carbohidrato (Abraham *et al.*, 2015). Esta última, se encuentra especialmente presente en bacterias patógenas Gram-negativas. Los patógenos expresan adhesinas tipo lectina que reconocen receptores celulares como primer paso de la infección (Tiralongo y Moran, 2010; Abraham *et al.*, 2015). Las lectinas son proteínas que reconocen glicanos de manera específica. Al igual que otras proteínas de unión a carbohidratos, las lectinas se unen a sus ligandos mediante una red de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, estableciendo interacciones reversibles (Sharon y Lis, 2007).

Ruiz-Palacios *et al.* (2003) han demostrado que la adhesina CA-A de *Campylobacter jejuni* reconoce fucosa. También existe evidencia de que FlaA y MOPs se unen a fucosa (Mahdavi *et al.*, 2014). Otros estudios indican que estructuras fucosiladas presentes en los glicanos de la leche humana, pueden inhibir la adhesión. Con base a lo anterior, resulta factible que pueden desarrollarse agentes anti-adhesivos, para prevenir o controlar infecciones (Tiralongo y Moran, 2010).

2.2.3. Producción de Biopelículas en *Campylobacter jejuni*

C. jejuni forma biopelículas en superficies abióticas y en la superficie de alimentos contaminados. Este mecanismo de protección le permite sobrevivir a diferentes condiciones de estrés ambiental, como el estrés oxidativo mediado por la tensión del O₂ atmosférico, manteniéndolo viable hasta que pueda infectar al organismo vivo (Bronnec *et al.*, 2016). Por ello, la formación de películas de *C. jejuni* se considera como un factor de virulencia. Lo mismo ocurre con otros patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli* enteropatógena (Bronnec *et al.*, 2016; Dwivedi *et al.*, 2016).

Las biopelículas son capas multicelulares de bacterias incrustadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares. En *C. jejuni* forma biopelículas adheridas a superficies sólidas, películas en superficies líquidas o agregados que flotan en cultivos líquidos (Joshua *et al.*, 2006).

Hasta el momento, no hay evidencia concluyente de formación de biopelículas en el intestino durante la infección. Esto se justifica debido a las observaciones de que no hay producción de biopelículas cuando el microorganismo contiene todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Por ejemplo, medios ricos en nutrientes, como los caldos Brucella y Bolton, inhiben la formación de biopelículas (Reeser *et al.*, 2007), mientras que la presencia de materiales orgánicos y la bioincrustación inducen su formación (Brown *et al.*, 2014). La exposición a altas temperaturas y la tensión de oxígeno también inducen la formación de biopelícula (Reeser *et al.*, 2007).

La adhesión y formación de biopelículas de *C. jejuni* a superficies abióticas involucra estructuras altamente glicosiladas (Sulaeman *et al.*, 2012). Por ello, se ha observado que algunos carbohidratos interfieren con la formación de biopelículas en las superficies; por ejemplo, la L-fucosa (Dwivedi *et al.*, 2016). Asimismo, se ha demostrado que la formación de biopelículas de *C. jejuni* está mediada por el mecanismo de *quorum sensing*, gracias a las investigaciones realizadas en el gen *luxS* de *C. jejuni*, donde se confirmó que mutantes deficientes de este gen presentaron una reducción en la producción de biopelículas (Šimunović *et al.*, 2020).

2.3. Mecanismos de Comunicación en *Campylobacter jejuni* Relacionados con Factores de Virulencia

2.3.1. *Quorum Sensing* en *Campylobacter jejuni*

Además de adaptarse al ambiente que las rodea, las bacterias tienen la capacidad de establecer comunicación entre las células de su especie, regulando sus respuestas fisiológicas en base a la densidad o concentración de dichas células circundantes (Elvers y Park, 2002). Este mecanismo de comunicación célula-célula se conoce como *quorum sensing* (QS). El QS implica la síntesis, secreción y detección de moléculas de señalización extracelulares, denominadas autoinductores (AI) (Papenfort y Bassler, 2016). El fenómeno se presenta cuando la bacteria alcanza un umbral de densidad celular, y, por ende, un umbral de moléculas de señalización. En este momento, los AI se

unen a proteínas específicas de la superficie bacteriana, induciendo una cascada de señalización que da como resultado un cambio coordinado en sus perfiles de expresión genética. Entre los procesos bacterianos, regulados por QS se encuentran: bioluminiscencia, expresión de factores de virulencia, esporulación, producción de antibióticos, movilidad, competencia, conjugación, producción de metabolitos secundarios y la formación de biopelículas (Castillo-Juárez *et al.*, 2015; Papenfort y Bassler, 2016).

En las bacterias Gram-negativas, los AI son mayoritariamente *N*-acil homoserin lactonas (N-AHL o sus derivados), y se denominan AI-1. Éstos interactúan con receptores específicos membranales o citoplasmáticos, para desencadenar una respuesta celular, mediante la regulación de la expresión génica (Galloway *et al.*, 2011). Al activarse el QS se estimula también un aumento en la síntesis de AI-1s, estableciéndose un ciclo continuo de señalización, que promueve la expresión génica sincrónica en la población bacteriana (Papenfort y Bassler, 2016; Subramani y Jayaprakashvel, 2019; Šimunović *et al.*, 2020). Otro tipo de autoinductores son los AI-2, sintetizados por la enzima S-ribosilhomocisteína liasa (LuxS). Los AI-2 funcionan como señal universal para mediar la comunicación entre la misma especie y entre otras especies (Bassler, 2002). Sin embargo, la estructura molecular de las AI-2 también puede ser especie-específica y, por tanto, las señales que emiten estas moléculas resultan en lenguajes bioquímicos específicos para cada especie. Este hecho complica la comprensión y elucidación de los mecanismos de QS (Teren *et al.*, 2019).

Los estudios de QS en *C. jejuni* son limitados y en algunos casos, contradictorios. Elvers y Park (2002) involucraron por primera vez al sistema LuxS, utilizando AI-2 como molécula señal, relacionándola con la expresión de algunos factores de virulencia. Por otro lado, Moorhead y Griffiths (2011) aislaron un homólogo de AI-1 en las cepas *C. jejuni* 81-176 y *C. jejuni* c11 (aisladas en carne de pollo). Los análisis de espectrometría de masas confirmaron la presencia del anillo de homoserinlactona (estructura típica de AI-1), pero sin el residuo *N*-acilado. Esta molécula se denominó cjA; cuando se aísla y añade a cultivos de *C. jejuni* tiene un impacto significativo en la formación de biopelículas y en la expresión de los factores de virulencia del patógeno. Esto implica que tanto autoinductores AI-1 como AI-2 pueden estar actuando en el QS de *C. jejuni*.

La producción de AI-2 en *Campylobacter* se describió primero para *C. jejuni* NCTC 11168 y hasta la fecha, se ha demostrado para otras 14 especies de *Campylobacter* spp. (Gözl *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha detectado en *C. lari*, *C. peloridis* y *C. insulaenigrae*. En *C. jejuni* se ha

demostrado que el nivel de AI-2 aumenta en el sobrenadante durante la fase tardía de crecimiento exponencial y disminuye durante la entrada a la fase estacionaria (Cloak *et al.*, 2002; Quinones *et al.*, 2009).

2.3.1.1. Regulación de Factores de Virulencia Mediada por *Quorum Sensing*. Los procesos de patogénesis de *C. jejuni* dependen de la expresión de factores de virulencia, regulados por mecanismos de QS (Zhang y Li, 2016). Existe evidencia de la intervención del sistema LuxS/AI- en la regulación de la expresión de genes en *C. jejuni*, relacionados con la motilidad, autoaglutinación, expresión de la toxina distorsionadora citoletal, síntesis de flagelos, estrés oxidativo y colonización de la bacteria en animales (Elvers *et al.*, 2002; Plummer *et al.*, 2011; Reeser *et al.*, 2007). Plummer (2012) y Šimunović *et al.* (2020) demostraron que mutantes de *C. jejuni* deficientes en luxS forman biopelículas más débiles, tienen menor motilidad, y mayor sensibilidad al estrés oxidativo y, además, presentan menor adherencia e invasión a células de la línea Caco-2. Al estudiar estos mutantes *in vivo*, observaron una menor colonización en el intestino de pollos y animales de laboratorio, en comparación con las bacterias silvestres. En el caso de la adhesión, el efecto dependió de la temperatura de la temperatura de incubación. Otros estudios relacionan la respuesta mediada por AI-2 al medio ambiente en el que se encuentra el patógeno (Teren *et al.*, 2019). Debido a lo anterior, es importante realizar investigación complementaria para contribuir a la comprensión de este fenómeno.

2.3.2. Quorum Quenching Dirigido a *Campylobacter jejuni*

El *quorum quenching* (QQ) se define como el proceso de inhibición del mecanismo de *quorum sensing* en las comunidades bacterianas (Turan y Engin, 2018). En *Pseudomonas aeruginosa* se han reportado algunos inhibidores del QS, como las lactonasas/acilasas, que degradan a los AI-1, además de moléculas análogas a los autoinductores, que bloquean las señales (Lesic *et al.*, 2007). Por otro lado, en *Vibrio harveyi*, la presencia de furanonas bromadas bloquea los tres canales del sistema de QS (Defoirdt *et al.*, 2007).

Respecto a *C. jejuni*, Castillo *et al.* (2015) demostraron que el galato de epigallocatequina (EGCG), un compuesto extraído del té verde, inhibe la motilidad de la bacteria, disminuyendo la capacidad infectiva de *C. jejuni*, (Rodrigues *et al.*, 2016). Por otro lado, complejos de inclusión de resveratrol-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina (IC) inhiben la formación de biopelículas y promueven la dispersión de *C. jejuni*. Otros compuestos inhibidores son las furanonas bromadas, derivadas del alga *Delisea pulchra* y del té verde (Castillo *et al.*, 2015). Aunque estas resultan menos efectivas que las furanonas sintéticas y no han sido probadas en *C. jejuni* (Castillo *et al.*, 2014). Por otro lado, Bezek *et al.* (2016), observaron una reducción en la formación de biopelícula y adherencia de *C. jejuni*, en presencia de extractos de la planta *Euodia ruticarpa* y Šimunović (2020), demostraron que los extractos de *Sedum rosea* (Rodhiola) inhiben en un 96 %, la adherencia de *C. jejuni* a superficies de poliestireno y reducen su motilidad.

2.3.2.1. Fucosa como Elementos del *Quorum Quenching*. Algunas investigaciones muestran que la L-fucosa puede actuar inhibiendo el QS en *Pseudomonas aeruginosa*. Kandasamy *et al.* (2015) probaron que la presencia de fucosa obtenida a partir de polisacáridos de *Ascophyllum nodosum* mejoró la supervivencia de *Caenorhabditis elegans* infectado con *P. aeruginosa* PA14, disminuyendo, además, la capacidad de formación de biopelículas y la motilidad del patógeno. Por otro lado, Johansson *et al.* (2008) y Sommer *et al.* (2018), demostraron que la L-fucosa bloquea la adhesina tipo lectina LecB (antiguamente conocida como PA-IL y PA-IIL) de *P. aeruginosa*, la cual se encuentra regulada por QS. Esta adhesina, regula la adherencia y formación de biopelículas, por lo cual se logró bloquear eficazmente la formación de biopelícula de *P. aeruginosa in vitro*. Existen muy pocos estudios que relacionan a la fucosa como elemento de QQ en *Campylobacter jejuni*. Dwivedi *et al.* (2016) demostraron que la utilización de L-fucosa, con una concentración de 25 mM en caldo MH, reduce en un 50%, la formación de biopelículas en superficies de borosilicato. Sin embargo, al ser la fucosa, el único carbohidrato quimioatrayente de *C. jejuni* y al expresar este patógeno adhesinas que lo reconocen, es posible suponer que la presencia de fucosa pueda modular a los mecanismos de QS.

2.4. Fucoïdan como Fuente de Fucosa para Modular Factores de Virulencia Asociados con *Quorum Sensing*

2.4.1. Fuente y Características Estructurales del Fucoïdan

El fucoïdan es un heteropolisacárido sulfatado de alta masa molecular, constituido principalmente por fucosa, que pueden encontrarse unidos por enlaces α (1 \rightarrow 2). Este polisacárido es un constituyente de la pared celular de las algas pardas de la clase *Phaeophyceae* y también se encuentra en algunos tejidos de equinodermos, como los erizos de mar (Jiao *et al.*, 2011; Fitton *et al.*, 2015). Algunos de los residuos de fucosa pueden estar sulfatados (SO_3^-) en el C-2 o C-4, y raramente en C-3; el grado de sulfatación depende del fucoïdan de cada especie; esta modificación le imparte a la molécula de fucoïdan una carga negativa (Ale *et al.*, 2011). Otros monosacáridos presentes en la molécula pueden ser galactosas unidas a las fucosas mediante enlaces β (1 \rightarrow 6) y ramificaciones con manosas, unidas mediante enlace β (1 \rightarrow 2) (Ale *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2011). Además, pueden estar presentes glucosa, ácido glucurónico y xilosa. Es importante mencionar que todos estos monosacáridos se encuentran en proporciones muy pequeñas y que su presencia y concentración depende de la especie de alga de donde se extraiga (Van Weelden *et al.*, 2019).

En la actualidad el interés por el fucoïdan se ha centrado en sus propiedades bioactivas, tales como, sus efectos anticoagulantes, antivirales, antiinflamatorias, antitumorales, inmunomoduladoras y antioxidantes y antiinflamatorias (Fitton *et al.*, 2019). En este estudio, nos concentraremos en otras actividades menos estudiadas como la capacidad de modular el QS. Las principales fuentes comerciales de fucoïdan son las algas *Laminaria digitata*, *L. clustoni* y *Ascophyllum nodosum*. Otras fuentes que están en continuo estudio son *Macrocystis pyrifera*, *Himanthalia lorea*, *Cladosiphon okamuranus*, *Adenocystis utricularis*, *Sargassum stenophyllum*, *Sargassum linifolium*, *Fucus vesiculosus* y *F. spirales* (Jiao *et al.*, 2011). En este estudio nos concentraremos en el fucoïdan de *A. nodosum* por ser una de las fuentes más disponibles.

3. HIPÓTESIS

El fucoidan y sus oligosacáridos modulan la supervivencia y factores de virulencia de *Campylobacter jejuni*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar el efecto del fucoïdan y sus oligosacáridos en la supervivencia y factores de virulencia asociados a *quorum sensing* en *Campylobacter jejuni*.

4.2. Objetivos Específicos

Obtener oligosacáridos a partir de fucoïdan de *Ascophyllum nodosum* mediante hidrólisis ácida controlada y caracterizarlos por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier y reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) y dispersión dinámica de la luz (DLS).

Determinar el efecto del fucoïdan y sus oligosacáridos, en el crecimiento de *Campylobacter jejuni* ATCC 43442.

Evaluar el efecto de la presencia de fucoïdan y sus oligosacáridos en la formación de biopelículas

Evaluar el efecto de la presencia de fucoïdan y sus oligosacáridos sobre la adherencia y motilidad de *Campylobacter jejuni*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

La cepa utilizada en el presente estudio fue *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (ATCC 43442) aislada de heces de humano, la cual se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC). El fucoïdan de *Ascophyllum nodosum* se adquiri3 de Carbosynth Ltd (United Kingdom). Los caldos Brucella y Muller-Hinton (MH) para el cultivo de *C. jejuni* se obtuvieron de Becton, Dickinson & Company (BD) (Franklin Lakes, NJ, EUA). El sistema generador de gas, las bolsas CampyGen, anaerogen y los clips de sellado para el cultivo de *C. jejuni*, se adquirieron en Hardy diagnostics (Santa María, CA, EUA). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado reactivo obteniéndose de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), a menos que se especifique lo contrario.

5.2. Preparaci3n de Oligosacáridos de Fucoïdan

Los oligosacáridos de fucoïdan (OFuc) se prepararon de acuerdo al método de Oliveira *et al.* (2017), con algunas modificaciones. Se ańadieron 2 mL de HCl 0.03 N a 40 mg de fucoïdan de *A. nodosum*, agitando en intervalos de 2 min en v3rtex con velocidad moderada, hasta su completa disoluci3n. La mezcla se incub3 a 100 3C durante 3 h en bańo maría con agitaci3n continua. Al t3rmino de este periodo se detuvo la reacci3n trasladando los tubos a hielo con sal, durante 10 min y neutralizando con NaOH 0.01 N. En seguida se centrifug3 (Costar, mini centrifuge, DC, USA) a 5585 x g durante 20 min a 25 3C para obtener el sobrenadante, 3ste se congel3 a -40 3C durante 30 h, se liofiliz3 (Virtis Benchop, Modelo 2312, NY, EUA) a -54 3C durante 48 h y se guard3 a 43C hasta su análisis (Sandoval-Larios, 2021). El precipitado se almacen3 para reutilizarlo posteriormente; el sobrenadante conteniendo la mezcla de oligosacáridos, se caracteriz3 como se describe a continuaci3n.

5.2.1. Caracterización de Fucoïdan y sus Oligosacáridos por Dispersión Dinámica de la Luz

Se aplicó el principio de dispersión dinámica de la luz para obtener el tamaño de partícula y la carga superficial del fucoïdan y de sus oligosacáridos, utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern instruments Ltd., Malvern UK). Se prepararon concentraciones de 1 mg/mL en agua desionizada. Las mediciones se hicieron por triplicado a 25 °C, utilizando los programas computacionales del equipo y verificando la calidad de la medición. Para el tamaño se determinó el diámetro en nanómetros y el índice de polidispersidad, mientras que la estimación de la carga superficial se obtuvo utilizando la ecuación de Smoluchowski para determinar la potencial zeta (ζ) expresado en mV; para este caso, el equipo realizó 100 corridas (observaciones) por réplica.

A continuación, se muestra la ecuación de Smoluchowski:

$$\frac{\partial P(X, t)}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial X} \left\{ \left(\frac{P(X, t)}{m\gamma} \right) \frac{\partial V(X)}{\partial X} + \frac{\partial}{\partial X} \left[\frac{k_B T}{m} P(X, t) \right] \right\}$$

Donde siendo $F(X) = -V'(X) \equiv \partial_x V(X)$ la fuerza debida al potencial $V(X)$, k_B la constante de Boltzmann, m la masa de la partícula y T la temperatura del baño. Con todo ello, se tiene la ecuación de Smoluchowski para la evolución temporal de la densidad de probabilidad $P(X, t)$.

5.2.2. Análisis de Espectroscopía FTIR-ATR

El fucoïdan y sus oligosacáridos se caracterizaron por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier con reflexión total atenuada (FTIR-ATR), utilizando un espectroscopio Cary 630 FTIR (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Se utilizó un rango espectral de 4000 a 650

cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} . Se tomaron tres lecturas independientes para cada tratamiento programando al aparato para que realizara 40 corridas por réplica. Los valores de las absorbancias obtenidas en cada réplica se registraron en el programa Excel (Microsoft, Office, EUA) obteniendo el promedio de las mediciones para posteriormente obtener los espectros de cada tratamiento graficando número de onda (cm^{-1}) contra absorbancia (unidades arbitrarias), utilizando el software SigmaPlot versión 11.0 (Systat, software, Inc., San José, CA, USA).

5.3. Cultivo de *Campylobacter jejuni*

La cepa de *Campylobacter jejuni* (ATCC 43442) se sembró en caldo Brucella (Franklin Lakes, NJ, EUA). Después, se incubó a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 48 h en condiciones de microaerobiosis (10% CO_2 , 5% O_2 , 85% N_2) de acuerdo con Lártiga-Fattah, (2017). Para crear la atmósfera adecuada se empleó un sistema generador de gas, bolsas de cierre hermético CampyGen, anaerogen y clips de sellado para el cultivo de *C. jejuni* (Santa María, CA, EUA).

Para los ensayos de movilidad, adhesión y producción de biopelículas, las células bacterianas de *Campylobacter jejuni*, se recuperaron centrifugando a 3500 rpm durante 10 min a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente se lavaron dos veces con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; $\text{pH } 7.4 \pm 0.2 \text{ M}$). En seguida, la cepa se suspendió en PBS ajustando la absorbancia a 600 nm a valores de 0.5 o 0.6, dependiendo del experimento.

5.4. Establecimiento de las Condiciones de Crecimiento de *Campylobacter jejuni*

Para seleccionar las mejores condiciones de crecimiento de *Campylobacter jejuni* se siguió el procedimiento reportado por Dos Santos-Eduardo (2007) utilizando placas de crecimiento de 96 pozos (Corning Costar, USA). Para minimizar las inconsistencias debidas a variaciones en la absorbancia de las microplacas, únicamente se utilizaron aquellas que presentaran una absorbancia menor o igual a 0.01 en el rango de 600 a 620 nm. El diseño del experimento para determinar la

cinética de crecimiento de *C. jejuni* se presenta en la Figura 2. Se escogieron los medios Brucella y Mueller Hilton desgasificados, utilizado tratamientos con y sin 0.5% de cisteína, como reductor de oxígeno. Además, se añadió una película plástica a las placas, para conservar la anaerobiosis. Se probaron diferentes inóculos (1×10^2 - 1×10^8 UFC/mL), preparados a partir de un cultivo de 72 h de crecimiento en medio Brucella a 37 °C en condiciones de microaerobiosis (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂). El experimento se llevó a cabo en lector de microplacas Anthos Zenyth 340st (Anthos Labtee Instruments, Alcobendas, Madrid) a 37 °C, durante 96 h. El equipo se programó para determinar la absorbancia cada 30 min, con una agitación cada 20 s, con el propósito de homogenizar al medio. La cinética se realizó por triplicado con 28 observaciones por réplica (Figura 2). Las absorbancias de cada cinética se registraron en el programa Excel (Microsoft, Office, EUA) obteniendo la media y desviación estándar de las mediciones para posteriormente graficar las cinéticas. Los datos obtenidos se analizaron en el programa GraphPad Prism.

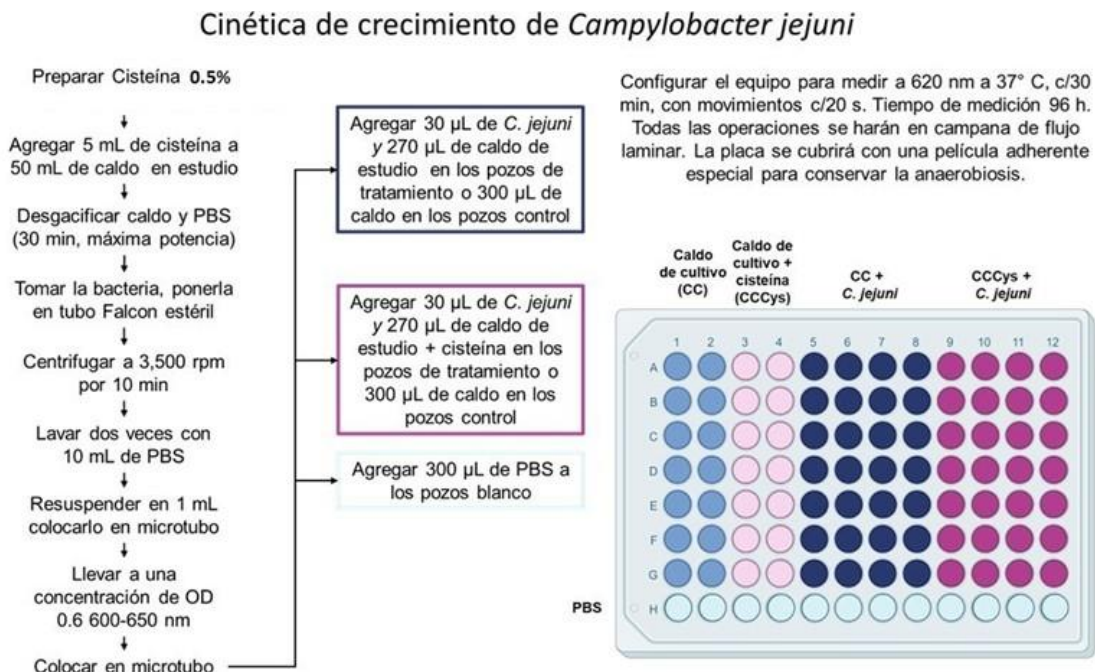


Figura 2. Diseño de experimento para determinar la cinética de crecimiento de *C. jejuni*.

5.5. Efecto del Fucoidan y sus Oligosacáridos en el Crecimiento de *Campylobacter jejuni*

Para determinar el efecto de la presencia de fucosa, fucoidan y sus oligosacáridos sobre el crecimiento de *C. jejuni* se escogió el medio, inóculo y mejores condiciones (con o sin cisteína) donde se registró mayor crecimiento del patógeno. Se probaron, diferentes concentraciones (100, 50, 25, 10 y 5 $\mu\text{g/mL}$) de cada compuesto fucosilado y se compararon con sus controles.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en medio Brucella a 37 °C en condiciones de microaerobiosis (10% CO_2 , 5% O_2 , 85% N_2), utilizando microtubos de 200 μL (CRMGlobe Int., MX) por 48 h. Cada hora se tomó un determinado microtubo y se realizaron las mediciones a 620 nm (Anthos Labtee Instruments, Alcobendas, Madrid). El diseño del experimento se presenta en la Figura 3. Los datos obtenidos se analizaron en el programa GraphPad Prism.

Efecto de adición de fucoidan y sus oligosacáridos sobre la cinética de crecimiento de *Campylobacter jejuni*

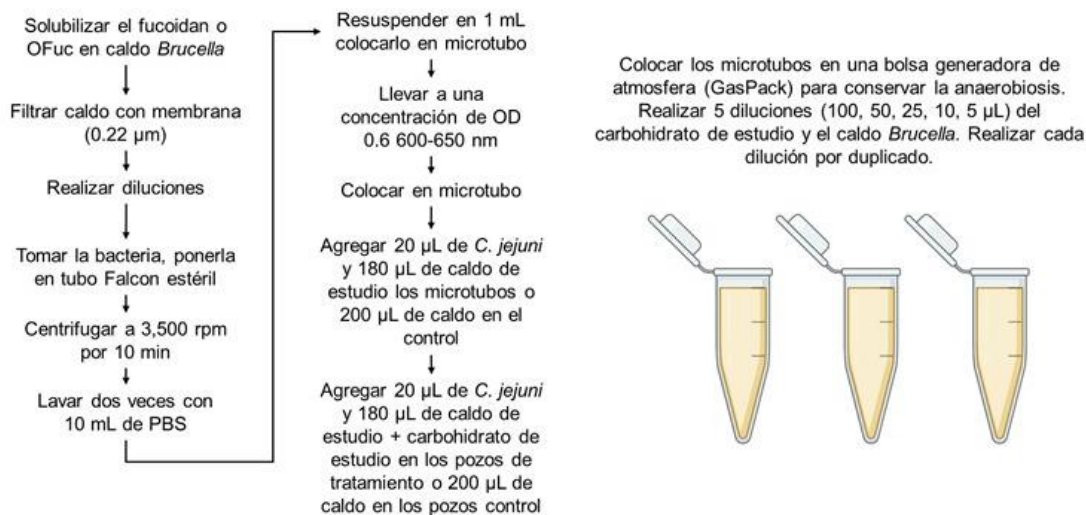


Figura 3. Diseño de experimento para determinar efecto de la adición de fucoidan y sus oligosacáridos sobre la cinética de crecimiento de *C. jejuni*.

5.6. Efecto de Fucoïdan y sus Oligosacáridos Sobre Factores de Virulencia de *Campylobacter jejuni* Relacionados con *Quorum Sensing*

5.6.1. Ensayo de Formación de Biopelículas y su Caracterización

El ensayo de formación de películas se partió de cultivos individuales de *C. jejuni* en medio MH o en medio Brucella, incubados durante 72 h a 37 °C. Se recuperó el paquete celular mediante centrifugación a 3500 rpm por 10 min a 25 °C y se resuspendió en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS 0.1 M; pH 7.4 ± 0.2) ajustando a 0.5 DO_{600nm}. Después, 300 µL de esta suspensión bacteriana fueron transferidos a placas de poliestireno de 24 pozos (Corning) conteniendo 2700 µL de medio Brucella suplementado con las diferentes concentraciones de fucosa, fucoïdan y sus oligosacáridos OFuc (100, 50, 25, 10 o 5 µg/mL). Las placas se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerobiosis y aerobiosis durante 48 h, manteniendo las condiciones de esterilidad. Como control se utilizó medio sin compuestos fucosilados.

Las células no adheridas (planctónicas) se removieron junto con el medio y los pozos se lavaron dos veces con 3000 µL de agua desionizada estéril. Posteriormente, las placas se secaron a 55 °C por 15 min, se adicionaron 3000 µL de cristal violeta 0.1% (p/v) y se incubaron por 5 min a 25 °C. El cristal violeta no unido fue eliminado mediante dos lavados con agua desionizada estéril. El cristal violeta adherido, fue decolorado con una solución 80% etanol-20 % acetona (v/v) y las biopelículas fueron recuperadas. Para determinar la formación de biopelículas, se tomaron 200 µL de la solución removida que fueron colocados en una placa de 96 pozos para medir la absorbancia a 620 nm con una agitación baja por 60 s (Reeser *et al.*, 2007). El diseño del experimento para determinar la formación de biopelícula de *C. jejuni* se presenta en la Figura 4.

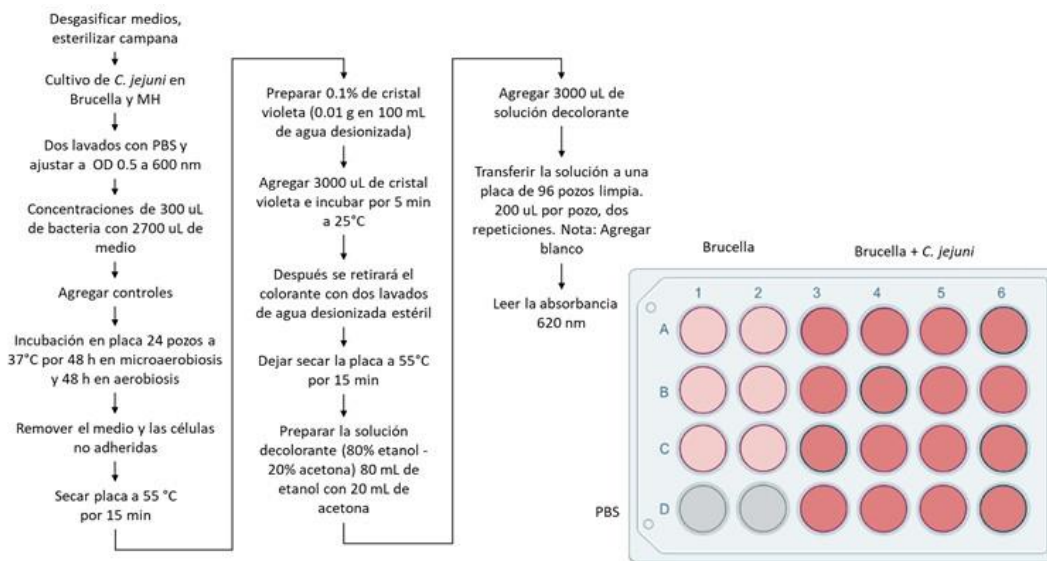


Figura 4. Diseño de experimento para ensayos de formación de biopelícula de *C. jejuni*.

Las biopelículas se caracterizaron mediante FTIR-ATR de acuerdo a la metodología anteriormente descrita y se compararon con los espectros de las bacterias planctónicas. La morfología de las biopelículas se analizó en un microscopio electrónico de barrido JEOL (JSM-7600, Tokio, Japón). Las mediciones de las muestras se hicieron dentro de una lectura de 80 s y las áreas promedio escaneadas fueron de 1500 mm². Previo al análisis, las muestras se recubrieron con una placa conductora de oro/paladio. El análisis se realizó por duplicado.

5.6.2. Ensayos de Movilidad Bacteriana

El efecto del fucoidan y sus oligosacáridos sobre la motilidad bacteriana se evaluó en placas Petri con medio Brucella y MH semisólido al que se agregaron las mismas concentraciones de fucosa, fucoidan o sus fucooligosacáridos probadas en los otros estudios (100, 50, 25, 10 o 5 µg/mL). Se prepararon las placas de acuerdo al diseño experimental presentado en el Cuadro 1. Posteriormente, una alícuota de 1 µL de suspensión de cultivo bacteriano de *Campylobacter* fue inoculada en el centro de cada placa. Las placas Petri se incubaron por 24 y 48 h a 37 °C bajo condiciones de microaerobiosis (Elver y Park, 2002). El fenotipo de motilidad de la bacteria fue determinado

midiendo el desplazamiento de la colonia sobre la superficie del agar comparándose con agares control (bacteria sin compuestos fucosilados) y con controles positivos obtenidos de otras bacterias que presentan movilidad.

Cuadro 1. Condiciones para la evaluación de fenotipos de movilidad en *C. jejuni*.

Ensayo	Contenido de agar (%)	Medio de cultivo		Fundamento
Swimming	0.3	Brucella	MH	Movimiento individual de las bacterias en medio líquido impulsado por la rotación del flagelo.
Swarming	0.7	Brucella	MH	Movimiento mediante la formación de película de crecimiento que se extiende a partir de las colonias y en algunos casos las bacterias pueden ser filamentosas y flageladas.
Fitness	0.8	Brucella (1X)	MH (1X)	Capacidad de supervivencia y replicación tras la disminución de nutrientes del medio.
Estándar	1.5	Brucella	MH	Condiciones estándar de crecimiento.

5.6.3. Ensayo de Adhesión

La hidrofobicidad superficial de *Campylobacter jejuni* se determinó utilizando la técnica MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbons) según Zoueki *et al.* (2010). La concentración bacteriana se ajustó a 0.5 DO_{600nm} con PBS 10 mM, pH 7.4, (Anthos Zenyth 340st, Anthos Labtee Instruments, Alcobendas, Madrid). Posteriormente se prepararon los diferentes tratamientos. Se tomó su absorbancia inicial a 600 nm, y se añadió un volumen igual de p-xileno. Se agitó en vórtex por 90 s y se incubó por 1 h a 37 °C. Después, se separó la fase acuosa y enseguida se midió nuevamente la absorbancia a 600 nm.

El porcentaje de células adheridas al p-xileno (hidrofobicidad) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de adhesión} = \left[\frac{(A_0 - A)}{A_0} \right] \times 100$$

Donde A_0 es la densidad óptica a 600 nm de la suspensión bacteriana con el carbohidrato de estudio antes de la mezcla con el solvente y A es la absorbancia después de la mezcla. El experimento se realizó con dos observaciones por réplica.

5.7. Análisis de Datos

Los experimentos se realizaron por triplicado. Cada réplica del análisis de la estructura por FTIR-ATR fue producto de 40 corridas en el equipo y se presentó el promedio de las mismas. Los análisis de tamaño y carga superficial se presentaron como media y error estándar. Para las cinéticas de crecimiento se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y de comparación de medias por Tukey-Kramer, para detectar diferencias entre los tratamientos ($p < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico NCSS versión 2020 (NCSS, LLC, Utah, USA). Por último, las curvas de las cinéticas de crecimiento obtenidas se ajustaron a un modelo cinético adecuado en el programa Prism-GraphPad (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA.) y los parámetros cinéticos de biomasa máxima (X_M) y velocidad específica de crecimiento (μ) fueron determinados.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización de Fucoïdan de *Ascophyllum nodosum*

En este trabajo se utilizó el fucoïdan de *Ascophyllum nodosum* por ser uno de los más disponibles. Los oligosacáridos se obtuvieron mediante hidrólisis ácida controlada y se caracterizaron por FTIR-ATR y DLS, comparándolos con el fucoïdan nativo. El espectro típico de FTIR-ATR de dicho fucoïdan (Figura 5), coincidió con el reportado anteriormente (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011). La señal emitida entre los 3000 y 3600 cm^{-1} se atribuye a la presencia de grupos hidroxilo ($-\text{OH}$); el pico a 2929 cm^{-1} representa los grupos metilo (CH). El pico entre 1650 a 1600 cm^{-1} es característico de los grupos carbonilo ($\text{C}=\text{O}$), atribuidos al ácido urónico presente en los polisacáridos de las algas pardas (Cid *et al.*, 2020). La banda en el número de onda 1419 cm^{-1} corresponde a los grupos carboxilo (COOH), mayoritariamente disociados en forma de carboxilato simétrico ($-\text{COO}^-$) (Blanco-Pascual *et al.*, 2014). El estiramiento ubicado a 1022 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) representa a los enlaces glicosídicos presentes en oligo y polisacáridos (Gómez-Ordóñez y Rupérez, 2011).

Los grupos característicos de los polisacáridos sulfatados se presentan entre los 1238 y 820 cm^{-1} . La banda ubicada en 1238 cm^{-1} representan los estiramientos de grupos $-\text{SO}_3$, emitidos por los ácidos sulfónicos (Cid *et al.*, 2020). La banda afilada a 840 cm^{-1} y el hombro registrado a 820 cm^{-1} , representan estrechamientos atribuidos a los grupos sulfatados (COS), que sugieren un patrón complejo de sustitución, principalmente por la posición en C-4 (sustitución axial del ligando α de L-fucopiranososa) con otras sustituciones en C-2 o/y C-3 (posiciones ecuatoriales) en menor cantidad. (Marais y Joseleau, 2001).

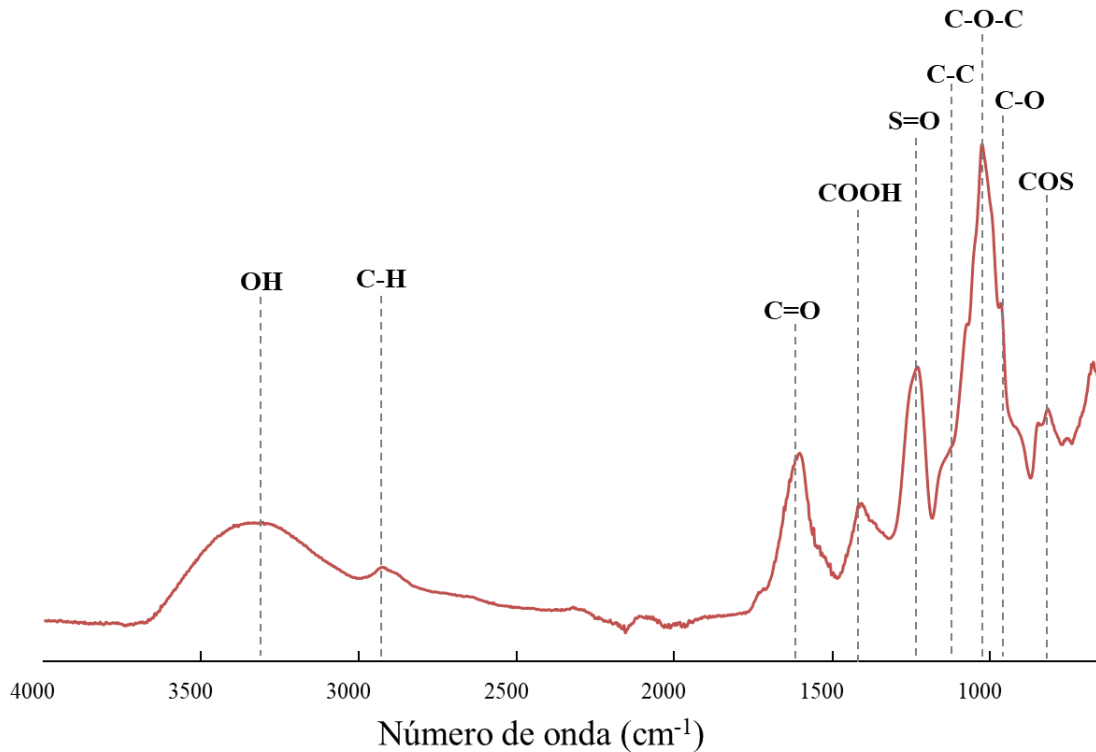


Figura 5. Espectro FTIR-ATR típico de fucoidan de *Ascophyllum nodosum*.

La carga superficial del fucoidan de *A. nodosum* fue de -66.6 ± 0.48 (Figura 6A), la cual se debe principalmente a los grupos sulfatos observados en el espectro (Blanco-Pascual *et al.*, 2014). El tamaño medio de la molécula fue de 760.51 ± 42.29 nm, con un índice de polidispersidad de 0.41 ± 0.07 . Se observaron tres poblaciones de diferente tamaño, aunque la población con diámetros entre 500 y 1500 nm fue la predominante (Figura 6B). La diversidad de tamaños puede deberse tanto a los métodos de obtención del polisacárido como a las funciones biológicas de este carbohidrato. El fucoidan participa en la síntesis de la pared celular de las algas pardas impartiendo soporte y estructura a este organismo y protegiéndolo de la desecación (Ponce y Stortz, 2020; Zayed *et al.*, 2020). Además, es componente de las esporas, previniendo la liberación prematura de los gametos femeninos; cuando estos se encuentran listos, las fucosidasas los degradan produciendo diferentes tamaños de partículas (Skriptsova, 2015).

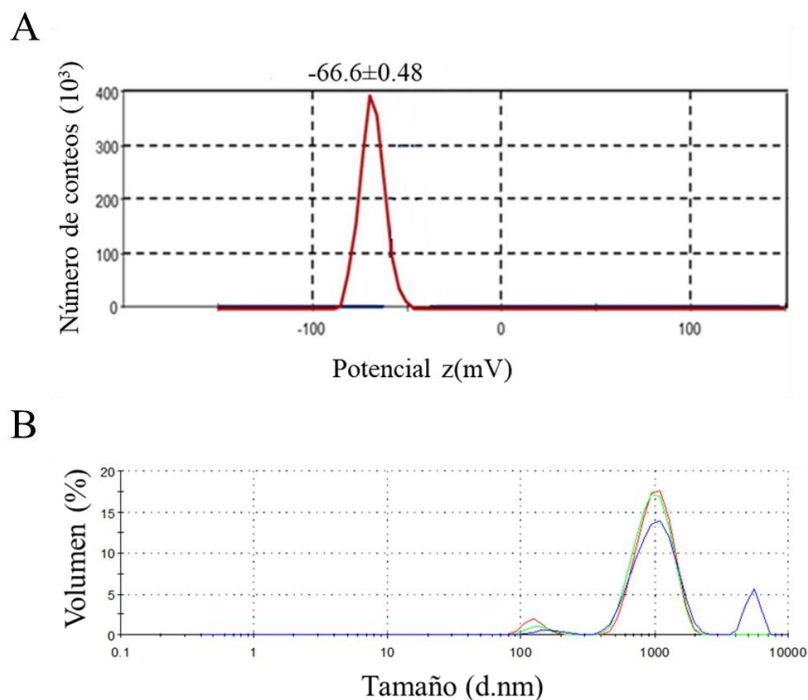


Figura 6. Caracterización parcial de fucoidan de *Ascophyllum nodosum*. A), Carga superficial. B), Tamaño de partícula.

6.2. Caracterización de los Oligosacáridos de Fucoidan de *Ascophyllum nodosum*

Los OFuc se obtuvieron mediante hidrólisis ácida, se separaron mediante ultrafiltración en diferentes fracciones (> 3 kDa, < 3 KDa, < 1 kDa) y se analizaron mediante FTIR-ATR para observar posibles cambios en su estructura. Sin embargo, debido a los bajos rendimientos obtenidos en las fracciones más pequeñas, se decidió caracterizar también a la porción hidrolizada, sin fraccionar. La Figura 7 muestra los espectros FTIR-ATR de esta fracción, comparándolo con los espectros del fucoidan nativo y de los OFuc de la fracción mayor a 3 kDa. Se observa que las fracciones conservaron el mismo patrón que el fucoidan, por lo que puede asumirse que se preservó la estructura de las fucosas. A pesar de conservar el mismo patrón del fucoidan nativo, se observaron disminuciones en la intensidad de algunas bandas, principalmente aquellas asignadas a la sulfatación. De acuerdo con Pomin *et al.* (2005), la hidrólisis ácida en polisacáridos sulfatados inicia con una desulfatación de la molécula, seguida de la ruptura del enlace glicosídico de la unidad no sulfatada dando como resultado oligosacáridos homogéneos.

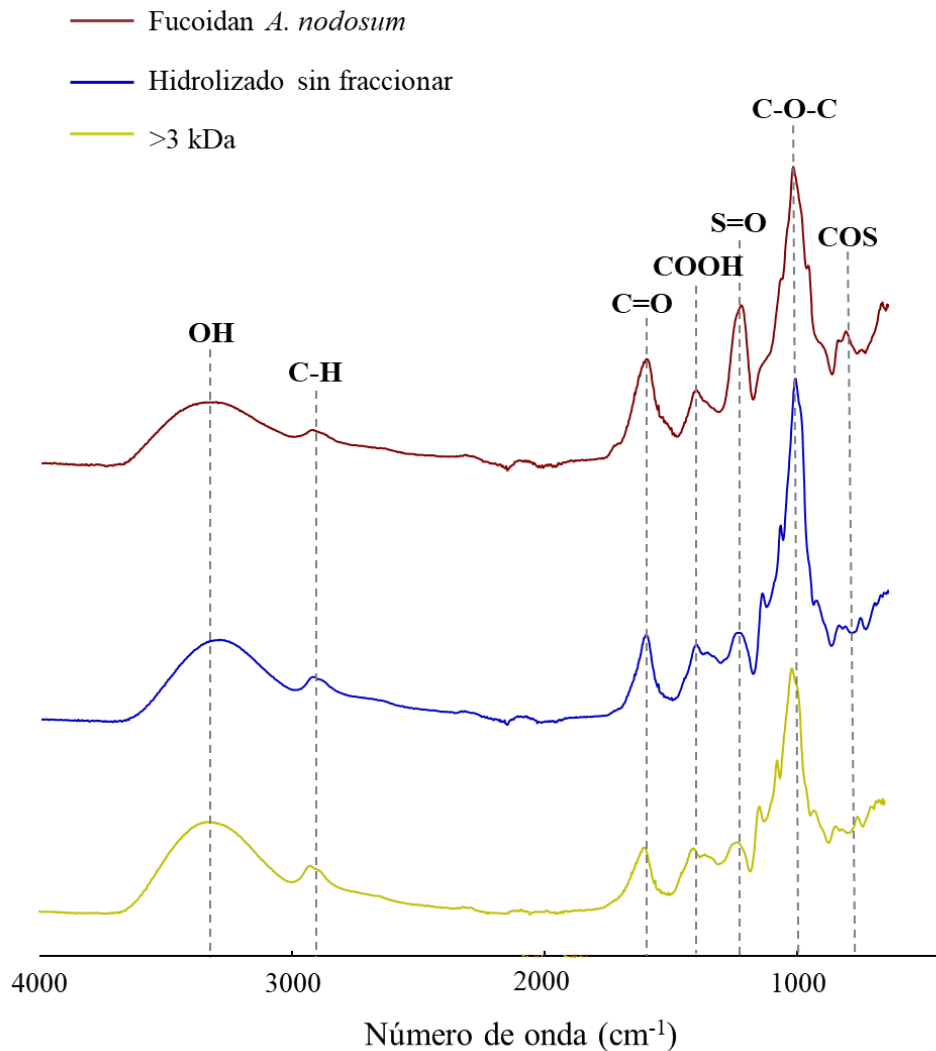


Figura 7. Comparación de los espectros FTIR-ATR del fucoidan nativo de *Ascophyllum nodosum* y sus hidrolizados.

La caracterización de los OFuc se muestra en el Cuadro 2. Al compararlos con el fucoidan nativo se observaron disminuciones en carga debidas a la sulfatación y en tamaño, debidas a la hidrólisis, además del aumento en la polidispersidad, debida a la presencia de varias poblaciones obtenidas por la fragmentación del tratamiento ácido.

Cuadro 2. Caracterización de los oligosacáridos de fucoïdan por dispersión dinámica de la luz.

	Carga superficial (mV)	Tamaño (nm)	Índice de polidispersidad
Fucoïdan nativo	-66.6± 0.5	750.6±42.3	0.48
Hidrolizado sin fraccionar	-44.5± 10.4	457.1±67.9	0.92
Fracción >3 kDa	-41.9±8.5	321.3±95.9	1.00

6.3. Establecimiento de las condiciones de crecimiento de *Campylobacter jejuni*

Se evaluó el crecimiento de *C. jejuni* en caldo Brucella y MH, con y sin cisteína al 0.5% a 37 °C por 106 h. Bajo estas condiciones, la bacteria sólo creció en caldo Brucella sin cisteína (Figura 8). La cisteína es utilizada para promover el crecimiento de otras bacterias anaerobias, debido a su capacidad de reducir el oxígeno presente en el medio. El microorganismo tampoco creció en caldo MH. Las especies de *Campylobacter* muestran restricciones metabólicas significativas en comparación con otras bacterias enteropatógenas. Las principales fuentes de energía para *C. jejuni* son aminoácidos, intermedios del ciclo del ácido cítrico y ácidos grasos de cadena corta (Wagley *et al.*, 2014). Estudios previos han concluido que, a excepción de unas pocas cepas que pueden utilizar el carbohidrato L-fucosa (Stahl *et al.*, 2011; Velayudhan y Kelly, 2002). *Campylobacter* es un género no-sacarolítico que no puede oxidar o fermentar carbohidratos (Wagley *et al.*, 2014). En el Cuadro 3, se observa la composición de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *C. jejuni*. Ambos están compuestos por diferentes fuentes de aminoácidos. Lamas *et al.* (2018), atribuyen las diferencias de crecimiento de *C. jejuni* en estos medios, principalmente a las características de la cepa.

Cuadro 3. Composición de los medios de cultivo.

Ingredientes	Medio de cultivo (g/L)	
	Brucella	Muller-Hinton
Caseína pancreática digerida	10.0	
Digestión péptica de tejido animal	10.0	
Hidrolizado ácido de caseína		17.5
Extracto de carne bovina		3.0
Extracto de levadura	2.0	
Cloruro de sodio	5.0	
Bisulfito de sodio	0.1	
Dextrosa	1.0	1.5*
pH	7.0	

*Dextrosa en forma de almidón.

Mehlman y Romero (1982) demostraron que la adición de casamino ácidos, los cuales son los productos de una hidrólisis ácida de caseína, afectan positivamente el desarrollo de especies de *Campylobacter*, sin embargo, una fuente extra de proteosa-peptona proteosa y bisulfito de sodio como reductor de oxígeno, como es el caso del medio de cultivo Brucella, promueven el crecimiento. Los digeridos enzimáticos de caseína y tejido animal proporcionan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas complejas de una manera más disponible en el medio.

En la Figura 8 se presentan las diferentes curvas de crecimiento de *C. jejuni* obtenidas en caldo Brucella bajo las condiciones de cultivo establecidas anteriormente; la fase estacionaria se alcanzó después de las 96 h.

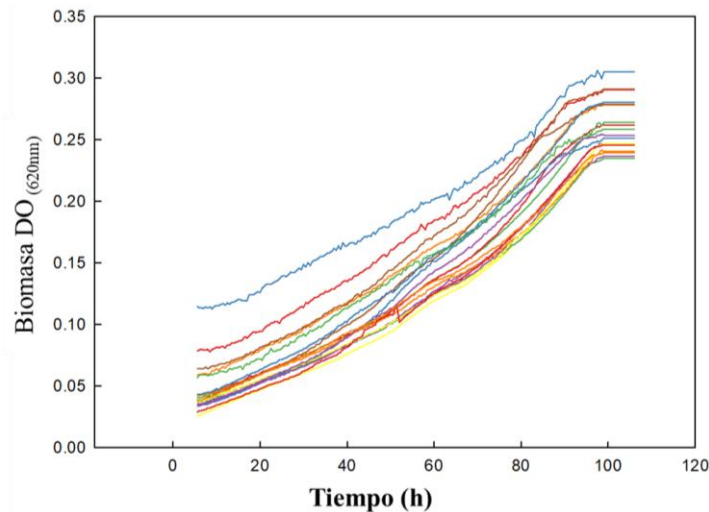


Figura 8. Curva de crecimiento de *C. jejuni* en caldo Brucella. Cada curva de color representa una repetición.

La Figura 9A representa el conjunto de datos obtenidos para la fase de crecimiento exponencial de la cinética de crecimiento de *C. jejuni*. Para comprobar el ajuste de los datos obtenidos a un modelo de crecimiento exponencial, se utilizó el software Prism-GraphPad, obteniéndose la gráfica representada en la Figura 9B. De acuerdo al análisis, se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) de 0.91. Bajo las condiciones de cultivo establecidas para este ensayo, la velocidad específica de crecimiento obtenida fue de $1.86 \times 10^{-2} \pm 4.60 \times 10^{-4} \text{ (h}^{-1}\text{)}$, y una biomasa máxima de 0.243 densidades ópticas. La microbiología predictiva utiliza los modelos matemáticos para describir el comportamiento microbiano, incluyendo las expresiones que describen cómo las poblaciones bacterianas cambian con respecto al tiempo dentro de determinadas condiciones. Las respuestas obtenidas como la tasa de crecimiento, fase de adaptación, densidad poblacional máxima, etc., y establecimiento y comprensión de los parámetros cinéticos para la descripción del comportamiento, los complejos requisitos nutricionales del organismo y las necesidades de su entorno, en este caso microaerófilico, pueden contribuir al estudio *in vitro* pudiendo ser modelados con respecto a la influencia que sobre los mismos ejercen otras variables intrínsecas o extrínsecas presentes (Zwietering *et al.*, 1991).

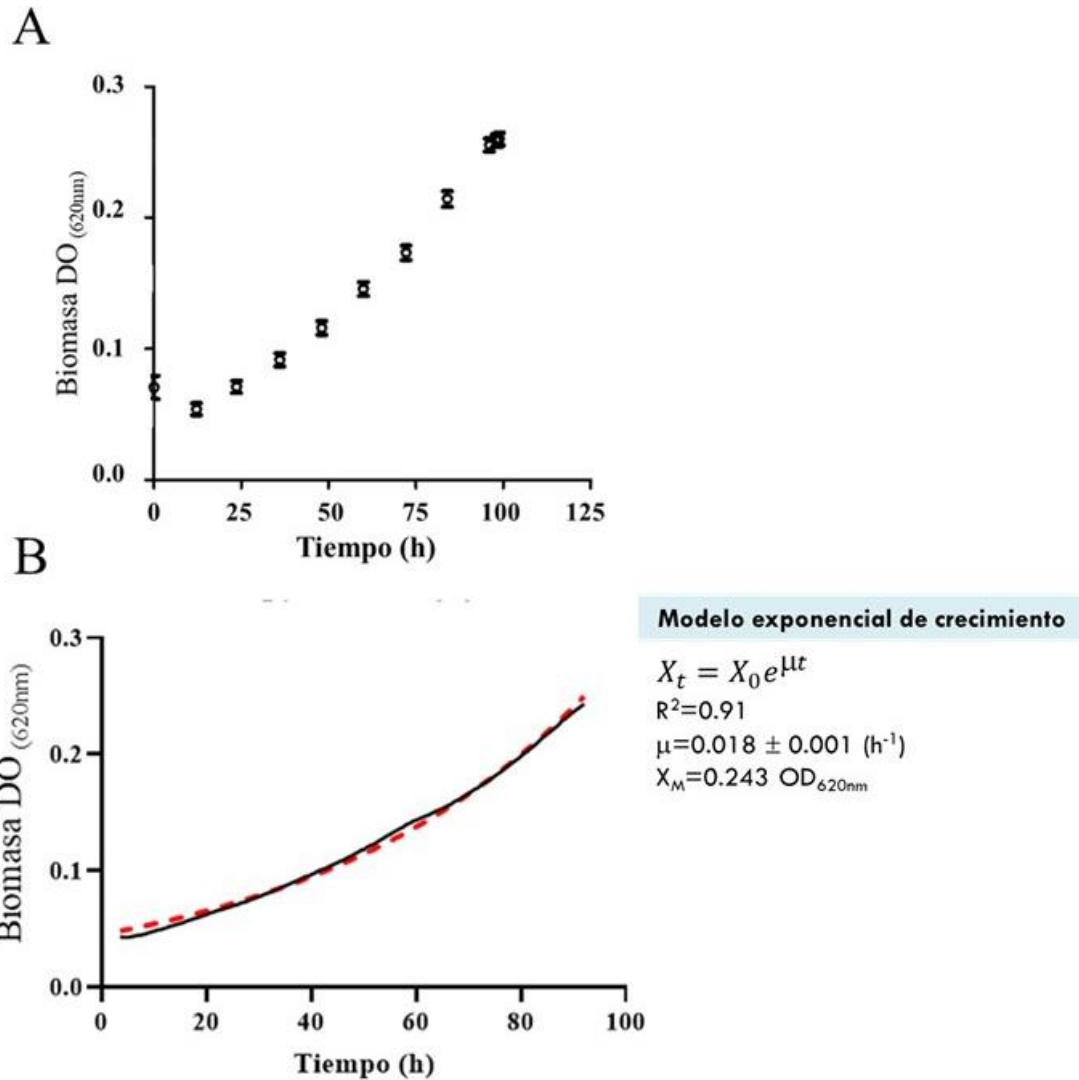


Figura 9. Comportamiento del crecimiento de *Campylobacter jejuni* en caldo Brucella. A. Cinética del crecimiento exponencial de *C. jejuni*. B. Ajuste de la cinética de crecimiento de *C. jejuni* al modelo exponencial de crecimiento.

6.4. Efecto de Fucosa, Fucoidan y sus Oligosacáridos Sobre el Crecimiento de *Campylobacter jejuni*

La Figura 10 concentra las curvas de crecimiento de *C. jejuni* en presencia de fucosa, fucoidan y sus oligosacáridos, comparándolos con los controles (sin la adición de compuestos fucosilados) Los datos de cada tratamiento se ajustaron al modelo de crecimiento exponencial, el ANEXO I presenta los datos a detalle.

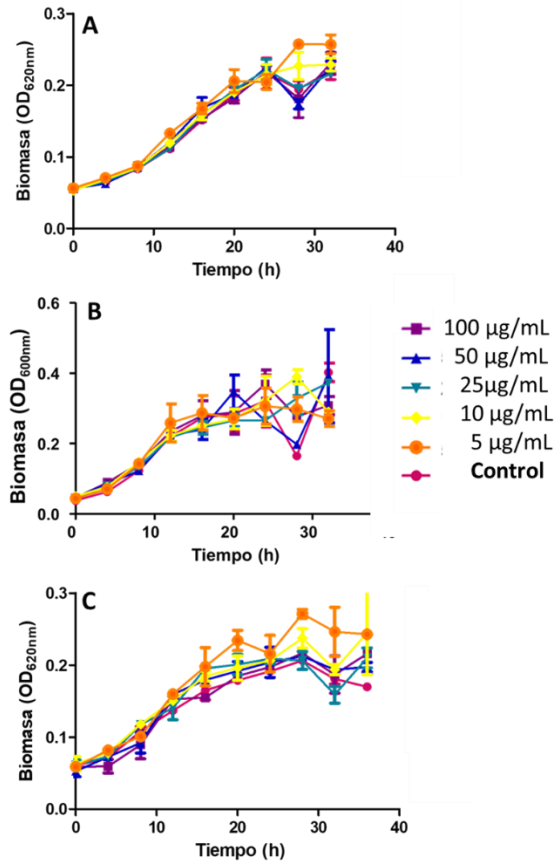


Figura 10. Cinética de crecimiento de *C. jejuni* con diferentes concentraciones de fucosa, fucoidan y oligosacáridos de fucoidan. A) fucosa, B) fucoidan y C) oligosacáridos de fucoidan. Control: crecimiento en ausencia de compuestos fucosilados.

La Figura 11 presenta la comparación de las cinéticas de crecimiento de *C. jejuni* de cada concentración utilizada de fucosa, fucoidan y oligosacáridos de fucoidan, mientras que el Cuadro 4 presenta las velocidades específicas de crecimiento.

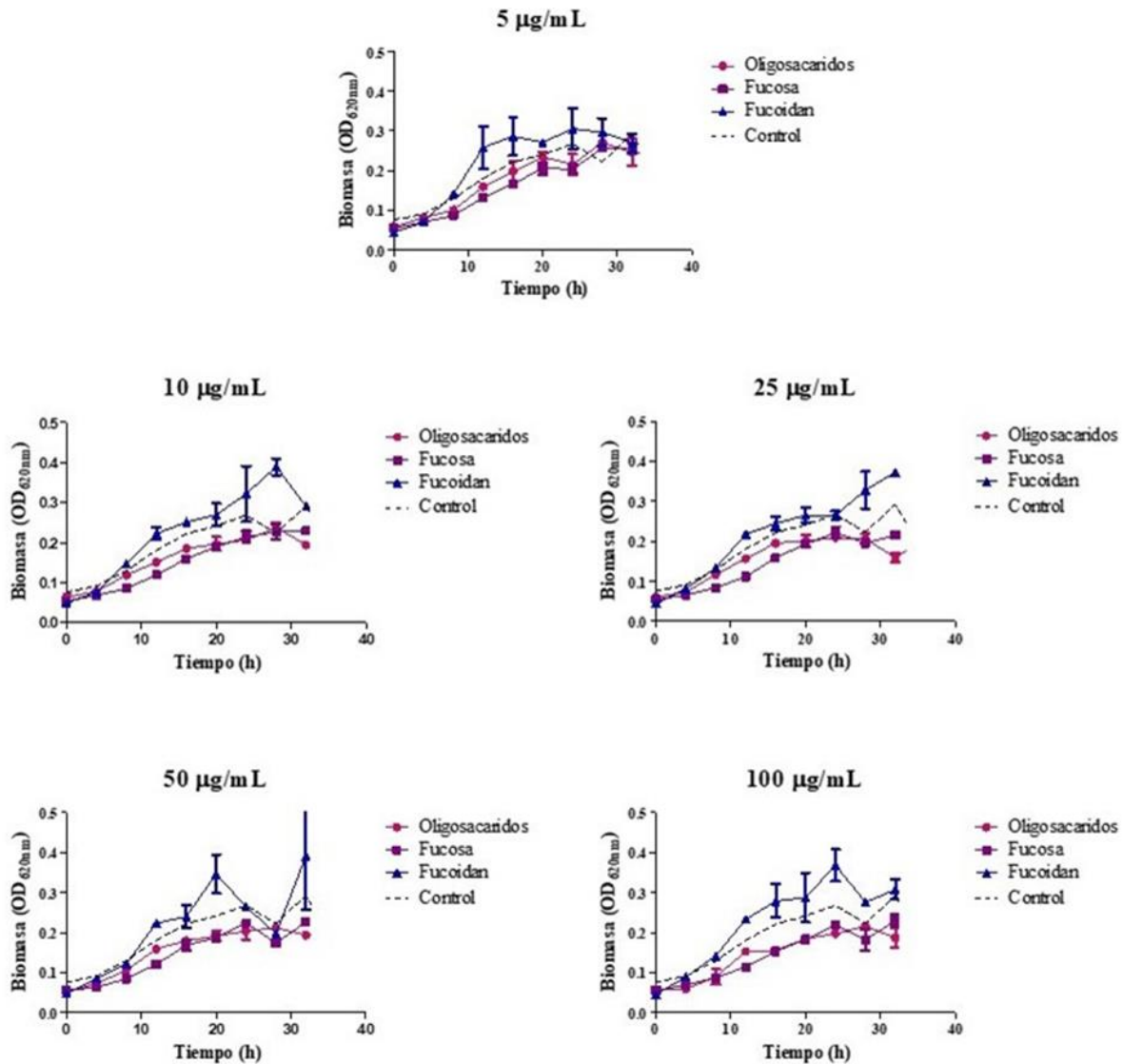


Figura 11. Cinéticas del crecimiento de *C. jejuni* comparando las diferentes concentraciones utilizadas de fucosa, fucoidan y oligosacáridos de fucoidan. Control: crecimiento en ausencia de compuestos fucosilados.

Al obtener las velocidades específicas de crecimiento con el programa GraphPad Prism y realizar el análisis estadístico se observó una tendencia a la disminución de la velocidad de crecimiento de *C. jejuni* en presencia de concentraciones de fucoidan mayores a 25 µg/mL. Ayrapetyan *et al.* (2021), reportaron un efecto bacteriostático del fucoidan sobre *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, y *B. licheniformis*, el cual atribuyeron a la carga superficial negativa de los grupos sulfatos. Estos grupos atrapan minerales catiónicos, necesarios para la bacteria, o se unen a grupos funcionales de la pared celular provocando su rompimiento. La presencia de fucosa no afectó la velocidad

específica de crecimiento del patógeno. Esto se contrapone con la evidencia de que más del 65 % de las cepas de *C. jejuni* analizadas por Muraoka *et al.* (2011) y las analizadas por Garber *et al.* (2020) contienen el gen *fuc*, que les permite utilizar a la fucosa como fuente de carbono. Sin embargo, los medios de crecimiento utilizados en esta tesis contenían las fuentes de carbono que *C. jejuni* utiliza preferentemente, por lo que es conveniente realizar experimentos futuros con medio mínimo conteniendo fucosa.

Cuadro 4. Diferencias entre tratamientos de la velocidad específica de crecimiento de las cinéticas de *C. jejuni*.

Concentraciones μg/mL	Tratamientos		
	Fucosa μ (η ⁻¹)	Fuoidan μ (η ⁻¹)	OFuc μ (η ⁻¹)
100	0.060 ± 0.011 ^a	0.127 ± 0.022 ^b	0.099 ± 0.085 ^b
50	0.064 ± 0.022 ^a	0.130 ± 0.033 ^b	0.099 ± 0.060 ^{ab}
25	0.067 ± 0.013 ^a	0.127 ± 0.029 ^a	0.073 ± 0.056 ^a
10	0.064 ± 0.012 ^a	0.124 ± 0.046 ^a	0.076 ± 0.033 ^a
5	0.066 ± 0.018 ^a	0.154 ± 0.13 ^a	0.086 ± 0.035 ^a
Control	0.065 ± 0.012 ^a	0.150 ± 0.13 ^a	0.072 ± 0.029 ^a

Los valores indican la media ± el límite fiducial de 2 repeticiones. Diferentes literales, horizontalmente, indican diferencia estadística ($p < 0.05$). Control: crecimiento en ausencia de compuestos fucosilados.

6.5. Ensayo de Formación de Biopelículas y su Caracterización

La Figura 12 presenta el espectro típico de las células intactas de *C. jejuni*. El número de onda comúnmente utilizado para la adquisición de espectros FTIR bacterianos es la región entre 4000 y 400 cm⁻¹ que corresponde a la región del infrarrojo medio del espectro electromagnético. Los estudios clásicos de Helm *et al.* (1991) para la caracterización de bacterias por FTIR, determinan cinco ventanas espectrales correspondientes a la absorción expresada en números de onda (cm⁻¹) de: a) lípidos (ventana 1, 3000-2800 cm⁻¹), dominada por vibraciones de grupos funcionales

usualmente presentes en ácidos grasos; b) proteínas y péptidos (ventana 2, 1800-1500 cm^{-1}), dominada por vibraciones de las bandas amida I y amida II); c) una región mixta (ventana 3, 1500-1200 cm^{-1} , con información de proteínas, ácidos grasos, ácidos nucleicos y compuestos portadores de fosfato); d) carbohidratos (ventana 4, 1200–900 cm^{-1} , dominada por bandas de absorción de los carbohidratos presentes dentro de la pared celular); y e) una región de huellas dactilares (ventana 5, 900-700 cm^{-1}), que muestra algunos patrones espectrales notablemente específicos, aún no asignados a componentes celulares o grupos funcionales. Las ventanas 3 y 4 son las más discriminatorias para la identificación bacteriana (Novais *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2013; Helm *et al.*, 1991).

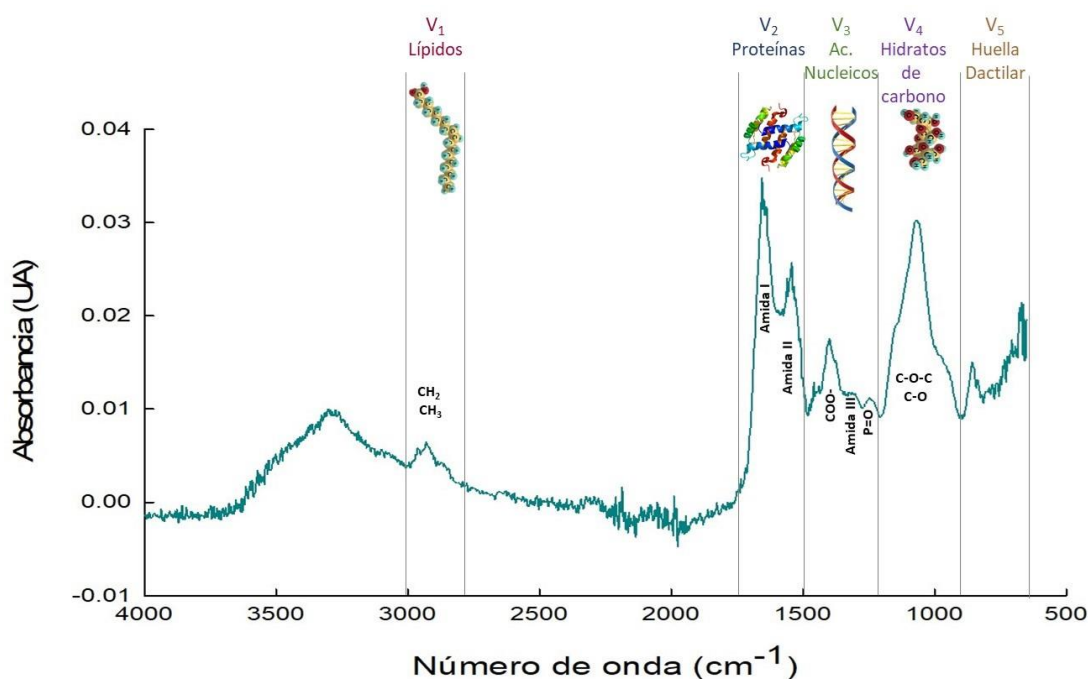


Figura 12. Espectro FTIR-ATR típico para *C. jejuni* ATCC 43442. Se muestran las ventanas espectrales y las asignaciones de banda principal.

Para los ensayos de formación de biopelículas se trabajó inicialmente con medio MH debido a que está reportado que en medio Brucella, *C. jejuni* no las produce, debido a que es un medio más rico en nutrientes (Reeser *et al.*, 2007). Sin embargo, el crecimiento microbiano en MH fue escaso, dificultando la posibilidad de alcanzar la cantidad necesaria de bacteria para cada ensayo. Debido a lo anterior se optó por utilizar el medio Brucella en condiciones de aerobiosis ya que existe

evidencia de síntesis de biopelículas en condiciones de aerobiosis; ello debido al estrés oxidativo al que el microorganismo está expuesto (Püning *et al.*, 2021). Utilizando estas condiciones se detectó la formación de biopelículas a las 48 h de cultivo (Figura 13), por lo cual, quedó este tiempo establecido para el resto de los análisis.

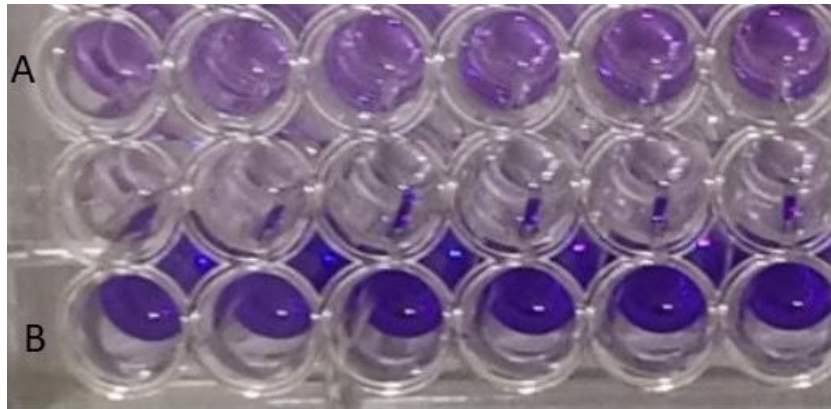


Figura 13. Formación de biopelículas de *C. jejuni* cultivado en medio Brucella, mediante la técnica del cristal violeta. A) después de 24 h de incubación en aerobiosis; B) después de 48 h de incubación en aerobiosis.

La comparación de los espectros entre las células de *C. jejuni* y sus biopelículas (Figura 14) mostró algunas diferencias espectrales importantes en las señales de absorción, que pueden identificarse como marcadores importantes de la formación de biopelículas de esta bacteria como es la formación de una matriz enriquecida con proteínas y polisacáridos (Melo *et al.*, 2017; Tram *et al.*, 2020). Se observaron aumentos en la intensidad de las bandas asignadas a proteínas y péptidos (Amida I, 1647- 1626 cm^{-1} ; Amida II; 1548 cm^{-1}) y en las asignadas a los carbohidratos; 1397 cm^{-1} (grupos COOH) y 1086 y 1050 cm^{-1} , las cuales aparecen traslapadas y corresponden a grupos C=O y enlaces glucosídicos C-O-C, respectivamente (Wang *et al.*,2013).

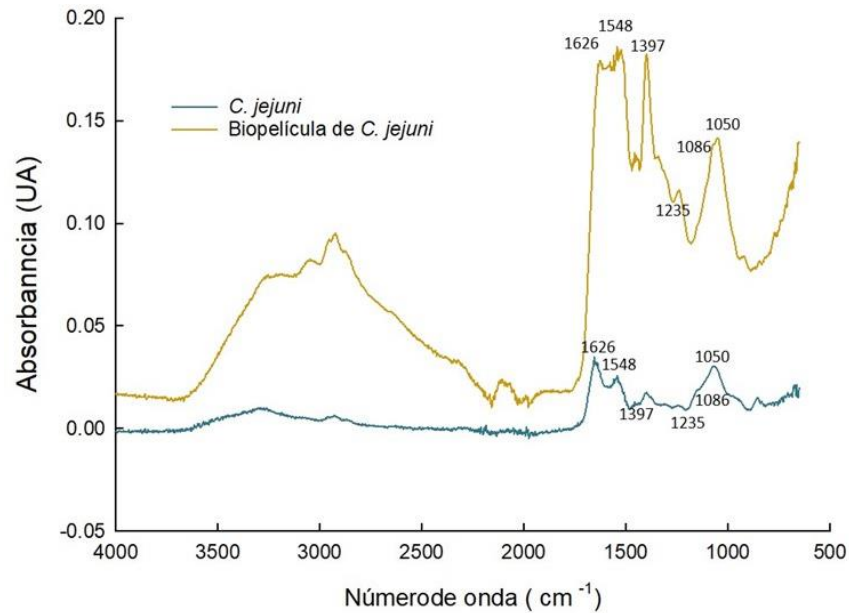


Figura 14. Comparación entre los espectros FTIR-ATR típicos de *C. jejuni* ATCC 43442 y sus biopelículas.

La determinación de la composición exacta de las biopelículas de *C. jejuni* es difícil por la cantidad de factores que influyen en ésta, como la presencia o ausencia de O₂, temperatura, tipo de cepa, medio de crecimiento y edad de la biopelícula, entre otras (Melo *et al.*, 2020; Turonova *et al.*, 2015). No obstante, existe evidencia de un aumento en la presencia de compuestos proteicos amiloides en las biopelículas maduras de *C. jejuni* las cuales contribuyen a la estructura de las mismas (Tram *et al.*, 2020; Turonova *et al.*, 2016). Para el caso de los carbohidratos, McLennan *et al.* (2008) probaron la presencia de exopolisacáridos unidos mediante enlaces β1-3 y/o β1-4, sin llegar a identificarlos, mientras que Turonova *et al.* (2016), utilizando ensayos con lectinas, identificaron la presencia de N- acetilglucosamina, galactosa, N-acetilgalactosamina y fucosa, en la matriz de biopelículas de *C. jejuni*. Se sabe que la N-acetilgalactosamina está unida a más de 45 proteínas glicosiladas de *C. jejuni* (Young *et al.*, 2002). Otra banda que aumentó en intensidad fue la asignada a los grupos fosfatos (1235 cm⁻¹) y la cual se relaciona con la presencia de ADN (Tram *et al.*, 2020). Además de desempeñar un papel estructural importante en la matriz de biopelículas, el ADN extracelular (eADN), parece ser parte integral de la formación de biopelículas en *C. jejuni*. Esto se evidencia por los aumentos en la cantidad de biomasa formada después de la adición de eADN a los cultivos de *C. jejuni*; también parece ser necesario para la maduración de la biopelícula (Svensson *et al.*, 2014).

La Figura 15 muestra las micrografías de dos diferentes secciones de las biopelículas de *C. jejuni* a magnificaciones de 2000x, y 10,000x. En las Figuras 15A y 15B, aparece un conglomerado de bacterias, mientras que en las Figuras 15C y 15D se aprecia una masa de las mismas. Es necesario mejorar estas preparaciones y recomendable dar un seguimiento temporal desde el inicio de la formación de la biopelícula hasta su maduración a fin de contar con una mejor caracterización.

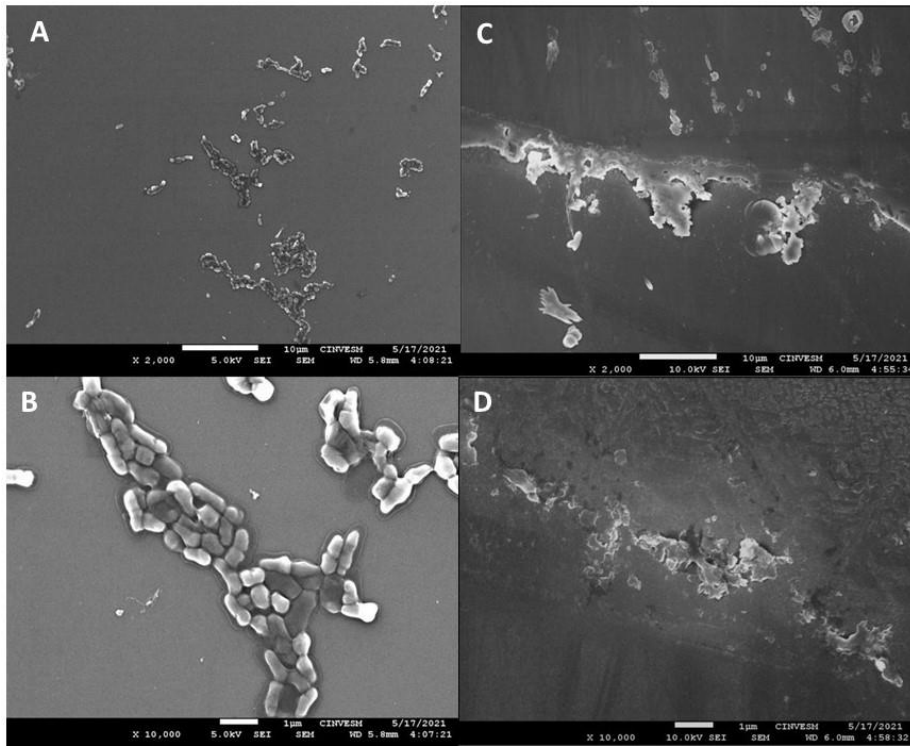


Figura 15. Micrografías de las biopelículas de *C. jejuni* observada a una magnificación de A) 2,000X, B) 10,000X, C) 2,000X y D)10,000X. A) y B), conglomerado de bacterias; C) y D), porción de biopelícula.

En el análisis de composición por espectroscopia de energía dispersiva (EDS) de las biopelículas se detectó la presencia de los elementos químicos C y O, además de K, Na, Cl, Mg, Ca, Al y Si. Es importante destacar que la presencia de Si y Al pueden deberse a contaminación proveniente de los soportes donde se colocaron las películas (Figura 16).

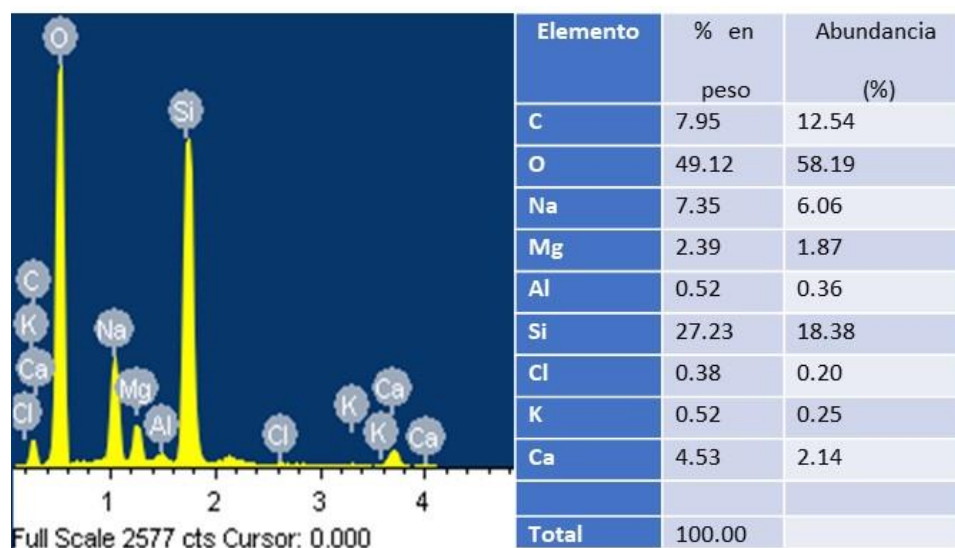


Figura 16. Análisis composicional de las biopelículas de *C. jejuni*.

6.5.1. Efecto de la presencia de fucoidan y sus oligosacáridos en la formación de biopelículas

En la Figura 17 se presentan los resultados del efecto del fucoidan y sus oligosacáridos en la formación de biopelículas de *C. jejuni*. Además del control, se añadió un experimento conteniendo fucosa. Se observó un efecto promotor de síntesis de biopelículas en presencia de fucosa a concentraciones \geq a 25 μ g. Estos resultados se contraponen con los obtenidos por el único estudio similar encontrado, realizado por Dwivedi *et al.* (2016). Estos investigadores observaron una disminución del 50 % en la formación de biopelículas de *C. jejuni* NCTC11168 en presencia de 25 mM de L-fucosa en biopelículas adheridas a superficies de borosilicato y teñidas con cristal violeta.. La presencia de fucosa ofrece una ventaja competitiva para aquellas cepas de *C. jejuni* que pueden utilizarla como fuente de energía ya que pueden utilizar la fucosa presente en las mucinas para sobrevivir e infectar a la célula eucariota (Stahl *et al.*, 2011). De acuerdo con Dwivedi *et al.* (2016), si la cepa puede detectar y posteriormente utilizar la fucosa presente, la mayoría de las células bacterianas permanecerán en su forma planctónica y no formarán biopelículas.

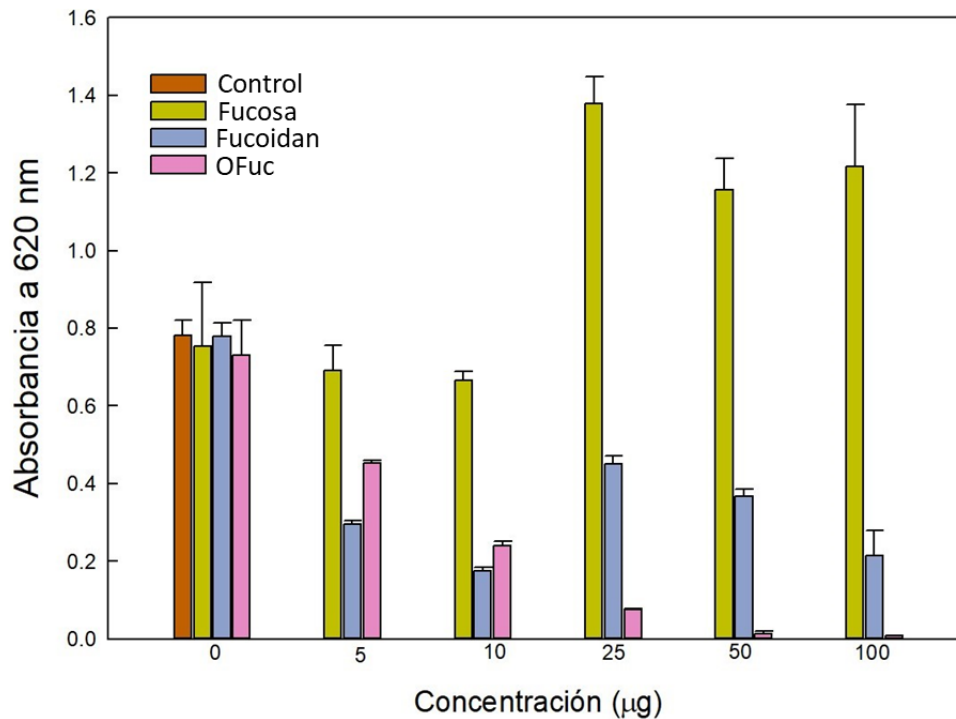


Figura 17. Efecto del fucoïdan y sus oligosacáridos en la formación de biopelículas de *C. jejuni*.

Entre las posibles causas que pudieran explicar las diferencias encontradas entre este trabajo y el de Dwivedi *et al.* (2016) se encuentra la concentración de fucosa utilizada. Para el caso del presente trabajo fue muy pequeña, ya que no sobrepasó los 100 µg mientras que en el estudio de Dwivedi fueron concentraciones más grandes, de aproximadamente 4.10 g (25 mM). Podría darse el caso de que la cepa utilizada en este estudio no pudiera detectar o utilizar la fucosa como fuente energética y, en cambio, la utilizara para la formación de la biopelícula, ya que Turonova *et al.* (2016), encontraron a la fucosa como componente de las biopelículas de *C. jejuni*. Sin embargo, se requieren posteriores estudios para probarlo.

Por otro lado, tanto la presencia de fucoïdan como de sus oligosacáridos inhibieron la formación de biopelículas de *C. jejuni*. Otros estudios han probado el efecto anti-formación de biopelículas del fucoïdan. Jun *et al.* (2018), probaron que el fucoïdan de *Fucus vesiculosus* en concentraciones superiores a 250 µg/mL⁻¹ suprimió por completo la formación de biopelículas de *Streptococcus mutans* y *S. sobrinus*. Khan *et al.* (2019), sintetizaron nanopartículas de Au-fucoïdan encontrando una concentración mínima de inhibición de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa* de 128 µg/mL⁻¹.

Se desconoce el mecanismo de acción mediante el cual el fucoïdan inhibe la formación de

biopelículas. Sin embargo, la aplicación de este polisacárido junto con otros compuestos que inhiben la formación de biopelículas de *C. jejuni* como trans-cinnamonaldehído, eugenol, carvacrol y compuestos cítricos puede ser un tratamiento potencial para el control de la persistencia de *C. jejuni* en superficies abióticas (Püning *et al.*, 2021), mientras que tratamientos con fucoidan a las superficies alimentarias podrían controlar la formación de biopelículas de *C. jejuni*, sin afectar el sabor del alimento. Finalmente, es necesario realizar estudios para tratar de entender la relación entre la inhibición de las biopelículas y el QS. El único estudio encontrado fue el de Castillo *et al.* (2014) quienes encontraron una relación entre la inhibición de biopelículas de *C. jejuni* por compuestos cítricos y la disminución en la producción de AI-2.

6.6. Movimiento Bacteriano de *Campylobacter jejuni*

Para establecer las condiciones de los ensayos de movimiento bacteriano se inoculó a *Campylobacter jejuni* en los medios sólidos Brucella y MH, siguiendo condiciones de anaerobiosis a 37° C. La bacteria presentó un crecimiento puntiforme con colonias planas pequeñas de color blanco-transparente (Figura 18), el cual coincide con lo reportado por Davis y DiRita (2008) y Versalovic *et al.* (2011). Como puede observarse, el crecimiento fue mejor en agar Brucella.

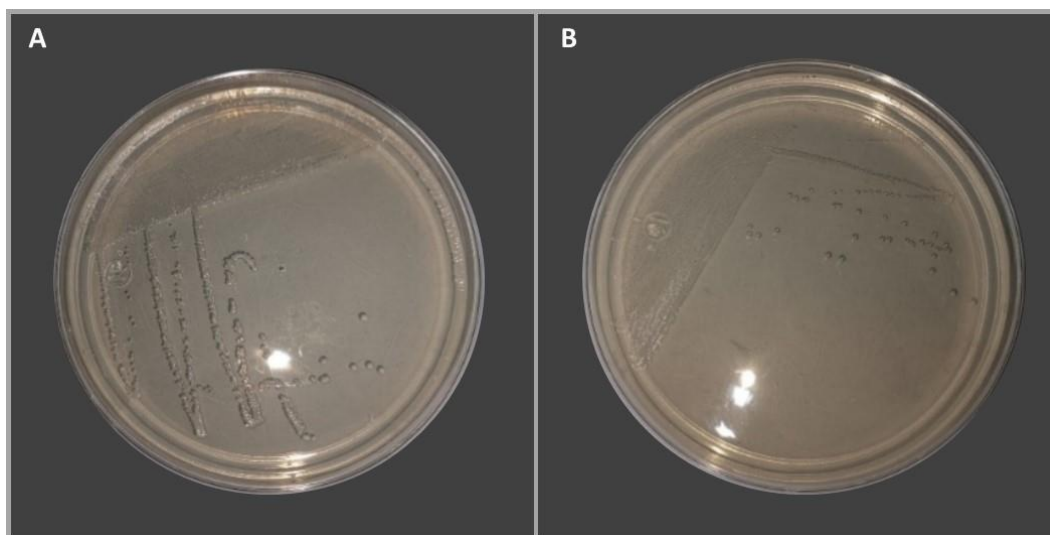


Figura 18. *Campylobacter jejuni* sembrado por estriado en placa en agar Brucella estándar (A) y Muller Hinton estándar (B).

La movilidad bacteriana resulta importante en el proceso de colonización e infección por *C. jejuni*, ya que está comprobado que el microorganismo se desplaza utilizando su flagelo siguiendo a quimio-atrayentes que se encuentran en el sitio de infección, como las mucinas y la fucosa (Ferrero y Lee, 1988). No obstante, los resultados de los ensayos de movilidad realizados en este trabajo mostraron la ausencia de *swimming*, *swarming* y *fitness* en *C. jejuni* cultivado en agar Brucella y en MH. La presencia de fucosa, fucoïdan o sus oligosacáridos tampoco afectaron el movimiento. La Figura 19 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos al utilizar las concentraciones más altas de compuesto fucosilados.



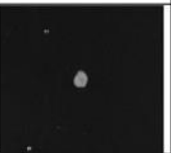
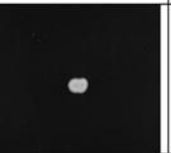










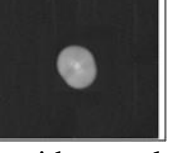
Ensayo	Fucosa	Fucoïdan	Oligosacáridos	Control	Control positivo
Swimming (0.3% agar)					
Swarming (0.7% agar)					
Fitness (0.8% agar, Brucella 1X)					

Figura 19. Efecto de la presencia de fucosa, fucoïdan y oligosacáridos de fucoïdan en el fenotipo de movilidad de *Campylobacter jejuni*. Se muestran los resultados obtenidos al probar concentraciones de 100 µg/mL de compuestos fucosilados.

La quimiotaxis juega un papel importante en la patogenicidad de *C. jejuni*, ya que permite la llegada de este patógeno al sitio de infección, gracias a la movilidad que le imparte su flagelo polar. Los mutantes que carecen de la vía de transducción de señales de quimiotaxis (*che*) son menos virulentos y exhiben una colonización reducida en modelos de colonización de pollo y ratón (Hendrixson y DiRita, 2004; Chang y Miller, 2006). Además de mostrar atenuación en el modelo de enfermedad de hurón (Yao *et al.*, 1997). La L-fucosa es el único carbohidrato quimioatrayente para *C. jejuni* (Hugdahl *et al.*, 1988; Dwivedi *et al.*, 2016) y sus mutantes de quimiotaxis, como *cheA* (Reuter y van Vliet, 2013), no nadan hacia este azúcar.

En este estudio no se observó ningún efecto sobre la movilidad en los controles de *C. jejuni*. Resultados similares fueron reportados por Cohen *et al.* (2020) al aplicar la misma técnica, sin embargo, estos investigadores observaron posteriormente, que el aumento de viscosidad en el medio de cultivo, mediante la adición de carboximetil celulosa permitía la observación del swimming. Otra alternativa es utilizar métodos más sensibles como la microscopía de fluorescencia de video de alta velocidad. Con esta técnica se ha observado el desplazamiento de *C. jejuni* a través del movimiento y coordinación de sus flagelos y el aumento de la velocidad del nado en ambientes más viscosos (Cohen *et al.*, 2020). Otra técnica que puede utilizarse para estudiar la movilidad de *C. jejuni* es la del video. Shigematsu *et al.* (1998) estudiaron los patrones de natación de *Campylobacter jejuni* en ambientes de baja y alta viscosidad, utilizando esta técnica. En medios de baja viscosidad, *C. jejuni* nadó a una velocidad promedio de 39.3 $\mu\text{m/s}$ con frecuentes cambios de dirección. La velocidad de *C. jejuni* aumentó significativamente en un medio con una viscosidad de alrededor de 40 centipoises exhibiendo patrones repetidos de nado de ida y vuelta (espiral) parecidos al patrón de nado de las espiroquetas. Esto implica que el patógeno cambia su patrón de movilidad dependiendo de la viscosidad del medio. La forma de nado espiral de *C. jejuni* podría influir significativamente en su capacidad de nadar en medios de alta viscosidad como la capa mucosa del tracto intestinal. Por lo tanto, es recomendable utilizar este tipo de técnicas para poder ver el comportamiento de la bacteria en presencia de fucosa y de fucoïdan y sus oligosacáridos.

6.7. Análisis de Adhesión

Para determinar el efecto del fucoïdan y sus oligosacáridos en la adhesión de *C. jejuni* se utilizó la técnica MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbons), midiendo el % de adhesión de la bacteria a *p*-xileno, misma que se muestra en la Figura 20. En general se observó una disminución de la adhesión del patógeno en presencia de las moléculas fucosiladas, siendo más consistente el efecto de los OFuc el cual fue concentración dependiente. Se ha demostrado que *C. jejuni* se une a estructuras fucosiladas (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003; Day *et al.*, 2009) y esta unión es inhibida por estructuras que contienen fucosa, como los oligosacáridos de la leche humana (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003). Los resultados del análisis realizado en este trabajo apoyan dicha evidencia. Sin

embargo, deben realizarse ensayos más específicos para probarlo, por lo que se recomienda utilizar ensayos con líneas celulares.

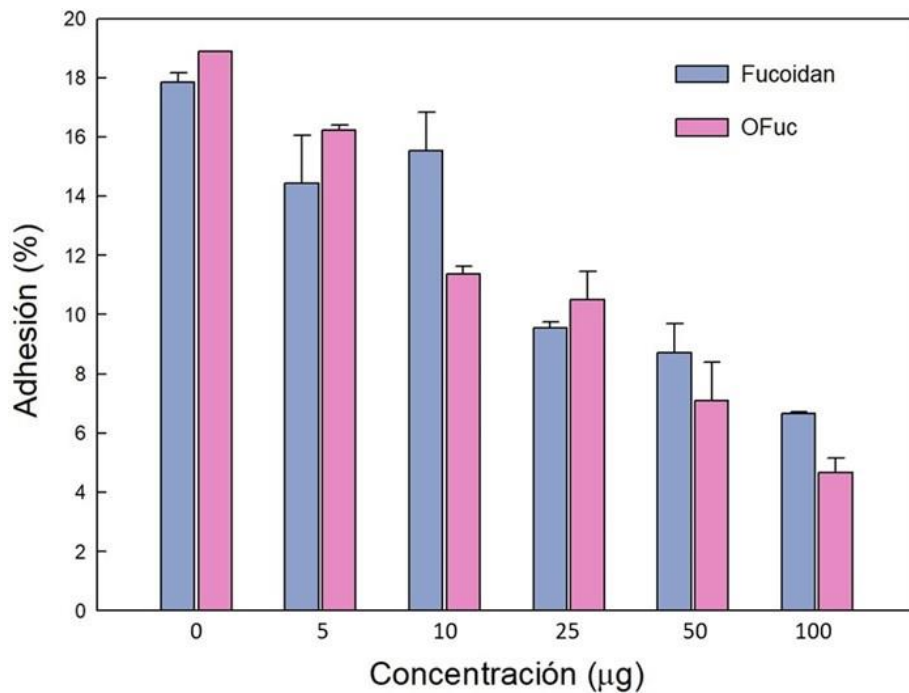


Figura 20. Efecto de la presencia de fucoidan y sus oligosacáridos en la adhesión de *C. jejuni* a p-xileno.

7. RESUMEN DE HALLAZGOS Y CONCLUSIÓN

7.1. Resumen de Hallazgos

Los espectros FTIR-ATR de los oligosacáridos obtenidos mostraron patrones similares a los del fucoïdan nativo, indicando que se conservó la estructura de las fucosas.

El fucoïdan disminuyó la tasa de crecimiento de *C. jejuni* a concentraciones mayores de 25 µg/mL.

La presencia de fucoïdan y de oligosacáridos de fucoïdan disminuyó la formación de biopelículas de *C. jejuni* con acción concentración-dependiente

No se observaron efectos de los compuestos fucosilados sobre los fenotipos de motilidad de *C. jejuni*.

La presencia de fucoïdan y de sus oligosacáridos disminuyeron la adhesión de *C. jejuni* a p-xileno con acción concentración dependiente.

7.2. Conclusión

La presencia de fucoïdan y sus oligosacáridos, disminuyó la formación de biopelículas y la adherencia de *Campylobacter jejuni*, ambos factores de virulencia relacionados con quorum sensing. No se observó efecto de estos compuestos, ni en la supervivencia ni en la movilidad del patógeno.

7.3. Recomendaciones

Se recomienda determinar la correlación de la inhibición de QS, (utilizado mutantes del gen luxS y otros relacionados con el QS), para una mejor comprensión del efecto del fucoïdan y sus oligosacáridos.

8. REFERENCIAS

- Abraham, S.N., Sharon, N., Ofek, I. y Schwartzman, J.D. 2015. Adhesion and Colonization. En: Y.W. Tang, D. Liu, I. Poxton y J. Schwartzman (eds.). *Molecular Medical Microbiology*. Elsevier, Ámsterdam, 409-421 pp.
- Acheson, D. y Allos, B.M. 2001. *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases*. 32(8): 1201-1206.
- Ale, M.T., Mikkelsen, J.D. y Meyer, A.S. 2011. Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Marine Drugs*. 9(10): 2106-2130.
- Ayrapetyan, O.N., Obluchinskaya, E.D., Zhurishkina, E.V., Skorik, Y.A., Lebedev, D.V., Kulminskaya, A.A. y Lapina, I.M. 2021. Antibacterial Properties of Fucoidans from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Biology*, 10(1), 67.
- Bassler, B.L. 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*. 109(4):421-424.
- Bezek, K., Kurinčič, M., Knauder, E., Klančnik, A., Raspor, P., Bucar, F. y Možina, S.S. 2016. Attenuation of adhesion, biofilm formation and *quorum sensing* of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. *Phytotherapy research*. 30(9): 1527-1532.
- Bhunja, A.K. 2018. *Foodborne Microbial Pathogens*. Springer. Segunda edición. New York. 25 pp.
- Blanco-Pascual, N., Montero, M.P. y Gómez-Guillén, M.C. 2014. Antioxidant film development from unrefined extracts of brown seaweeds *Laminaria digitata* and *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloids*. 37: 100-110.
- Bolton, D. J. 2015. *Campylobacter* virulence and survival factors. *Food Microbiology*. 48: 99-108.
- Bronnec, V., Turoňová, H., Bouju, A., Cruveiller, S., Rodrigues, R., Demnerova, K., Tresse, O., Haddad, N. y Zagorec, M. 2016. Adhesion, Biofilm Formation, and Genomic Features of *Campylobacter jejuni* Bf, an Atypical Strain Able to Grow under Aerobic Conditions. *Frontiers in Microbiology*. 7:1002.
- Brown, H.L., Reuter, M., Salt, L.J., Cross, K.L., Betts, R.P. y van Vliet, A.H. 2014. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(22): 7053-7060.
- Carr, J. 2011. Public Health Image Library. Recuperado de <http://www.bacteriainphotos.com/Campylobacter%20jejuni%20electron%20microscopy.html>
- Castillo, S., Heredia, N. y García, S. 2015. 2(5H)-Furanone, epigallocatechin gallate, and a citric-based disinfectant disturb *quorum-sensing* activity and reduce motility and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Folia Microbiológica*. 60(1): 89-95.
- Castillo, S., Heredia, N., Aréchiga-Carvajal, E. y García, S. 2014. Citrus Extracts as Inhibitors of

- Quorum sensing*, Biofilm Formation and Motility of *Campylobacter jejuni*. Food Biotechnology. 28(2): 106-122.
- Castillo-Juárez, I., Maeda, T., Mandujano-Tinoco, E.A., Tomás, M., Pérez-Eretza, B., García-Contreras, S.J., Wood, T.K. y García-Contreras, R. 2015. Role of *quorum sensing* in bacterial infections. World Journal of Clinical Cases: WJCC. 3(7): 575-598.
- Chang, C. y Miller, J. F. 2006. *Campylobacter jejuni* colonization of mice with limited enteric flora. Infection and Immunity, 74(9), 5261-5271.
- Cid, H., Ortiz, C., Pizarro, J. y Moreno-Piraján, J.C. 2020. Effect of copper (II) biosorption over light metal cation desorption in the surface of *Macrocystis pyrifera* biomass. Journal of Environmental Chemical Engineering. 8(3): 103729.
- Cloak, O.M., Solow, B.T., Briggs, C.E., Chen, C.Y. y Fratamico, P.M. 2002. *Quorum sensing* and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in foods. Applied and Environmental Microbiology. 68(9), 4666-4671.
- Cohen, E.J., Nakane, D., Kabata, Y., Hendrixson, D.R., Nishizaka, T. y Beeby, M. 2020. *Campylobacter jejuni* motility integrates specialized cell shape, flagellar filament, and motor, to coordinate action of its opposed flagella. PLoS Pathogens, 16(7), e1008620-e1008620.
- Davis, L. y DiRita, V. 2008. Growth and Laboratory Maintenance of *Campylobacter jejuni*. Current Protocols in Microbiology, 10(1): 8A.1.1-8A.1.7.
- Day, C.J., Tiralongo, J., Hartnell, R.D., Logue, C.A., Wilson, J. C., von Itzstein, M. y Korolik, V. 2009. Differential carbohydrate recognition by *Campylobacter jejuni* strain 11168: influences of temperature and growth conditions. PLoS One. 4(3): e4927.
- Defoirdt, T., Miyamoto, C.M., Wood, T.K., Meighen, E.A., Sorgeloos, P., Verstraete, W. y Bossier, P. 2007. The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts *quorum sensing*-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR. Environmental Microbiology. 9(10): 2486-2495.
- Dos Santos-Eduardo, A.J. 2007. Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Dwivedi, R., Nothhaft, H., Garber, J., Xin Kin, L., Stahl, M., Flint, A., van Vliet, A.H.M., Stintzi, A. y Szymanski, C.M. 2016. L-fucose influences chemotaxis and biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. Molecular Microbiology, 101: 575-589.
- Elvers, K.T. y Park, S.F. 2002. *Quorum sensing* in *Campylobacter jejuni*: Detection of a luxS encoded signaling molecule. Microbiology. 148(5): 1475-1481.
- Ferrero, R.L. y Lee, A. 1988. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: comparison with conventional rod-shaped bacteria. Journal of general microbiology, 134(1), 53-59.
- Fitton, J.H., Stringer, D.N., Park, A.Y. y Karpinić, S.S. 2019. Therapies from Fucoidan: New Developments. Marine Drugs. 17(10): 571.
- Fitton, J.H., Stringer, D.N. y Karpinić, S.S. 2015. Therapies from Fucoidan: An Update. Marine

drugs. 13(9): 5920-5946.

- Fonseca, B.B., Fernandez, H. y Rossi, D.A. 2016. *Campylobacter* spp. and Related Organisms in Poultry. Springer International Publishing. Primera edición. Switzerland. 206 pp.
- Galloway, W.R., Hodgkinson, J.T., Bowden, S. D., Welch, M. y Spring, D.R. 2011. *Quorum sensing* in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 *quorum sensing* pathways. *Chemical Reviews*. 11(1): 28-67.
- Garber, J. M., Nothaft, H., Pluvinage, B., Stahl, M., Bian, X., Porfirio, S., . . . Szymanski, C. M. (2020). The gastrointestinal pathogen *Campylobacter jejuni* metabolizes sugars with potential help from commensal *Bacteroides vulgatus*. *Communications Biology*, 3(1), 2. doi:10.1038/s42003-019-0727-5
- Gözl, G., Adler, L., Huehn, S. y Alter, T. 2012. LuxS distribution and AI-2 activity of *Campylobacter* spp.. *Journal of Applied Microbiology*. 112(3): 571-578.
- Gómez-Ordóñez, E. y Rupérez, P. 2011. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. *Food Hydrocolloids*. 25(6): 1514-1520.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G. y Naumann, D. 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal General Microbiology*, 137(1), 69-79.
- Hendrixson, D.R. y DiRita, V.J. 2004. Identification of *Campylobacter jejuni* genes involved in commensal colonization of the chick gastrointestinal tract. *Molecular Microbiology*, 52(2), 471-484.
- Hugdahl, M.B. Beery, J.T. y Doyle M.P. 1988. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity*, 56(6): 1560-1566.
- Igwaran, A. y Okoh, A.I. 2019. Human *Campylobacteriosis*: A public health concern of global importance. *Heliyon*. 5(11): e02814.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J. y Ewart, H.S. 2011. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Marine Drugs*. 9(2): 196-223.
- Johansson, E.M.V., Crusz, S.A., Kolomiets, E., Buts, L., Kadam, R.U., Cacciarini, M., Bartels, K.M., Diggle, S.P., Cámara, M., Williams, P., Loris, R., Nativi, C., Rosenau, F., Jaeger, K.E., Darbre, T. y Reymond, J.L. 2008. Inhibition and Dispersion of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms by Glycopeptide Dendrimers Targeting the Fucose-Specific Lectin LecB. *Chemistry & Biology*. 15(12): 1249-1257.
- John, D.A., Williams, L.K., Kanamarlapudi, V., Humphrey, T.J. y Wilkinson, T.S. 2017. The Bacterial Species *Campylobacter jejuni* Induce Diverse Innate Immune Responses in Human and Avian Intestinal Epithelial Cells. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1840.
- Joshua, G.P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A. y Wren, B. 2006. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*. 152(2): 387-396.
- Jun, J.Y., Jung, M.J., Jeong, I.H., Yamazaki, K., Kawai, Y. y Kim, B.M. 2018. Antimicrobial and antibiofilm activities of sulfated polysaccharides from marine algae against dental plaque bacteria. *Marine Drugs*, 16(9), 301.
- Kaakoush, N.O., Castaño-Rodríguez, N., Mitchell, H.M. y Man, S.M. 2015a. Global Epidemiology

of *Campylobacter* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 28(3): 687-720.

- Kaakoush, N.O., Mitchell, H.M. y Man, S.M. 2015b. *Campylobacter*. En: Y.W. Tang, M. Sussman, D. Liu, I. Poxton y J. Schwartzman (eds.). *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, Cambridge. 1187-1236 pp.
- Kandasamy, S., Khan, W., Kulshreshtha, G., Evans, F., Critchley, A.T., Fitton, J.H., Stringer, D.N., Gardiner, V.A. y Prithiviraj, B. 2015. The fucose containing polymer (FCP) rich fraction of *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Protects *Caenorhabditis elegans* against *Pseudomonas aeruginosa* by triggering innate immune signaling pathways and suppression of pathogen virulence factors. *ALGAE*. 30(2): 147-161.
- Keener, K.M., Bashor, M.P., Curtis, P.A., Sheldon, B.W. y Kathariou, S. 2004. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3(2): 105-116.
- Khan, F., Manivasagan, P., Lee, J.W., Pham, D.T.N., Oh, J. y Kim, Y.M. 2019. Fucoidan-stabilized gold nanoparticle-mediated biofilm inhibition, attenuation of virulence and motility properties in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Marine Drugs*, 17(4): 208.
- Kim, S., Jeong, J., Lee, H., Lee, J., Lee, S., Ha, J., Choi, Y., Yoon, Y. y Choi, K. H. 2017. Kinetic Behavior of *Campylobacter jejuni* in Beef Tartare at Cold Temperatures and Transcriptomes Related to Its Survival. *Journal of Food Protection*. 80(12): 2127-2131.
- Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J.M., Cepeda, A. y Franco, C.M. 2018. *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 98(11): 4014-4032.
- Larrosa-Haro, A. Macias-Rosales, R., Sánchez-Ramírez, C. A., Cortés-López, M.C. y Aguilar-Benavides, S. 2010. Seasonal variation of enteropathogens in infants and preschoolers with acute diarrhea in western Mexico. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 51(4): 534-536.
- Lártiga-Fattah, N.A. 2017. Adherencia e invasión a células intestinales humanas de cepas de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* aisladas de humanos y animales productivos (Tesis de maestría). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Lastovica, A.J., On, S.L.W. y Zhang, L. 2014. The Family *Campylobacteraceae*. En: E. Rosenberg, E.F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, y F. Thompson (eds.). *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilon proteobacteria*. Springer, New York, 307-335 pp.
- Lesic, B., Lépine, F., Déziel, E., Zhang, J., Zhang, Q., Padfield, K., Castonguay, M.H., Milot, S., Stachel, S., Tzika, A.A., Tompkins, R.G. y Rahme, L.G. 2007. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS pathogens*. 3(9): 1229-1239.
- Mahdavi, J., Pirinccioglu, N., Oldfield, N.J., Carlsohn, E., Stoof, J., Aslam, A., Self, T., Cawthraw, S.A., Petrovska, L., Colborne, N., Sihlbom, C., Borén, T., Wooldridge, K.G. y Ala'Aldeen, D.A.A. 2014. A novel O-linked glycan modulates *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein-mediated adhesion to human histo-blood group antigens and chicken colonization. *Open Biology*. 4(1): 130202.
- Marais, M.F. y Joseleau, J.P. 2001. A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate*

Research. 336(2): 155-159.

- McLennan, M.K., Ringoir, D.D., Frirdich, E., Svensson, S.L., Wells, D.H., Jarrell, H. y Gaynor, E.C. 2008. *Campylobacter jejuni* biofilms up-regulated in the absence of the stringent response utilize a calcofluor white-reactive polysaccharide. *Journal Bacteriology*, 190(3), 1097-1107.
- Mehlman, I.J. y Romero, A. 1982. Improved growth medium for *Campylobacter* species. *Applied and environmental microbiology*, 43(3), 615–618.
- Melo, R.T., Mendonça, E.P., Monteiro, G.P., Siqueira, M.C., Pereira, C.B., Peres, P.A.B.M. y Rossi, D.A. 2017. Intrinsic and Extrinsic Aspects on *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Frontier in Microbiology*, 8(1332).
- Moorhead, S.M. y Griffiths, M.W. 2011. Expression and characterization of cell-signaling molecules in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*. 110(3):786-800.
- Muraoka, W. T., & Zhang, Q. (2011). Phenotypic and genotypic evidence for L-fucose utilization by *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol*, 193(5), 1065-1075. doi:10.1128/jb.01252-10
- Novais, Â., Freitas, A. R., Rodrigues, C. y Peixe, L. 2019. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(3).
- Ó Cróinín, T. y Backert, S. 2012. Host Epithelial Cell Invasion by *Campylobacter jejuni*: Trigger or Zipper Mechanism?. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2: 25.
- Oliveira, C., Ferreira, A.S., Novoa-Carballal, R., Nunes, C., Pashkuleva, I., Neves, N.M., Coimbra, M.A., Reis, R.L., Martins, A. y Silva, T.H. 2017. The Key Role of Sulfation and Branching on Fucoidan Antitumor Activity. *Macromolecular Bioscience*. 17(5).
- On, S.L.W. 2001. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: Current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*. 90(6): 1S-15S.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2018. *Campylobacter*. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/Campylobacter>
- Papenfort, K. y Bassler, B. L. 2016. *Quorum sensing* signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 14(9): 576-588.
- Perez-Perez, G.I. y Kienesberger, S. 2013. Chapter 9 - *Campylobacter*. En: J.G. Morris y M.E. Potter (eds.). *Foodborne Infections and Intoxications*. Elsevier, Amsterdam, 165-185.
- Plummer, P., Sahin, O., Burrough, E., Sippy, R., Mou, K., Rabenold, J., Yaeger, M. y Zhang, Q. 2011. The critical role of LuxS in the virulence of *Campylobacter jejuni* in a guinea pig model of abortion. *Infection and Immunity*. 80(2): 585–593.
- Plummer, P.J. 2012. LuxS and *quorum-sensing* in *Campylobacter*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2: 22.
- Pomin V.H., Valente A.P., Pereira M.S. y Mourão P.A.S. 2005. Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides. *Glycobiology*. 15(12): 1376-1385.
- Ponce, N.M.A. y Stortz, C.A. 2020. A comprehensive and comparative analysis of the fucoidan

- compositional data across the Phaeophyceae. *Frontiers in Plant Science*, 11(1844).
- Püning, C., Su, Y., Lu, X. y Gözl, G. 2021. Molecular Mechanisms of *Campylobacter* Biofilm Formation and *Quorum Sensing*. En: Backert, S. (eds.) *Fighting Campylobacter Infections. Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer, New York. 293-319 pp.
- Quinones, B., Miller, W.G., Bates, A.H. y Mandrell, R.E. 2009. Autoinducer-2 production in *Campylobacter jejuni* contributes to chicken colonization. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(1), 281-285.
- Reeser, R.J., Medler, R.T., Billington, S.J., Jost, B.H. y Joens, L.A. 2007. Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(6): 1908-1913.
- Reuter, M., y van Vliet, A. H. (2013). Signal balancing by the CetABC and CetZ chemoreceptors controls energy taxis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 8(1), e54390.
- Rodrigues, A.C., Oliveira, B.D., de Silva, E.R., da Sacramento, N.T.B., Bertoldi, M.C. y Pinto, U.M. 2016. Anti-*quorum sensing* activity of phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry). *Food Science and Technology*. 36(2): 337-343.
- Ruiz-Palacios, G.M., Cervantes, L.E., Ramos, P., Chavez-Munguia, B. y Newburg, D.S. 2003. *Campylobacter jejuni* Binds Intestinal H(O) Antigen (Fuca1, 2Galβ1, 4GlcNAc), and Fucosyloligosaccharides of Human Milk Inhibit Its Binding and Infection. *Journal of Biological Chemistry*. 278(16): 14112-14120.
- Sandoval-Larios, G. 2021. Síntesis y evaluación de nanomatrices de neoglicanos de fucoidan como antagonistas glicomiméticos para *Campylobacter jejuni* (Tesis de maestría). CIAD, Sonora, México.
- Sharon, N., y Lis, H. 2007. *Lectins*. Springer. Segunda edición. Dordrecht. 1 - 364 pp.
- Shigematsu, M., Umeda, A., Fujimoto, S. y Amako, K. 1998. Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. *Journal Medical Microbiology*, 47(6), 521-526.
- Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P.A. y Teixeira, P. 2011. *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Frontiers in Microbiology*. 2: 200.
- Šimunović, K., Ramić, D., Xu, C. y Smole Možina, S. 2020. Modulation of *Campylobacter jejuni* Motility, Adhesion to Polystyrene Surfaces, and Invasion of INT407 Cells by *Quorum-Sensing* Inhibition. *Microorganisms*. 8(1): 104.
- Skriptsova, A.V. 2015. Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russian Journal of Marine Biology*, 41(3), 145-156.
- Sommer, R., Wagner, S., Rox, K., Varrot, A., Hauck, D., Wamhoff, E.C., Schreiber, J., Ryckmans, T., Brunner, T., Rademacher, C., Hartmann, R.W., Brönstrup, M., Imberty, A. y Titz, A. 2018. Glycomimetic, Orally Bioavailable LecB Inhibitors Block Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*. 140(7): 2537-2545.
- Sousa, C., Novais, Â., Magalhães, A., Lopes, J. y Peixe, L. 2013. Diverse high-risk B2 and D *Escherichia coli* clones depicted by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Scientific Reports*, 3, 3278.

- Stahl, M., Friis, L.M., Nothaft, H., Liu, X., Li, J., Szymanski, C.M. y Stintzi, A. 2011. Fucose utilization provides *Campylobacter jejuni* with a competitive advantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(17), 7194.
- Subramani, R. y Jayaprakashvel, M. 2019. Bacterial *Quorum sensing*: Biofilm Formation, Survival Behaviour and Antibiotic Resistance. En: P. V. Bramhachari (ed.). *Implication of Quorum sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry*. Springer, Singapore, 21-37 pp.
- Sulaeman, S., Hernould, M., Schaumann, A., Coquet, L., Bolla, J.M., Dé, E. y Tresse, O. 2012. Enhanced Adhesion of *Campylobacter jejuni* to Abiotic Surfaces Is Mediated by Membrane Proteins in Oxygen-Enriched Conditions. *PLoS One*. 7(9): e46402.
- Svensson, S.L., Pryjma, M., y Gaynor, E.C. 2014. Flagella-mediated adhesion and extracellular DNA release contribute to biofilm formation and stress tolerance of *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, 9(8), e106063.
- Teren, M., Turonova-Michova, H., Vondrakova, L. y Demnerova, K. 2019. Molecules Autoinducer 2 and cjA and Their Impact on Gene Expression in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 28(5): 207-215.
- Tiralongo, J. y Moran, A.P. 2010. Bacterial lectin-like interactions in cell recognition and adhesion. En: O. Holst, P.J. Brennan y M. von Itzstein (eds.). *Microbial Glycobiology*. Elsevier, Amsterdam, 549-565 pp.
- Tram, G., Day, C.J. y Korolik, V. 2020. Bridging the Gap: A Role for *Campylobacter jejuni* Biofilms. *Microorganisms*, 8(3).
- Turan, N.B. y Engin, G.Ö. 2018. Chapter Four - *Quorum Quenching*. En: D.S. Chormey, S. Bakirdere, N.B. Turan, y G.Ö. Engin (eds.). *Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 117-149 pp.
- Turonova, H., Briandet, R., Rodrigues, R., Hernould, M., Hayek, N., Stintzi, A. y Tresse, O. 2015. Biofilm spatial organization by the emerging pathogen *Campylobacter jejuni*: comparison between NCTC 11168 and 81-176 strains under microaerobic and oxygen-enriched conditions. *Frontiers in Microbiology*, (6): 709.
- Turonova, H., Neu, T.R., Ulbrich, P., Pazlarova, J. y Tresse, O. (2016). The biofilm matrix of *Campylobacter jejuni* determined by fluorescence lectin-binding analysis. *Biofouling*, 32(5), 597-608.
- Van Weelden, G., Bobiński, M., Okła, K., Van Weelden, W.J., Romano, A. y Pijnenborg, J.M.A. 2019. Fucoidan Structure and Activity in Relation to Anti-Cancer Mechanisms. *Marine Drugs*. 17(1): 32.
- Vandamme, P., Dewhirst, F.E., Paster, B.J. y On, S.L. W. 2005. Familia *Campylobacteraceae*. Género *Campylobacter*. En: D.J. Brenner, N.R. Krieg y J.T. Staley (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, New York. 1145-1160 pp.
- Velayudhan, J. y Kelly, D.J. 2002. Analysis of gluconeogenic and anaplerotic enzymes in *Campylobacter jejuni*: an essential role for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Microbiology*, 148(3), 685-694.
- Versalovic, J., Carroll, K., Funke, G., Jorgensen, J., Landry, M. y Warnock, D. 2011. *Manual of*

Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington, DC. Clinical Infectious Diseases, 1, 308-330.

- Wagley, S., Newcombe, J., Laing, E., Yusuf, E., Sambles, C.M., Studholme, D.J. y Champion, O.L. 2014. Differences in carbon source utilization distinguish *Campylobacter jejuni* from *Campylobacter coli*. BMC Microbiology, 14(1), 262.
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., y Zhou, G. 2013. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. International Journal Food Microbiology, 167(3), 293-302.
- Wang, S., Wang, J., Mou, H., Luo, B. y Jiang, X. 2015. Inhibition of Adhesion of Intestinal Pathogens (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, and *Salmonella* Typhimurium) by Common Oligosaccharides. Foodborne Pathogens and Disease. 12(4): 360-365.
- Webb, A.L., Selinger, L.B., Taboada, E.N. y Inglis, G.D. 2018. Subtype-Specific Selection for Resistance to Fluoroquinolones but Not to Tetracyclines Is Evident in *Campylobacter jejuni* Isolates from Beef Cattle in Confined Feeding Operations in Southern Alberta, Canada. Applied and Environmental Microbiology. 84(7): e02713-17.
- Yao, R., Burr, D.H. y Guerry, P. 1997. CheY-mediated modulation of *Campylobacter jejuni* virulence. Molecular Microbiology, 23(5), 1021-1031.
- Young, N.M., Brisson, J.R., Kelly, J., Watson, D.C., Tessier, L., Lanthier, P.H. y Szymanski, C.M. 2002. Structure of the N-Linked Glycan Present on Multiple Glycoproteins in the Gram-negative Bacterium, *Campylobacter jejuni*. Journal of Biological Chemistry, 277(45), 42530-42539.
- Zaidi, M.B., McDermott, P.F., Campos, F.D., Chim, R., Leon, M., Vazquez, G., Figueroa, G., López, E., Contreras, J. y Estrada-García, T. 2012. Antimicrobial-Resistant *Campylobacter* in the Food Chain in Mexico. Foodborne Pathogens and Disease. 9(9): 841-847.
- Zayed, A., El-Aasr, M., Ibrahim, A.S. y Ulber, R. 2020. Fucoïdan characterization: Determination of purity and physicochemical and chemical properties. Marine Drugs, 18(11).
- Zhang, W. y Li, C. 2016. Exploiting *Quorum sensing* Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications. Frontiers in Microbiology. 6: 1535.
- Zoueki, C.W., Tufenkji, N., y Ghoshal, S. 2010. A modified microbial adhesion to hydrocarbons assay to account for the presence of hydrocarbon droplets. Journal of Colloid and Interface Science, 344(2), 492-496.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Witt, J.C. y van't Riet, K. 1991. Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Applied and environmental microbiology, 57(4), 1094-1101.

9. ANEXO

9.1. Ajuste de Curvas de Crecimiento de *Campylobacter jejuni* en Presencia de Diferentes Concentraciones de Fucosa, Fucoidan y Oligosacáridos de Fucoidan.

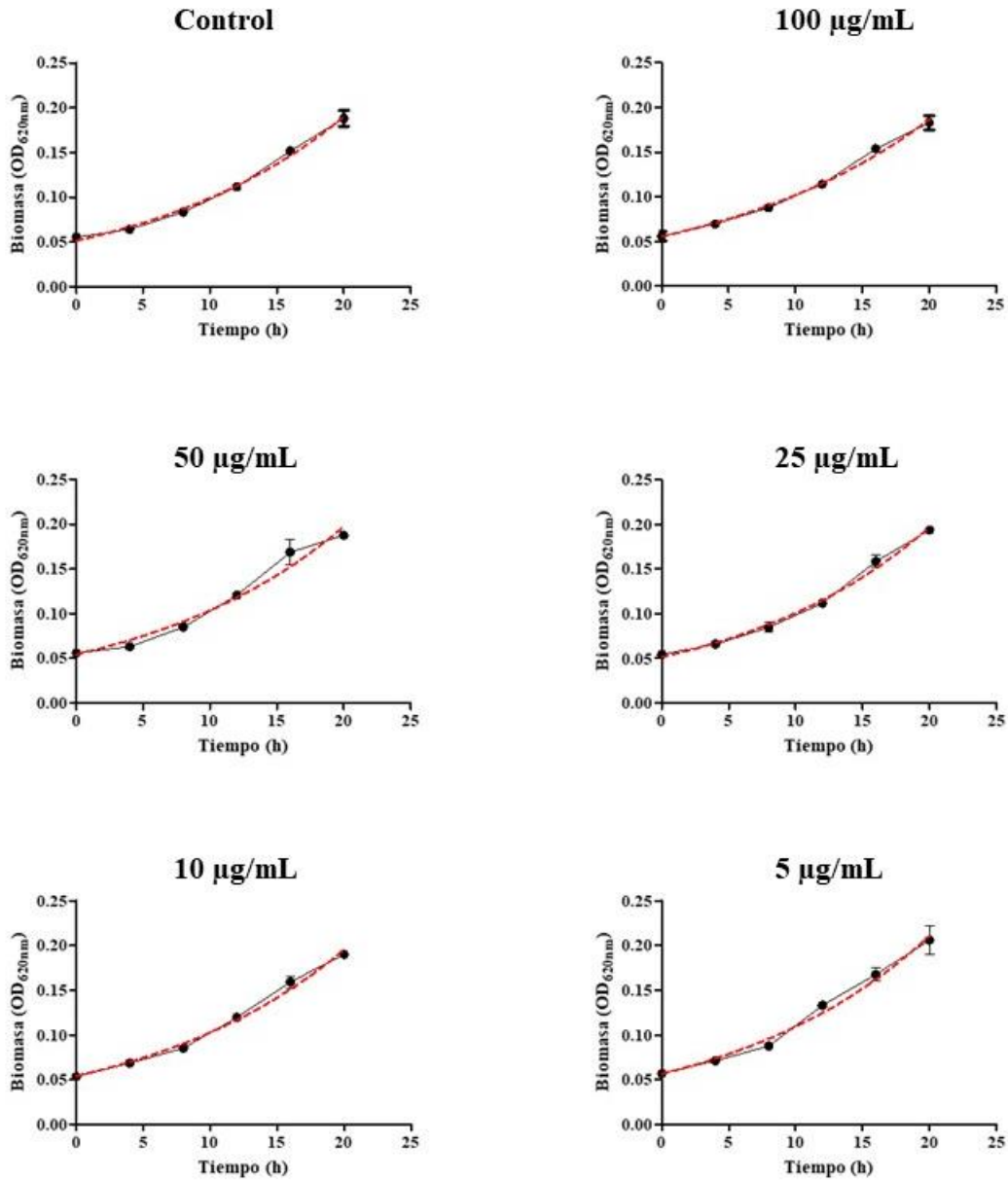


Figura A1. Ajuste al modelo exponencial de crecimiento del efecto de la adición de diferentes concentraciones de fucosa sobre las cinéticas de crecimiento de *C. jejuni* en caldo Brucella.

Cuadro A1. Efecto de diferentes concentraciones de fucosa sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni*.

Tratamiento	μ (h ⁻¹)	X _m (OD _{620nm})
100 μ g/mL	0.0605 ± 0.0111 ^a	0.2185 ± 0.0120 ^a
50 μ g/mL	0.0644 ± 0.0219 ^a	0.2250 ± 0.0070 ^a
25 μ g/mL	0.0670 ± 0.0124 ^a	0.2215 ± 0.0205 ^a
10 μ g/mL	0.0642 ± 0.0118 ^a	0.2290 ± 0.0127 ^a
5 μ g/mL	0.0658 ± 0.0182 ^a	0.2060 ± 0.0226 ^a
Control	0.0653 ± 0.0115 ^a	0.2165 ± 0.0304 ^a

Los valores indican la media ± el límite fiducial de 2 repeticiones. Diferentes literales indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

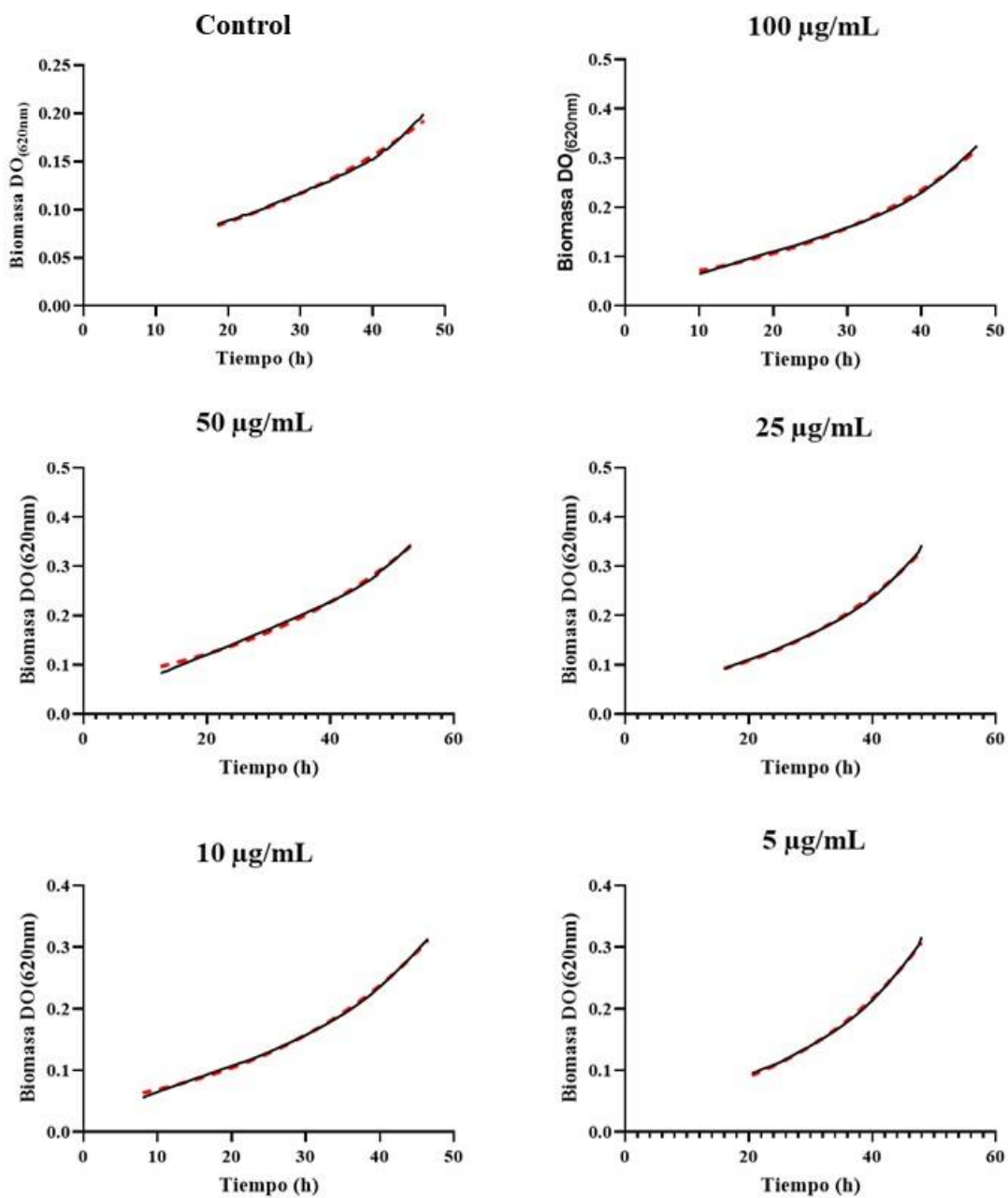


Figura A2. Ajuste al modelo exponencial de crecimiento del efecto de la adición de diferentes concentraciones de fucoidan sobre las cinéticas de crecimiento de *C. jejuni* en caldo Brucella.

Cuadro A2. Efecto de diferentes concentraciones de fucoidan sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni*.

Tratamiento	μ (h ⁻¹)	X _m (OD _{600nm})
100 μ g/mL	0.1268 ± 0.0223 ^a	0.3687 ± 0.0568 ^a
50 μ g/mL	0.1292 ± 0.0333 ^a	0.3467 ± 0.0674 ^a
25 μ g/mL	0.1266 ± 0.0282 ^a	0.2654 ± 0.0144 ^a
10 μ g/mL	0.1238 ± 0.0459 ^a	0.3892 ± 0.0284 ^a
5 μ g/mL	0.1539 ± 0.1314 ^a	0.2870 ± 0.0686 ^a
Control	0.1495 ± 0.0304 ^a	0.3206 ± 0.1042 ^a

Los valores indican la media ± el límite fiducial de 2 repeticiones. Diferentes literales indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

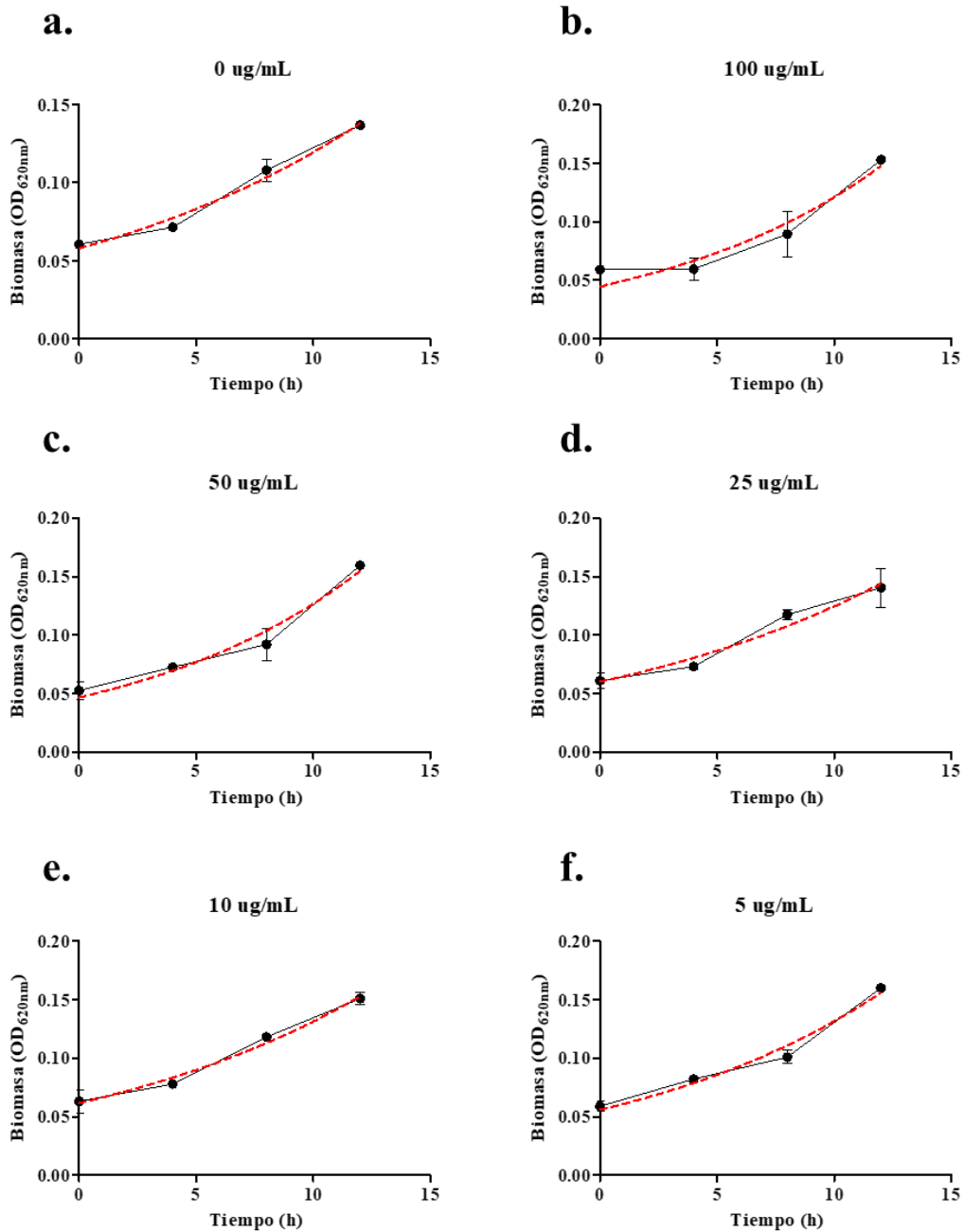


Figura A3. Ajuste al modelo exponencial de crecimiento del efecto de la adición de oligosacáridos de fucoidan OFuc sobre las cinéticas de crecimiento de *C. jejuni* en caldo Brucella. (a) Sin OFuc. (b) Concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de OFuc. (c) Concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ de OFuc. (d) Concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de OFuc. (e) Concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de OFuc. (f) Concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ de OFuc.

La cinética representada en la figura 14 muestra el crecimiento de *C. jejuni* bajo las diferentes concentraciones de OFuc. Gráficamente se encuentran pocas diferencias entre sí, lo que se confirma en el análisis estadístico del Cuadro 3, la velocidad específica de crecimiento (μ) y la biomasa máxima (X_m) no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en relación al control y las concentraciones de OFuc (cuadro 5). Por otro lado, en la figura 15 se muestra el ajuste del crecimiento de *C. jejuni* en las diferentes concentraciones de OFuc al modelo exponencial de crecimiento.

Cuadro A3. Efecto de diferentes concentraciones de OFuc sobre el crecimiento de *Campylobacter jejuni*.

Tratamiento	μ (h^{-1})	X_m (OD _{620nm})
100 μ g/mL	0.0994 \pm 0.0851 ^a	0.2165 \pm 0.0007 ^a
50 μ g/mL	0.0998 \pm 0.0603 ^a	0.2080 \pm 0.0006 ^a
25 μ g/mL	0.0727 \pm 0.0558 ^a	0.2090 \pm 0.0098 ^a
10 μ g/mL	0.0757 \pm 0.0329 ^a	0.2375 \pm 0.0007 ^a
5 μ g/mL	0.0857 \pm 0.0350 ^a	0.2345 \pm 0.0197 ^a
Control	0.0724 \pm 0.0290 ^a	0.2065 \pm 0.0176 ^a

Los valores indican la media \pm el límite fiducial de 2 repeticiones. Diferentes literales indican diferencia estadística ($p < 0.05$).