



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

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS
NÚCLEO-CORAZA FUCOSILADAS Y SIALILADAS, COMO
TRANSPORTADORES DE RIFAXIMINA DIRIGIDAS A
*Campylobacter jejuni***

Por:

Luz Esmeralda Mercado Gómez

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 Luz Esmeralda Mercado Gómez, 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



Dr. José Ángel Huerta Ocampo
Integrante del comité de tesis



Dr. Alfonso García Galaz
Integrante del comité de tesis



Dr. José Andrei Sarabia Sainz
Integrante del comité de tesis

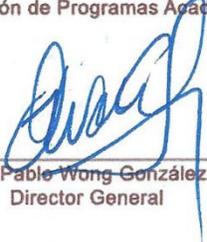
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Núcleo-coraza Fucosiladas y Sialiladas, como Transportadores de Rifaximina dirigidas a *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 Luz Esmeralda Mercado Gómez, 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 manuscrito en cuestión 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 lograr 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.

Al Fondo Sectorial SEP-CONACYT, por el financiamiento otorgado a través del proyecto A1-S-25043 “Síntesis y evaluación de antagonistas glicomiméticos para *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* enteropatógena, transformando glicanos extraídos de algas marinas”

A mi directora de Tesis, Dra. Gabriela Ramos Clamont Montfort por darme la oportunidad de participar en su proyecto y compartir conmigo sus conocimientos. Por abrirme las puertas cuando lo necesité. Además de darme su confianza y apoyo en todo momento.

A los Doctores Andre-i Sarabia Sainz, Alfonso García Galaz y José Ángel Huerta por formar parte de mi comité y enriquecer este proyecto de investigación con sus conocimientos.

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

Al Dr. Andre-i Sarabia y a la M.C. Nallely Terán Saavedra por capacitarme en las técnicas de síntesis de nanopartículas y facilitarnos su área de trabajo.

A la M.C. Giovanna Sandoval Larios por capacitarme en las técnicas de obtención de oligosacáridos de fucoidan por hidrólisis ácida, y su posterior caracterización por DLS, FTIR-ATR y SDS-PAGE. A la Lic. en Biól. Sharon Palafox por las capacitaciones en técnicas de microbiología. A la M.C. Ana María Guzmán Partida y a la Q.B. Rosa Idalia Armenta Corral por 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. A la Dra. Verónica Mata Haro, Coordinadora de Ciencia de los Alimentos.

A la Dra. Patricia Quintana Owen y al Dr. Víctor Rejón del Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales por facilitar los estudios de SEM y EDS y al Dr. Tomás Madera Santana por colaborar en los mismos.

A mis compañeros de maestría, por las risas, por el apoyo y por las memorias. A Valeria, Vianey, Diego y Ricardo.

A Ana María Calderón, por ser mi primera guía.

A René, Adriana, Orlando, Nina y Pame por siempre estar ahí.

A Sharon, por ser mi apoyo principal.

A Julio Cesar, no lo hubiera logrado sin ti.

DEDICATORIA

A mis padres, por creer en mí incluso cuando yo no lo hice, por levantarme siempre con su amor y borrar lo negativo con su sonrisa. Les debo todo lo que soy.

A Dios, y a mi familia por nunca dejarme sola.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. ANTECEDENTES	17
2.1. Gastroenteritis Infecciosa: Un Problema de Salud Pública.....	17
2.1.1. Agentes Etiológicos.....	18
2.1.1.1. <i>Campylobacter jejuni</i> como agente etiológico de gastroenteritis infecciosa.....	19
2.2 Características Patogénicas de <i>Campylobacter jejuni</i>	19
2.2.1. Características Microbiológicas de <i>Campylobacter jejuni</i>	20
2.2.2. Características patogénicas.....	20
2.3. Adhesinas Tipo Lectina en <i>Campylobacter jejuni</i>	22
2.3.1. Adhesinas Tipo Lectina y Biorreconocimiento.....	22
2.4. Antibióticos Utilizados Contra <i>Campylobacter jejuni</i>	24
2.4.1. Principales Antibióticos Utilizados.....	24
2.4.2. Resistencia Bacteriana.....	25
2.5. Encapsulamiento Activo o Biodirigido de Antibióticos.....	26
2.5.1. Definición y Ventajas.....	26
2.5.2. Fuentes de Fucosa y Ácido Siálico para Sintetizar Antagonistas Glicomiméticos.....	28
2.5.2.1. El fucoideano de <i>Macrocystis pyrifera</i> como fuente de fucosas.....	28
2.5.2.2. Obtención de oligosacáridos de fucoideano de <i>Macrocystis pyrifera</i>	29
2.5.2.3. Mucina submaxilar bovina como fuente de ácido siálico.....	30
2.5.3. Glicomatrices Obtenidas Mediante Reacción de Maillard Controlada.....	32
2.5.4. Síntesis de Nanopartículas Núcleo-Coraza.....	33
2.6. Antibióticos con Potencial para el Encapsulamiento Biodirigido a <i>Campylobacter jejuni</i>	35
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo General.....	38
4.2. Objetivos Particulares.....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1. Materiales.....	39
5.2. Crecimiento de la Bacteria.....	39

CONTENIDO (Continuación)

5.3. Obtención de Oligosacáridos de Fucoïdan Utilizando Hidrólisis Ácida y la Reacción de Fenton	40
5.3.1. Hidrólisis Ácida.....	40
5.3.2. Reacción de Fenton.....	40
5.4. Síntesis de Neoglicoconjugados Fucosilados y Uso de Mucina Submaxilar Bovina como Glicoconjugados Sialilados.....	41
5.4.1. Caracterización de los Neoglicoconjugados Fucosilados	42
5.5. Reconocimiento de Glicoconjugados por Lectinas de Plantas	42
5.6. Síntesis de Nanopartículas Núcleo-Coraza Cargadas con Rifaximina	43
5.7. Determinación de Tamaño, Carga Superficial y Rendimiento de Encapsulamiento de las Nanopartículas Núcleo-Coraza	44
5.8. Eficiencia de Encapsulamiento de Rifaximina.....	44
5.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para <i>Campylobacter jejuni</i> de Rifaximina y de Nanopartículas Cargadas con Antibiótico para <i>Campylobacter jejuni</i>	45
5.10. Interacción de las Nanopartículas con Cepas de <i>Campylobacter jejuni</i>	46
5.11. Análisis Estadístico	47
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
6.1. Rendimiento y Caracterización de Oligosacáridos de Fucoïdan	48
6.1.1. Rendimiento de Obtención de OFuc por Hidrólisis Ácida y Reacción de Fenton....	48
6.1.2. FTIR-ATR del Fucoïdan Nativo y sus Oligosacáridos.....	50
6.1.3. Distribución de Tamaño y Carga Superficial de los Oligosacáridos de Fucoïdan....	54
6.2. Caracterización de Neoglicanos BSA-OFuc	56
6.2.1. Espectros FTIR-ATR de los Neoglicanos Fucosilados	56
6.2.2. SDS-PAGE de glicoconjugados BSA-OFuc.....	57
6.3. Caracterización por FTIR-ATR, Tamaño Medio y Carga Superficial de la Mucina Submaxilar Bovina.....	59
6.4. Ensayo de Biorreconocimiento de BSA-OFuc y Muc-Sial.....	60
6.5. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial.....	62
6.5.1. Tamaño medio y potencial Z de las nanopartículas núcleo-coraza	62
6.5.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia de energía dispersiva (EDS) las nanopartículas núcleo coraza	64
6.6. Eficiencia de Encapsulamiento de Rifaximina	66
6.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Rifaximina y Nanopartículas Cargadas con antibiótico para <i>Campylobacter jejuni</i>	67
6.8. Interacción de las Nanopartículas Núcleo-Coraza con las adhesinas de <i>Campylobacter jejuni</i>	69
7. RESUMEN DE HALLAZGOS, CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES	72
7.1. Resumen de Hallazgos	72
7.2. Conclusión.....	72
7.3. Recomendaciones.....	73
8. REFERENCIAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación de la gastroenteritis y los agentes que las causan.....	17
2	Rutas paracelular y transcelular de invasión de <i>C. jejuni</i>	20
3	Proceso de internalización de <i>C. jejuni</i>	21
4	Relación dosis-efecto de agentes terapéuticos tradicionales contra vectorización activa.....	26
5	Terapia dirigida con antagonistas glicomiméticos.....	27
6	Estructura de la mucina submaxilar bovina.....	30
7	Principio para la síntesis de antagonistas glicomiméticos por la reacción de Maillard.....	32
8	Terapia biodirigida con nanopartículas núcleo-coraza funcionalizadas con carbohidratos y cargadas con antibiótico.....	33
9	Estructura química de la rifaximina.....	35
10	Rendimientos de la fragmentación del fucoidan por hidrólisis ácida y reacción de Fenton.....	48
11	Espectro FTIR-ATR del fucoidan de <i>Macrocystis pyrifera</i>	50
12	Comparación de los espectros FTIR-ATR de fucoidan de <i>M. pyrifera</i> y los oligosacáridos > 1 kDA obtenidos por reacción de Fenton en diferentes tratamientos.....	51
13	Comparación de los espectros FTIR-ATR de fucoidan de <i>M. pyrifera</i> y los oligosacáridos < 1 kDa, obtenidos por reacción de Fenton en diferentes tratamientos.....	52
14	Distribución de tamaño de oligosacáridos de fucoidan obtenidos por reacción de Fenton a 100 °C durante 2 h.....	54
15	Espectros FTIR-ATR del neoglicano fucosilado.....	56
16	Diferencias en la migración de las bandas de neoglicanos fucosilados en gel SDS-PAGE.....	57
17	Espectro FTIR-ATR de la mucina submaxilar bovina.....	59
18	Biorreconocimiento de BSA-OFuc por lectinas vegetales.....	60
19	Biorreconocimiento de Muc-Sial por lectinas vegetales.....	61
20	Micrografías de nanopartículas sintetizadas.....	64
21	Análisis composicional por espectroscopia de energía dispersiva de las nanopartículas sintetizadas.....	65

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
22	Concentración Mínima Inhibitoria de rifaximina contra <i>C. jejuni</i>	66
23	Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial cargadas con rifaximina.....	68
24	Biorreconocimiento de las nanopartículas BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial por <i>C. jejuni</i> en dos condiciones de crecimiento.....	69

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Fracciones obtenidas por ultrafiltración en tándem.....	39
2	Distribución de tamaño y carga superficial de los oligosacáridos de fucoidan obtenidos por reacción de Fenton a 100 °C durante 2 h.....	54
3	Estimación del grado de glicación de BSA-OFuc con base en su masa molecular.....	58
4	Distribución de tamaño y carga superficial de NPs BSA-OFuc, BSA-Muc-Sial y BSA-BSA-Lac.....	62

RESUMEN

La gastroenteritis infecciosa causada por *Campylobacter jejuni* es la más frecuente a nivel mundial. La infección puede ser fatal para niños, ancianos y personas inmunocomprometidas y en algunos casos deriva en complicaciones importantes. El problema se agrava por la resistencia que la bacteria ha adquirido hacia muchos antibióticos. Una estrategia de control es utilizar nanocápsulas funcionalizadas con elementos de biorreconocimiento, cargadas con un antibiótico al que el microorganismo no sea resistente, como la rifaximina. *C. jejuni* posee adhesinas que reconocen estructuras fucosiladas y sialiladas para unirse a los enterocitos. En este estudio se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas fucosiladas y sialiladas, núcleo-coraza, cargadas con rifaximina, como vectores activos dirigidos hacia *C. jejuni*. Se utilizó fucoidan como fuente de fucosa y mucina submaxilar bovina (Muc-Sial) como fuente de ácido siálico. La coraza fucosilada consistió en neoglicanos sintetizados conjugando albúmina sérica bovina (BSA) y oligosacáridos de fucosa (OFuc) obtenidos mediante la escisión del fucoidan utilizando la reacción de Fenton a diferentes temperaturas y tiempos (60 °C/8 h; 80 y 90 °C/4 h; 100 °C/2 h) y fraccionados por ultrafiltración (>1 kDa; <1 kDa). La coraza sialilada se sintetizó a partir de la Muc-Sial. Los OFuc se caracterizaron por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (FTIR-ATR), escogiendo la fracción > 1 kDa, por su mayor similitud con la molécula de fucoidan y el tratamiento de 100 °C/2 h, por ser más rápido y con mayor rendimiento. Los OFuc conjugados con BSA (BSA-OFuc), fueron reconocidos por la lectina de *Anguilla anguilla*, específica para fucosas unidas en α 1-3. La Muc-Sial fue reconocida por la lectina de *Maackia amurensis* específica para ácido siálicos unido en α 2-3. Se sintetizaron nanopartículas núcleo-coraza BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial cargando el núcleo (BSA) con rifaximina. La incorporación de la coraza (BSA-OFuc o Muc-Sial) se probó mediante dispersión dinámica de la luz, observándose un índice de polidispersidad de 0.08 % y carga superficial cercana a -30 mV en todos los casos. Los espectros FTIR-ATR, confirmaron la funcionalización. La eficiencia de encapsulamiento de la rifaximina fue del 24 % y la concentración mínima inhibitoria para *C. jejuni* de 1 mg/mL. Las nanopartículas BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial fueron reconocidas por las adhesinas de *C. jejuni* de manera temperatura dependiente, siendo un indicio de la expresión diferencial de adhesinas en *C. jejuni*. El conjunto de resultados indica que en condiciones *in vitro*

las nanopartículas fucosiladas y sialiladas sintetizadas, pueden ser exitosamente dirigidas hacia *C. jejuni*.

Palabras claves: antagonistas glicomiméticos, *Macrocystis pyrifera*, nanopartículas núcleo-coraza, rifaximina

ABSTRACT

Infectious gastroenteritis caused by *Campylobacter jejuni* is the most common worldwide. *Campylobacter* infections are generally mild, but can be fatal among very young children, elderly, and immunosuppressed individuals and in some cases leads to complications for the rest of people. In addition, antibiotic-resistant-bacteria are highly prevalent in many countries. Selective rifaximin targeting in functionalized nanoparticles can be an alternative for treating local infection. *C. jejuni* has adhesins that recognize fucosylated and sialylated structures to bind to enterocytes. In this study, rifaximin-loaded core-shell fucosylated and sialylated nanoparticles were synthesized and characterized as active vectors targeting *C. jejuni*. Fucoidan was used as a source of fucose and bovine submaxillary mucin (Muc-Sial) as a source of sialic acid. The fucosylated shell consisted of neoglycans synthesized by conjugating bovine serum albumin (BSA) and fucose oligosaccharides (OFuc) obtained by cleavage of fucoidan by the Fenton reaction at different temperatures and times (60 °C/8 h; 80 and 90 °C/4 h; 100 °C/2 h) and fractionated by ultrafiltration (> 1 kDa; < 1 kDa). The sialylated shell was synthesized from Muc-Sial. OFuc were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy and attenuated total reflection (FTIR-ATR), choosing the >1 kDa fraction, due to its greater similarity with the fucoidan molecule, and the 100 °C/ 2 h treatment, due to being faster and higher yield. BSA-conjugated OFucs (BSA-OFuc), were recognized by *Anguilla anguilla* lectin, specific for α 1-3-linked fucoses. Muc-Sial was recognized by the sialic acid-specific lectin from *Maackia amurensis* bound to α 2-3. BSA-BSA-OFuc and BSA-Muc-Sial core-shell nanoparticles were synthesized by loading the core (BSA) with rifaximin. The incorporation of the shell (BSA-OFuc or Muc-Sial) was tested by dynamic light scattering, observing a polydispersity index of 0.08% and a surface charge close to -30 mV in all cases. The FTIR-ATR spectra confirmed the nanoparticles functionalization. The encapsulation efficiency of rifaximin was 24% and the minimum inhibitory concentration for *C. jejuni* was 1 mg/mL. The BSA-BSA-OFuc and BSA-Muc-Sial nanoparticles were recognized by *C. jejuni* adhesins in a temperature-dependent manner, indicating the differential expression of adhesins in *C. jejuni*. Indicating that under *in vitro* conditions the synthesized fucosylated and sialylated nanoparticles can be successfully targeted to *C. jejuni*.

Key words: Glycomimetic antagonists, *Macrocystis pyrifera*, core-shell nanoparticles, rifaximina

1. INTRODUCCIÓN

La gastroenteritis infecciosa representa un problema de Salud Pública en México. Dentro de los síntomas se encuentran los cuadros de diarrea aguda que frecuentemente, ocasionan la muerte de niños menores de 5 años (IMSS, 2019). En la actualidad, *Campylobacter jejuni* representa la primera causa de gastroenteritis a nivel mundial (OMS, 2013). El tratamiento principal es asegurar la hidratación del paciente y, si la infección persiste, tratar con antibióticos. Sin embargo, el uso inadecuado de estos fármacos ha inducido la resistencia y multiresistencia a antibióticos, en una gran cantidad de cepas de *C. jejuni* (DuPont, 2014). Una alternativa para racionalizar el uso de antibióticos y hacerlos más efectivos es el encapsulamiento dirigido que utiliza matrices funcionalizadas que contienen elementos de biorreconocimiento (de Jesús Valle *et al.*, 2016). De esta manera, un antibiótico que sea efectivo contra *C. jejuni*, puede ser orientado hacia la superficie celular del patógeno, para unirse a esta y descargar el fármaco. Un elemento de reconocimiento regularmente presente en las bacterias Gram-negativas son las adhesinas tipo lectina. Éstas, reconocen y se unen a carbohidratos complejos o glicoconjugados, localizados en la superficie de la membrana plasmática del hospedero. Es decir, la bacteria se adhiere a la célula que va a infectar, reconociendo a sus carbohidratos, como primer paso de la infección (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014). Si se sintetizan matrices funcionalizadas que contengan carbohidratos análogos a los que la bacteria reconoce y se utilizan como matrices para el diseño de nanopartículas cargadas con antibióticos, pueden actuar como antagonistas glicomiméticos. Existe evidencia de reconocimiento lectina-carbohidrato en *C. jejuni* y de que se ha utilizado esta estrategia con anterioridad, para dirigir gentamicina hacia *E. coli* K88. En estos estudios, el diseño se basó en la síntesis de neoglicanos de BSA-lactosa, controlando la reacción de Maillard. Los neoglicanos obtenidos se utilizaron como matriz funcionalizada para el diseño de las nanopartículas (Sarabia-Sainz *et al.*, 2012). Una posible manera de combatir a *C. jejuni* es mediante el diseño de nanopartículas núcleo-coraza biodirigidas cargadas con rifaximina y funcionalizadas con neoglicanos fucosilados obtenidos por la reacción controlada de Maillard, buscando los parámetros adecuados de temperatura, tiempo y pH de reacción, y utilizando mucina submaxilar bovina como fuente de ácido siálico. Ya que, *C. jejuni* reconocen fucosa y ácido siálico dentro de sus mecanismos de infección. Además, el diseño de nanopartículas núcleo-coraza, representa una alternativa para

disminuir significativamente la cantidad de neoglicano, al colocarlo únicamente en la coraza de la nanopartícula. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue sintetizar y caracterizar nanopartículas núcleo-coraza fucosiladas y sialiladas cargadas con rifaximina dirigidas a *Campylobacter jejuni*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Gastroenteritis Infecciosa: Un Problema de Salud Pública

La gastroenteritis es la inflamación del tubo digestivo; es una patología frecuente y de alto impacto, principalmente en países subdesarrollados y en vías de desarrollo (Yalda-Lucero, 2014). De acuerdo con estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), es la tercera causa de urgencias médicas en México, por lo que se considera un problema de Salud Pública. Se estima que anualmente se otorgan 1,400,000 consultas al año, para atender esta enfermedad (IMSS, 2019). La gastroenteritis se clasifica en infecciosa y no infecciosa (Figura 1). La gastroenteritis infecciosa puede ser causada por bacterias, virus y parásitos, que contaminan agua y alimentos. La principal vía de contaminación es la fecal-oral (Yalda-Lucero, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente, una de cada diez personas en el mundo presenta gastroenteritis infecciosa (GEI) transmitida por agua y alimentos contaminados. Lo anterior produce una pérdida anual de 33 millones de años de vida saludable (OMS, 2020). La consecuencia es una incapacidad transitoria con el consecuente ausentismo laboral o escolar. Por ello, la GEI, es la segunda causa de morbilidad (Yalda-Lucero, 2014). Los síntomas más frecuentes son diarrea, fiebre, dolor abdominal, náuseas y deshidratación (Hurtado y Arancibia, 2010).

La GEI afecta a individuos de cualquier edad y nivel socioeconómico, sin embargo, los grupos más vulnerables son infantes, ancianos y personas inmunocomprometidas (Hernández-Cortez *et al.*, 2011). La mejora en las condiciones sanitarias y nutricionales y la terapia de rehidratación ha disminuido la mortalidad por GEI en los últimos 30 años (Yalda-Lucero, 2014). En México, el riesgo de morir por GEI pasó de siete personas en 1998 a tres personas por cada 100,000 habitantes en el 2010 (Secretaría de Salud, 2019a). Sin embargo, anualmente, la gastroenteritis infecciosa sigue causando la muerte de aproximadamente 700,000 niños menores de cinco años, alrededor del mundo (OMS, 2020). Por lo tanto, es importante un diagnóstico rápido y un tratamiento adecuado, así como medidas de control de los agentes que la provocan.

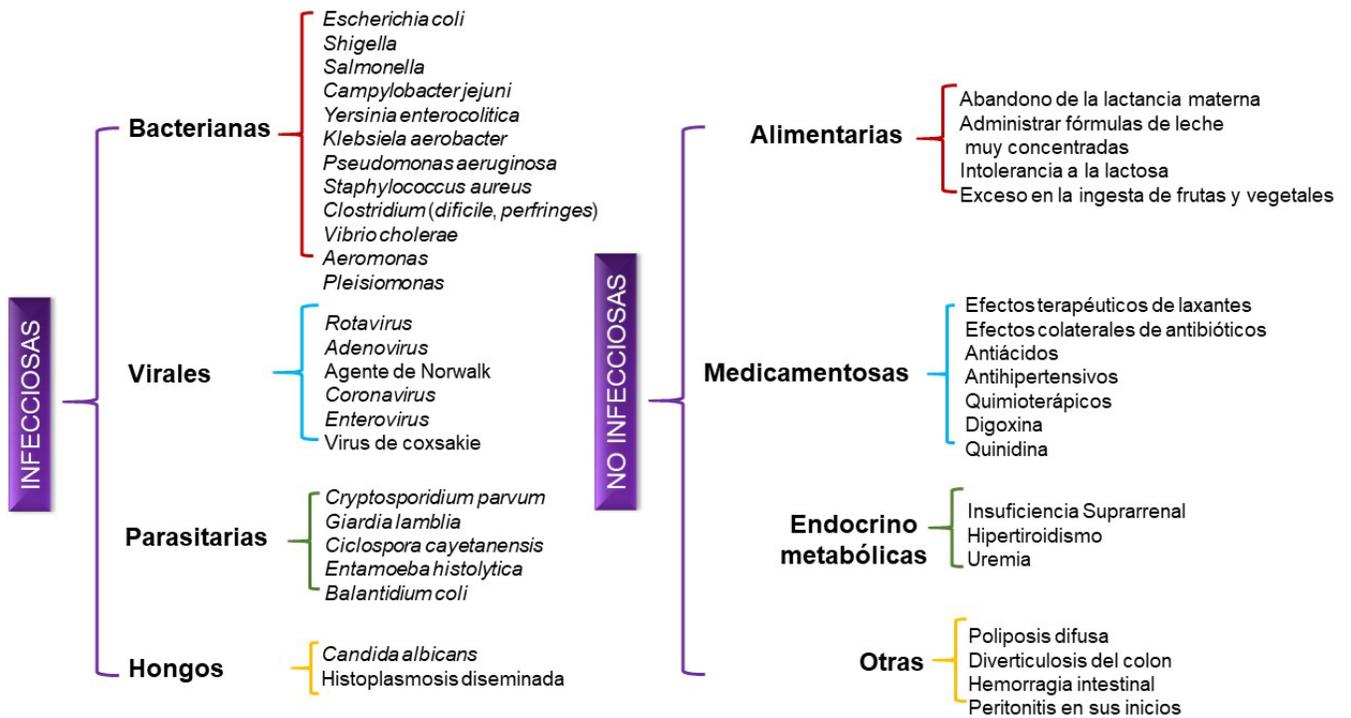


Figura 1. Clasificación de la gastroenteritis y los agentes que las causan.

Fuente: Hurtado y Arancibia (2010).

2.1.1 Agentes Etiológicos

La etiología de la GEI está relacionada con diferentes microorganismos como *Salmonella spp*, *Shigella spp*, diferentes tipos de *Escherichia coli* diarreogénicas (enteropatógena, enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteroagregativa, difusa adherente y enterohemorrágica) *Campylobacter jejuni* y algunos virus como rotavirus y adenovirus (Wilhelmi *et al.*, 2003; Foster *et al.*, 2015). La salmonelosis, ocasionada por *Salmonella spp*, constituye una de las causas más comunes de gastroenteritis en menores de edad (Hernández-Cortez *et al.*, 2011). En 2019, el sistema de Salud mexicano reportó 76,670 casos de salmonelosis y 3,467 casos de shigelosis. Además de los casos causados por *Salmonella* y *Shigella*, se registraron 5,248,788 casos de gastroenteritis causada por el grupo de *E. coli* diarreogénicas, *Campylobacter jejuni* y *C. coli*, *Yersinia enterocolitica* y *Clostridium difficile*. Sumando a este grupo, también, las infecciones causadas por virus. (Secretaría de Salud, 2019b). Para el interés de nuestro estudio, nos concentraremos en *C. jejuni*.

2.1.1.1 *Campylobacter jejuni* como agente etiológico de gastroenteritis infecciosa. La Organización Mundial de la Salud reconoce a *C. jejuni* como la principal causa de gastroenteritis bacteriana en muchas áreas del mundo, siendo el agente etiológico más importante, seguido de *C. coli* (OMS, 2012). La infección producida por *C. jejuni* se caracteriza por síntomas como diarreas agudas, en algunos casos con presencia de sangre, náuseas, vómito, dolor abdominal y de cabeza; la duración de los síntomas es de tres a seis días (Hoepers *et al.*, 2016). No obstante, se pueden presentar complicaciones con diversos grados de severidad como inflamación de páncreas, hígado y corazón, bacteriemia o artritis reactiva que pueden persistir por varios meses, y parálisis neurológica como el síndrome de Guillain-Barré (Jackson *et al.*, 2014).

La vía zoonótica de transmisión de *C. jejuni* es importante. Esta incluye la transmisión por animales o por el consumo de productos de origen animal contaminados, reportándose una alta incidencia de casos esporádicos en humanos. (Burnham y Hendrixson, 2018). Las aves de corral son el principal reservorio de *C. jejuni* y el principal vector de la campilobacteriosis (Hartley-Tassell *et al.*, 2018). Por ello, es importante implementar un sistema de Análisis de Puntos Críticos de Control (HACCP, por sus siglas en inglés) para evaluar peligros y riesgos de contaminación durante la producción y transformación de pollo y pavo (Hartley-Tassell *et al.*, 2018).

2.2 Características Patogénicas de *Campylobacter jejuni*

La primera línea de defensa del tracto gastrointestinal está integrada por mecanismos físicos, como el movimiento peristáltico, químicos, como la acción de las sales biliares y biológicos, como la presencia de enzimas proteolíticas y mucinas. Estos mecanismos, aunados a las actividades antimicrobianas y de exclusión por competencia con el microbioma intestinal benéfico, contribuyen a proteger al organismo humano de la adhesión y subsecuente invasión de microorganismos enteropatógenos (Boehm *et al.*, 2012). Sin embargo, cuando la concentración de patógenos es muy alta, la línea de defensa resulta inefectiva y sobreviene la infección que frecuentemente se acompaña de diarrea, dolor abdominal y otras alteraciones del sistema digestivo. Esto ocurre generalmente al consumir agua y alimentos contaminados (Boehm *et al.*, 2012; Young

et al., 2007). A continuación, se explican las características microbiológicas, así como los mecanismos de patogenicidad de *C. jejuni* y sus principales consecuencias.

2.2.1 Características Microbiológicas de *Campylobacter jejuni*

C. jejuni es un miembro de la familia *Campylobacteraceae*; es una bacteria Gram-negativa, móvil, de forma curva, con una longitud aproximada de 0.5 a 5 μm . Puede reducir nitrato, es catalasa y oxidasa positiva, microaerófilo con una temperatura óptima de crecimiento de 42 °C. Tiene un periodo de incubación de 1-7 días y su dosis infecciosa es considerada baja, de 500-800 UFC. Su movilidad está dada por dos flagelos polares y expresa en su superficie las adhesinas bacterianas CadF, FlpA y JlpA. El flagelo, además de brindar motilidad a la bacteria, también es un componente importante para la adhesión e invasión, ya que secreta proteínas de virulencia por el sistema de secreción tipo 3 (SST3) (Guerry, 2007; Bhunia, 2018).

2.2.2 Características patogénicas. Al llegar al intestino *C. jejuni* utiliza su flagelo bipolar, para llegar a la superficie celular de los enterocitos. Esto lo logra a través de la detección de quimio-atrayentes como aminoácidos, ácidos grasos de cadena corta, bilis y L-fucosa, que controlan el movimiento de la bacteria al regular a las proteínas flagelares (Vegge *et al.*, 2009; Hermans *et al.*, 2011). Para causar infección es necesario que *C. jejuni* se adhiera a las células hospederas para invadirlas y colonizarlas. Para ello, la bacteria utiliza varias adhesinas y un flagelo. Entre las adhesinas más estudiadas se encuentran las CadF y FlpA, que se unen a fibronectina, y JlpA, cuyo receptor es la proteína chaperona Hsp90 eucariótica. La adherencia de *C. jejuni* inicia las rutas paracelular y transcelular de invasión (Figura 2). Si la bacteria sigue la ruta paracelular, atraviesa la barrera epitelial entre uniones estrechas alteradas. En cambio, por la ruta transcelular el patógeno se trasloca al interior de las células del hospedero por fagocitosis inducida (Alzheimer *et al.*, 2020).

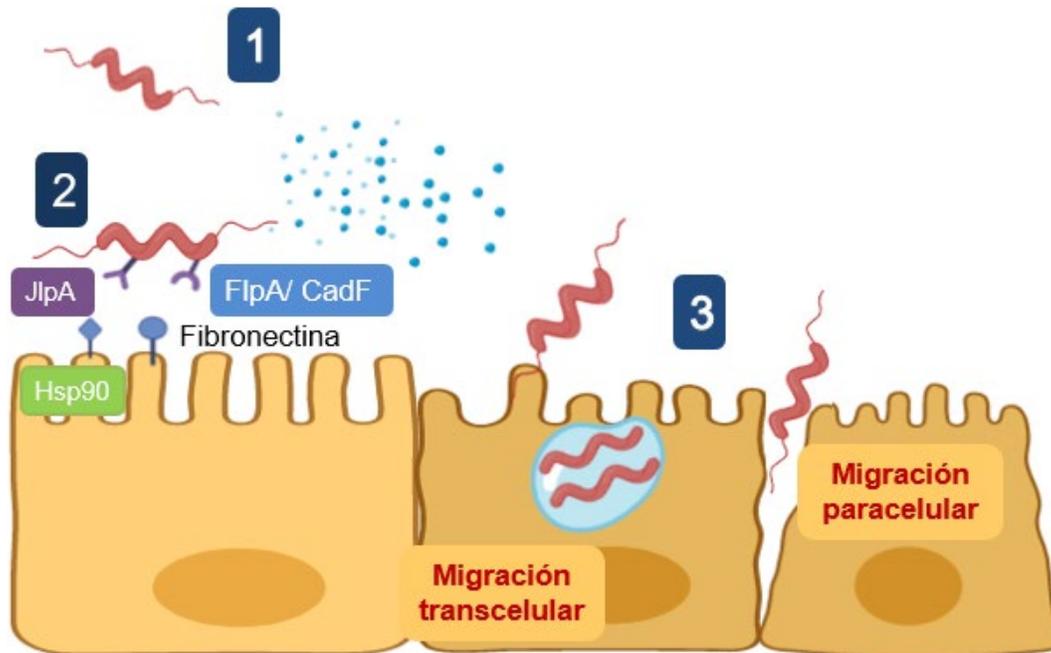


Figura 2. Rutas paracelular y transcelular de invasión de *C. jejuni*. Paso 1: detección de quimioatrayentes; Paso 2: Adhesión mediada por adhesinas y flagelo; Paso 3: Invasión por rutas transcelular y paracelular.

Elaboración propia con información de Backert *et al.* (2013).

La fagocitosis es un mecanismo utilizado por algunas células del sistema inmune para digerir patógenos. Sin embargo, *C. jejuni* induce este mecanismo para penetrar células fagocíticas no diferenciadas. Esto le permite protegerse del ambiente gastrointestinal y de los antibióticos, obtener nutrientes y viajar a otros tejidos del hospedero (Backert *et al.*, 2013). Para la internalización de la bacteria, se ha propuesto que *C. jejuni* utiliza los mecanismos de tipo cierre y detonante, sin ser excluyentes (Ó Cróinín y Backerts, 2012). En los dos mecanismos de internalización de la bacteria, se desencadena una cascada de señalización que finaliza con el reordenamiento de los filamentos de actina de la célula hospedera, los cuales envuelven a la bacteria para internalizarla dentro de una vacuola (Figura 3). El mecanismo de cierre está mediado por la interacción de las adhesinas bacterianas CadF y FlpA con el receptor de fibronectina de la célula hospedera. En este caso, el reordenamiento del citoesqueleto toma forma de cierre comprimido (Eucker y Konkel, 2012).

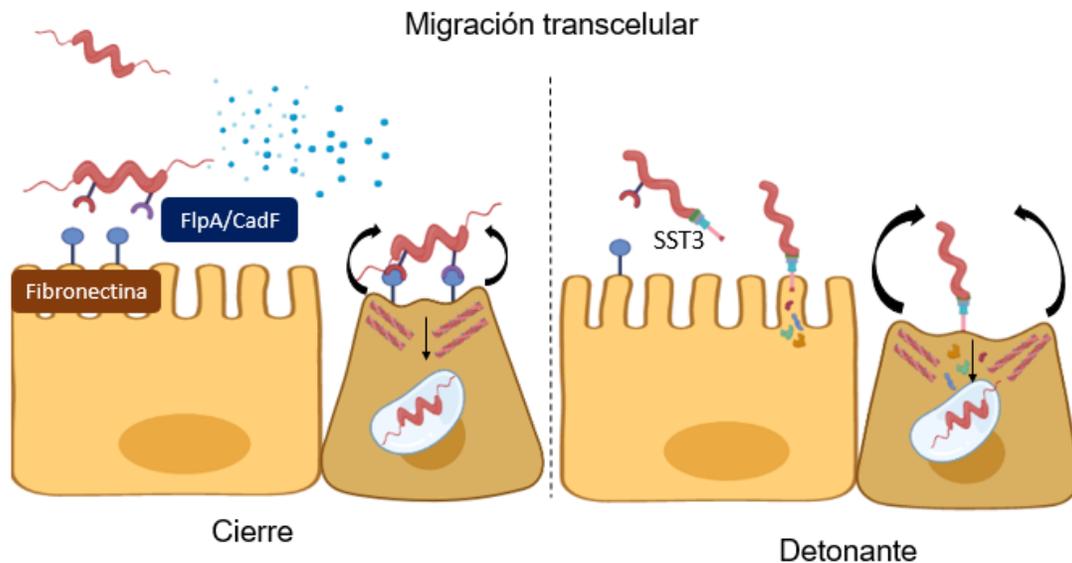


Figura 3. Proceso de internalización de *C. jejuni*.
Elaboración propia con información de Ó Cróinín y Backerts (2012).

En el caso del mecanismo detonante, la cascada de señalización se inicia por proteínas efectoras, inyectadas por el flagelo mediante el sistema SST3. Estas proteínas activan receptores de integrinas y producen el reordenamiento del citoesqueleto de actina formando en la membrana un encrepado/fruncido para la internalización de la bacteria (Eucker y Konkel, 2012). Por otro lado, la disrupción de las células epiteliales causa la producción de citosinas IL-8 y el reclutamiento de células dendríticas. Esto ocasiona un proceso inflamatorio frente a la infección por *C. jejuni*. (Young *et al.*, 2007). El daño y translocación a las células epiteliales, la infiltración de células del sistema inmune y la capacidad de viajar dentro del hospedero a otros tejidos, ocasionan los síntomas de la campilobacteriosis (Backert *et al.*, 2013).

2.3 Adhesinas Tipo Lectina en *Campylobacter jejuni*

2.3.1 Adhesinas Tipo Lectina y Biorreconocimiento

Las adhesinas son componentes de la superficie de los patógenos que se unen a receptores

específicos presentes en las membranas plasmáticas del hospedero (Tiralongo y Moran, 2009; Meylan *et al.*, 2006). Las adhesinas se clasifican en fimbriales y no fimbriales. Las primeras, se localizan en los pili, las fimbrias y los flagelos de las bacterias, de donde proviene su nombre (Meylan *et al.*, 2006). La mayoría de las bacterias Gram-negativas expresan más de un tipo de adhesina que por lo general, tienen función de lectina. Por lo tanto, su unión específica es a receptores con estructuras de carbohidratos (Cárdenas-Perea *et al.*, 2014). La especificidad de las lectinas hacia el receptor establece en gran medida, el tropismo del tejido bacteriano. Existen lectinas específicas a manosa, galactobiosa y N-acetil-D-galactosamina (Gal-NAc), fucosa, ácido siálico, entre otras (Solanki *et al.*, 2018). Generalmente, las lectinas bacterianas tienen una baja afinidad por su receptor y la forma de compensar esto es aumentando la fuerza de unión, al unirse a más de un receptor de carbohidratos al mismo tiempo (Tiralongo y Moran, 2009). Las adhesinas tipo lectina de los enteropatógenos, se localizan principalmente en la punta de las fimbrias, formando secuencias específicas de aminoácidos que establecen uniones no covalentes con los carbohidratos complejos (glicoconjugados o glicanos), de la superficie celular del hospedero. En muchos de los casos, este reconocimiento celular es el primer paso para la infección y para algunas adhesinas tipo lectina, se requiere de la presencia de algún metal como Ca o Mg (Abraham *et al.*, 2015; Solanki *et al.*, 2018).

Los principales mecanismos de adhesión para *C. jejuni* ya fueron discutidos con anterioridad. Sin embargo, existe evidencia de que *C. jejuni* presenta reconocimiento tipo lectina, que puede estar asociado con la infección. Se ha demostrado que la adherencia de *C. jejuni* es inhibida por oligosacáridos fucosilados y sialilados (Schneider *et al.*, 2017). Varias investigaciones reportan la unión *in vitro* de *C. jejuni* a glicanos fucosilados del tipo 1-2 y la reducción de la adhesión del patógeno a células intestinales, en presencia de fucosas (Cinco *et al.*, 1984; Ruiz-Palacios *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2017). Sin embargo, se conoce muy poco sobre las adhesinas implicadas, aunque, para el caso de *C. jejuni*, existe evidencia de que la adhesina tipo lectina CA-A ubicada en la superficie celular de *C. jejuni* reconoce fucosa, aumentando la intensidad de la unión, cuando existe la presencia de ácido siálico (Ruiz-Palacios *et al.*, 2003; Gustadsson *et al.*, 2005). Los glicoconjugados que contienen ácido siálico, también son reconocidos por el patógeno (Day *et al.*, 2012).

2.4 Antibióticos Utilizados Contra *Campylobacter jejuni*

2.4.1 Principales Antibióticos Utilizados

El principal propósito del tratamiento establecido para diarrea de origen infeccioso es combatir la pérdida de electrolitos del cuerpo. El utilizar un tratamiento con antibióticos dependerá del microorganismo causal, así como de las características de la persona infectada (González-Torralba *et al.*, 2018). En caso de que *C. jejuni* provoque infecciones graves y diarrea prolongada se recomienda utilizar estreptomicina como antibiótico principal y como segunda línea ciprofloxacina.

Los aminoglucósidos tienen efectos bactericidas inmediatos a través de la ruptura de la membrana celular y efectos bactericidas retardados a través de la síntesis de proteínas alteradas (Serio *et al.*, 2018; Bulitta *et al.*, 2015), esto lo logran al unirse de manera reversible al sitio P en la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. El fármaco se transporta al sitio de la infección después de concentrarse de manera activa dentro de los leucocitos. La entrada de los aminoglucósidos en las células se lleva a cabo mediante una fase de unión iónica y dos fases consecutivas dependientes de energía. En la primera fase de unión iónica se lleva a cabo la unión electrostática entre los aminoglucósidos y los componentes cargados negativamente de las membranas bacterianas. Esta unión permite la entrada de aminoglucósidos como consecuencia del aumento de la permeabilidad de la membrana celular (Moore *et al.*, 1986). En la Fase I dependiente de energía se efectúa el acceso de una limitada de aminoglucósidos al ribosoma bacteriano 30S, lo que conduce a la mala traducción de las proteínas y la ruptura de la membrana citoplasmática (Taber *et al.*, 1987). Por último, en la Fase II se produce la muerte bacteriana dependiente de la concentración. Así como errores en la traducción e inhibición en la síntesis de proteínas. Esta última, es un componente clave de la eficacia de los aminoglucósidos (Serio *et al.*, 2018; Davis *et al.*, 1986).

Si se sospecha que *C. jejuni* ha desarrollado resistencia a las quinolonas, es recomendable tratar al paciente con azitromicina o trimetoprima/sulfametoxazol (DuPont, 2014). A pesar de que existen

guías para el tratamiento de bacterias causantes de infección, el uso de antibióticos para enterobacterias está en constante cambio, debido al aumento de la resistencia bacteriana a los medicamentos que son considerados de primera elección (Amábile-Cuevas, 2010).

2.4.2 Resistencia Bacteriana

El uso de antibióticos para combatir enfermedades ha tenido un impacto positivo en la salud de la población mundial (OMS, 2020). Sin embargo, las malas prácticas consistentes en automedicación, dosificación incorrecta y tratamientos sin terminar han promovido un incremento en la resistencia de las bacterias patógenas, a estos fármacos (OMS, 2014). Otro factor importante para la adquisición de resistencia bacteriana es la contaminación por la presencia de residuos de antibióticos en cuerpos de agua, suelos y alimentos (Amábile-Cuevas, 2010).

C. jejuni presenta una mayor resistencia a antibióticos del tipo tetraciclinas y quinolonas. El caso de las aves es más preocupante, ya que los antibióticos se han utilizado no solo como tratamiento, sino también como promotores del crecimiento (Marshall y Levy, 2011). Por ejemplo, un estudio de la autoridad europea de seguridad alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), determinó que aproximadamente el 50 % de las cepas de *C. jejuni* aisladas en muestras clínicas de humanos fueron resistentes a fluoroquinolonas, eritromicina, tetraciclina o ciprofloxacina y alrededor del 30 % presentaron resistencia múltiple (EFSA, 2014). En 83 % de las cepas aisladas de carne de pollo y el 33 % de las cepas aisladas de carne de res y cerdo presentaron resistencia a fluoroquinolonas y más del 93 % de las cepas aisladas de pollos y pavos, mostraron resistencia a ampicilina (EFSA, 2014; Giacomelli, 2014). Esto es un indicador del uso irracional de los antibióticos y de la necesidad que existe de emplear nuevas estrategias para su aplicación.

2.5 Encapsulamiento Activo o Biodirigido de Antibióticos

2.5.1 Definición y Ventajas

El aumento en la tasa de bacterias resistentes a antibióticos ha forzado a la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las infecciones (de Jesus Valle *et al.*, 2016). Tradicionalmente, los antibióticos se suministran al paciente en preparaciones orales o parenterales, en presencia de un excipiente. Esta práctica hace que el antibiótico se distribuya inespecíficamente en todo el organismo; además, que se aclare o elimine rápidamente, como sucede con la dosis única (Figura 4). Para corregir esta desventaja, se recurre a las multidosis o a la liberación prolongada, por ejemplo, colocando una capa entérica a las pastillas. Una mayor permanencia en el organismo se logra al encapsular el antibiótico, retardando su liberación: esto se conoce como vectorización (Shreffler *et al.*, 2019). Sin embargo, persiste la desventaja de que el antibiótico sigue llegando a lugares del organismo donde no se requiere. Una manera de dirigir al antibiótico es mediante la vectorización activa. Ésta consiste en utilizar matrices de encapsulamiento funcionalizadas, donde el elemento funcional es una molécula que puede ser reconocida o reconocer a la bacteria que queremos combatir. Dichas fracciones de orientación, o elementos funcionalizadores pueden ser péptidos, anticuerpos, carbohidratos, ADN, lectinas, entre otros (Yu *et al.*, 2012). De esta manera, se produce la unión bacteria-cápsula funcionalizada mediante un reconocimiento específico. La erosión de la cápsula liberaría el antibiótico lo más cerca posible de la bacteria, haciendo su uso más eficiente.

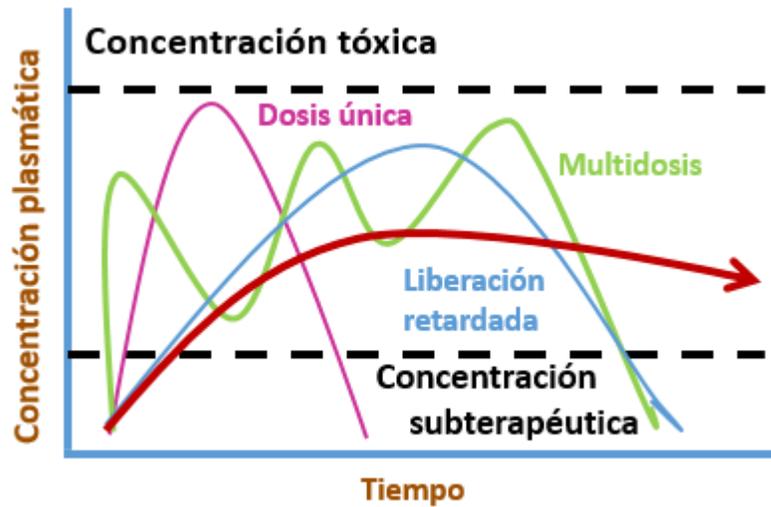


Figura 4. Relación dosis-efecto de agentes terapéuticos tradicionales contra vectorización activa.
 Fuente: Liechty *et al.* (2010).

Entre los principales vehículos funcionalizados para terapia biodirigida se encuentran las nanopartículas. Estos materiales nanoestructurados pueden clasificarse en nanopartículas basadas en polímeros, no poliméricas y basadas en lípidos. Las nanopartículas a base de polímeros naturales, como la albúmina, no presentan toxicidad y proporcionan una mejora significativa en la eficiencia de los agentes terapéuticos, en comparación con los métodos convencionales, ya que evita la diseminación del fármaco y se produce una liberación prolongada (Yetisgin *et al.*, 2020). Por ejemplo, utilizando albúmina sérica bovina (BSA), una proteína de bajo costo, no inmunogénica, naturalmente biodegradable y no tóxica (Fonseca *et al.*, 2017). Las nanopartículas se cargan con el fármaco de interés para dirigirlo selectivamente hacia una célula blanco con ayuda de un ligando funcionalizado (Vhora *et al.*, 2014). El uso de nanotransportadores funcionalizados, aumenta la eficacia del tratamiento, al aumentar la permanencia del fármaco en el organismo y dirigirlo, a través del reconocimiento molecular hacia la célula blanco, es decir, por vectorización activa (de Jesús Valle *et al.*, 2016).

La vectorización activa utilizando nanopartículas ha sido ampliamente estudiada para dirigir fármacos hacia células cancerígenas (Van der Meel *et al.*, 2013; Ma, 2014; Vhora *et al.*, 2014). También, se está enfocando hacia la dirección de antimicrobianos contra diferentes microorganismos patógenos, para mejorar su farmacocinética y minimizar la exposición del resto

de los órganos al fármaco, y en el caso de utilizar la vía oral, disminuir la exposición del medicamento al microbioma intestinal (Yetsgin *et al.*, 2020). Existe información relacionada con terapia dirigida a patógenos bacterianos, donde se aprovecha la expresión de adhesinas tipo lectina en la superficie de la bacteria, para diseñar nanopartículas biodirigidas funcionalizadas con carbohidratos que mimetizan a los receptores celulares a los que se unen estos microorganismos. Estas moléculas se conocen como antagonistas glicomiméticos (Ma, 2014; Vhora *et al.*, 2014). Esta estrategia se esquematiza en la Figura 5. En este estudio, diseñamos moléculas que imiten la estructura de los receptores que contienen fucosa y ácido siálico reconocidos por *C. jejuni*.

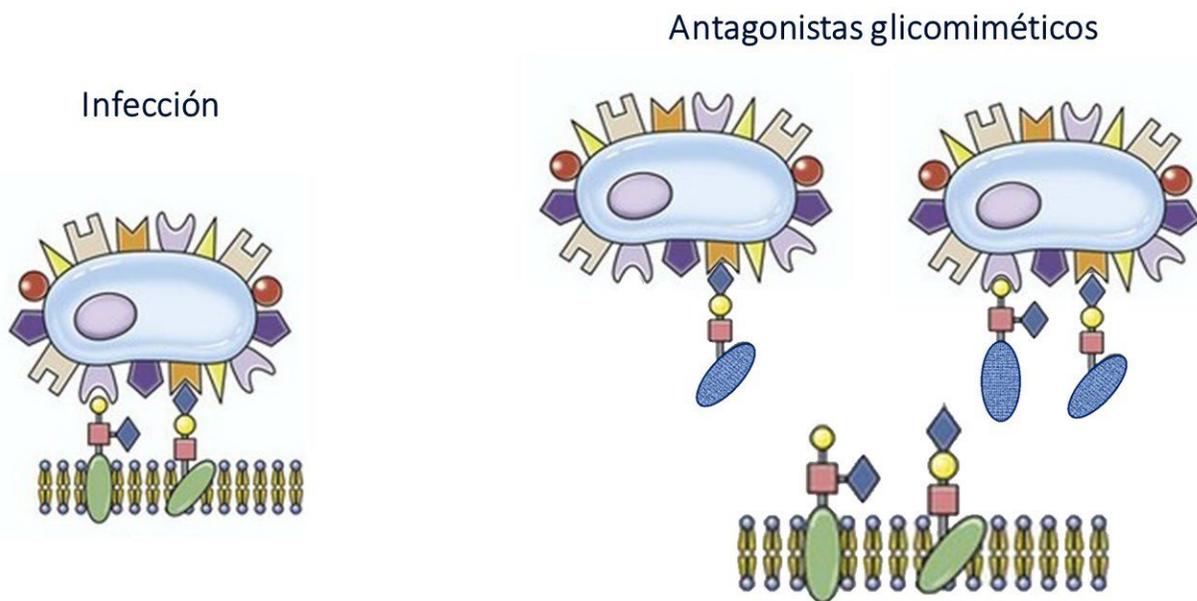


Figura 5. Terapia dirigida con antagonistas glicomiméticos. Fuente: Sandoval-Larios (2020).

2.5.2 Fuentes de Fucosa y Ácido Siálico para Sintetizar Antagonistas Glicomiméticos

2.5.2.1 El fucoidan de *Macrocystis pyrifera* como fuente de fucosas. El fucoidan es un polisacárido sulfatado de alta masa molecular que se encuentra en algas marinas pardas como *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus vesiculosus* y *Saccharina japonica*, entre otras. Su componente principal (20-60%) es la L-fucosa, unida a otras fucosas o a fucosas sulfatadas,

mediante enlaces glicosídicos del tipo α -1,3 y α -1,4 (Llópiz, 2016). Además, puede contener otros monosacáridos en menor proporción. El fucoidan de *Macrocystis pyrifera*, es un heteropolisacárido ácido, su estructura consiste principalmente de las cadenas \rightarrow 3)- β -L-Fuc(2SO₃⁻)-(1 \rightarrow , \rightarrow 4)- β -D-Xylp-(1 \rightarrow 3)- β -L-Fuc(2SO₃⁻)-(1 \rightarrow , α -L-Fuc-(1 \rightarrow y \rightarrow 6)- α -D-Galp-(1 \rightarrow ramificado (Zou *et al.*, 2021). Entre los monosacáridos diferentes a la fucosa del fucoidan de *M. pyrifera* se encuentra la galactosa., presentando una relación fucosa:galactosa de 18:1. Otros carbohidratos presentes en menor concentración son manosa, xilosa, ramnosa, ácido glucurónico y glucosa, mientras que el grado de fucosas sulfatadas es de alrededor del 27% (Zhan *et al.*, 2015; Zou *et al.*, 2021).

Se han demostrado diferentes bioactividades del fucoidan, como antioxidante, antiinflamatorio, prebiótico, antiviral y antibacteriana. Éstas, dependen de su estructura, masa molecular, carga superficial (grado de sulfatación) y del contenido y tipo de otros monosacáridos (Pomin *et al.*, 2005). El fucoidan es una fuente con potencial para actuar como antagonista glicomimético de las adhesinas de *C. jejuni* que reconocen fucosa. Para ello, es importante establecer las condiciones para obtener oligosacáridos del fucoidan, ya que se ha observado que, en general los oligosacáridos de fucoidan presentan mayor actividad biológica (Tan *et al.*, 2020) y para el caso del reconocimiento, moléculas más pequeñas ejercen menor impedimento estérico y por tanto mayor acercamiento a las bacterias (Wang *et al.*, 2019).

2.5.2.2 Obtención de oligosacáridos de fucoidan de *Macrocystis pyrifera*. Existen diferentes técnicas para obtener oligosacáridos a partir de un polisacárido, la hidrólisis enzimática y las técnicas químicas, como las que utilizan ácido o H₂O₂ (Hou *et al.*, 2012). Para la hidrólisis enzimática se han estudiado a fucoidanasas y fucoidan sulfatasas, aisladas de invertebrados, bacterias y hongos (Ale y Meyer, 2013). Sin embargo, hasta el momento, su comercialización y distribución se encuentra limitada. Como sustituto, la hidrólisis ácida es la más utilizada; consiste en la combinación de ácido y temperatura para promover el rompimiento de enlaces glicosídicos en las unidades de fucosa no sulfatadas (Pomin *et al.*, 2005). Otra técnica estudiada más reciente, es la reacción de Fenton utilizando H₂O₂; las especies reactivas de hidrógeno generadas, pueden escindir a los polisacáridos (Hou *et al.*, 2012). Las reacciones químicas son económicas y escalables, aunque la heterogeneidad de los oligosacáridos obtenidos puede ser mayor que con

hidrólisis enzimática (Ale y Meyer, 2013). Por ello es necesario caracterizar los hidrolizados obtenidos mediante estas técnicas, a fin de encontrar las condiciones adecuadas que permitan obtener oligosacáridos suficientemente reactivos para producir antagonistas glicomiméticos.

2.5.2.3 Mucina submaxilar bovina como fuente de ácido siálico. Las mucinas son un grupo de glicoproteínas de alta masa molecular (0.4-4 MDa). Existen 17 proteínas clasificadas como mucinas, que incluyen mucinas transmembranales y secretadas (poliméricas secretadas y no poliméricas secretadas) (Brown *et al.*, 2013). Las mucinas secretadas son componentes principales del moco que recubre muchas de las superficies epiteliales, como en el tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal (McGuckin *et al.*, 2011). La mucina submaxilar bovina es una mucina polimérica que se ha utilizado como modelo para elucidar la estructura de las mucinas (Lewis *et al.*, 2013), para mejorar las propiedades de los materiales (Sandberg *et al.*, 2008), el diseño de nanocompuestos (Makarovsky *et al.*, 2018) y como fuente de carbohidratos para probar la adhesión de bacterias patógenas mediante la interacción lectina-carbohidrato (Bushnak *et al.*, 2014).

La estructura de la mucina submaxilar bovina (Figura 6) consta de tres dominios principales, los dominios hidrofóbicos N- y C- terminal y un dominio central hidrofílico O-glicosilado. El dominio N-terminal (NH₂) y C- terminal (COOH) se encuentran N-glicosilados (Kim *et al.*, 2021). Además, en el extremo C- terminal del monómero de mucina, se encuentra el subdominio similar al nudo de cistina (CK) que consta de 90 a 100 residuos de aminoácidos, con un alto contenido de cisteína (CS) que forman dímeros y multímeros de mucina unidos por enlaces disulfuro (S-S). El dominio central es un núcleo proteico hidrofílico, se encuentra altamente O-glicosilado y con secuencias repetidas en tándem, también, se encuentran sitios CS (Marczyznski *et al.*, 2019).

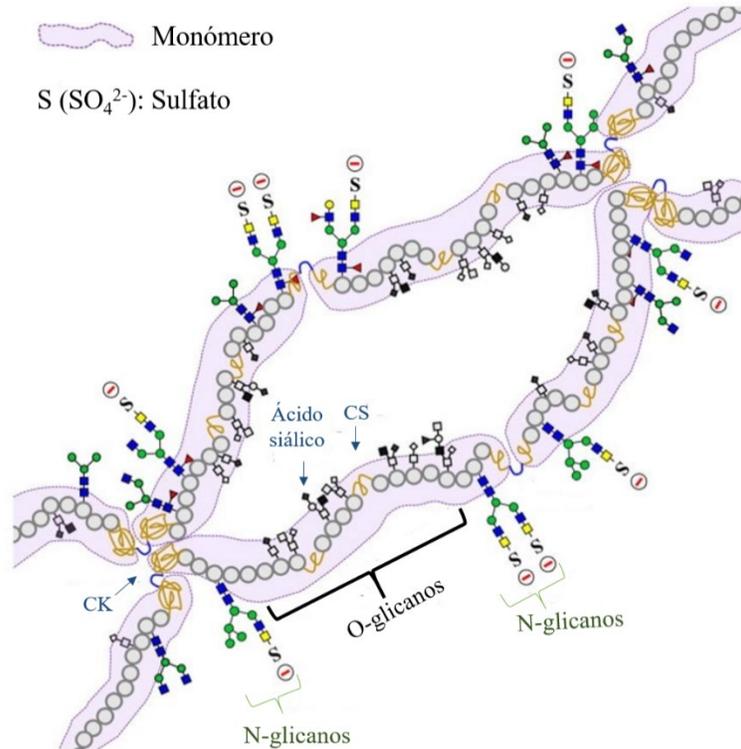


Figura 6. Estructura de la mucina submaxilar bovina.
Fuente: Kim *et al.* (2021)

Los O-glicanos de la mucina contienen fucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina y ácido siálico. Estos glicanos, representan del 50 al 90% de la masa molecular de la proteína y le otorgan propiedades estructurales y biológicas a la glicoproteína, estabilizando a la estructura, protegiendo a la secuencia proteica del ataque de proteasas y permitiendo interacciones de biorreconocimiento proteína-carbohidrato (Brown *et al.*, 2013). Todos los O-glicanos de la mucina consisten en di- a octa-sacáridos, la mayoría de estos están sialilados y contienen ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc). La sialilación se produce sólo en di- a hexa-sacáridos. Además, es frecuente una mono fucosilación en tetra- a hexa-sacáridos, y una di fucosilación de hexa a octa-sacáridos (Kim *et al.*, 2020). La presencia de ácido siálicos y de fucosas en la mucina submaxilar bovina la convierten en un posible antagonista glicomimético que pueda ser reconocido por *C. jejuni*.

2.5.3 Glicomatrices Obtenidas Mediante Reacción de Maillard Controlada

Las interacciones con glicanos median procesos biológicos importantes como la adhesión e invasión bacteriana. Actualmente, estas interacciones son aprovechadas para el diseño de terapias dirigidas de antibióticos. Diferentes estudios, comprobaron que las bacterias, cuando son expuestas a carbohidratos, se unen a estas estructuras y disminuye la colonización a células del hospedero (Sarabia-Sainz *et al.*, 2011; Sarabia-Sainz *et al.*, 2013). También, el diseño de nanopartículas con albúmina sérica bovina (BSA) glicada con lactosa, mostró un efecto anti-adhesivo al unirse a adhesinas bacterianas de *E. coli* enterotoxigénica (Gustafsson *et al.*, 2005).

Una técnica escalable para diseñar nanopartículas funcionalizadas con carbohidratos es mediante la reacción de Maillard, donde se forman enlaces covalentes entre los grupos amino libres de las proteínas y un carbohidrato reductor. En la industria alimentaria se utiliza esta reacción para modificar las propiedades emulsificantes y espumantes de las proteínas (Karbasi y Maldadlou, 2018). En general, la reacción de Maillard consta de tres pasos, primero la condensación de un grupo amino y una aldosa, conduce a la formación de la base de Schiff, después ocurre una ciclación de la base de Schiff y se reordena a una forma más estable llamada producto de Amadori. En la etapa final ocurre un conjunto de reacciones como deshidrataciones, ciclaciones y oxidaciones que dan como resultado productos finales de la glicación avanzada (Cruz-Hernández y Licea-Puig, 2010). La formación de estos productos está mediada por los parámetros de la reacción como el tiempo de reacción, la actividad de agua, la relación de peso del grupo amino para reducir el carbohidrato, el pH y la temperatura (Cruz-Hernández y Licea-Puig, 2010; Karbasi y Maldadlou, 2018).

Para obtener matrices funcionalizadas mediante la reacción de Maillard, es necesario controlar la reacción y detenerla en el punto de la formación del rearreglo de Amadori (Figura 7); si el carbohidrato no permanece en su forma ciclada, no habrá biorreconocimiento (Ledesma-Osuna *et al.*, 2008). La temperatura, el tiempo y el pH de la reacción, son parámetros importantes que deben controlarse para cada tipo de carbohidrato a conjugar. Por ejemplo, para el caso de la conjugación de BSA con lactosa, las mejores condiciones se obtienen al glicar en fase sólida a 100 °C, durante

30 min a pH 7.0 (Sarabia-Sainz *et al.*, 2009). Para conjugar galactooligosacáridos a BSA, el pH debe ajustarse a 9.0 y la temperatura a 90 °C (Sarabia-Sainz *et al.*, 2013). La conjugación de BSA con fucoidan se ha realizado de manera exitosa por otros autores utilizando la reacción de Maillard (Kim y Shin, 2015), sintetizar glicoconjugados de BSA con oligosacáridos de fucoidan de *M. pyrifera* tiene el potencial para generar antagonistas glicomiméticos que sean reconocidos por *C. jejuni*.

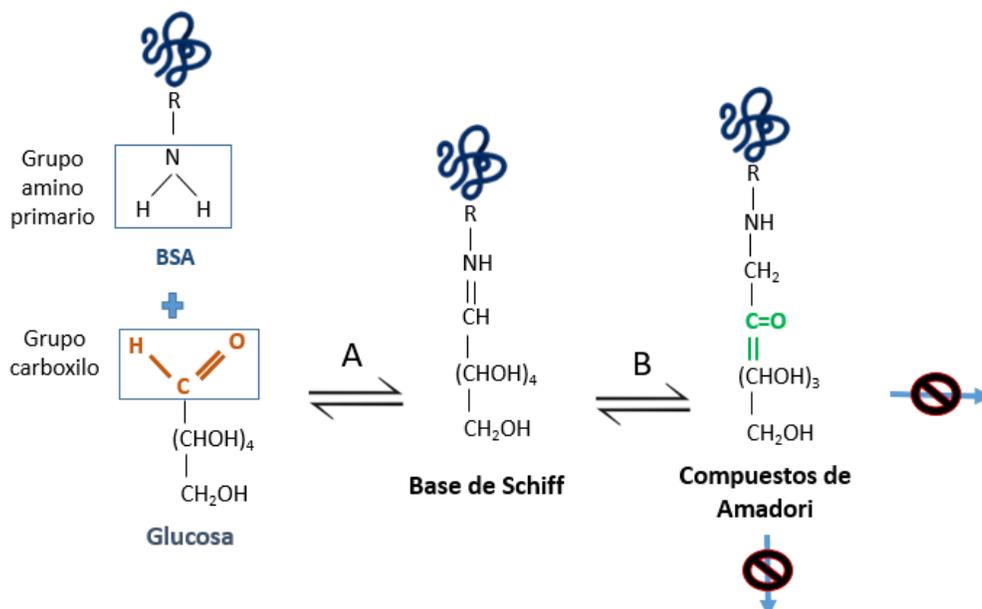


Figura 7. Principio para la síntesis de antagonistas glicomiméticos por la reacción de Maillard. A) Formación de la base de Schiff. B) Reordenamiento de Amadori.

Fuente: Sarabia-Sainz *et al.* (2011)

2.5.4 Síntesis de Nanopartículas Núcleo-Coraza

Las nanopartículas núcleo-coraza contienen un núcleo central y una capa exterior o coraza, que protege al núcleo. La síntesis de estos transportadores se utiliza más frecuentemente para transportar medicamentos hidrofóbicos, como los medicamentos para las terapias contra el cáncer. Con esta estrategia, se pretende disminuir los efectos secundarios generados por la toxicidad del fármaco y la resistencia al mismo. Además, aumenta el efecto citotóxico sobre las células blanco y la capacidad de carga del fármaco en la nanopartícula (Tang *et al.*, 2018). A pesar de que la

mayoría de las nanopartículas núcleo-coraza reportadas son elaboradas con metales como la plata y el oro, la síntesis con diferentes materiales, como un núcleo de sílice han demostrado incrementar la eficiencia de carga y de encapsulamiento, en 65 y 99% respectivamente. Esto demuestra que existen diferentes opciones para variar el diseño de nanopartículas, y así mejorar el encapsulamiento y suministro de fármacos (Yang *et al.*, 2019).

Sarabia-Sainz *et al.* (2011) diseñaron micropartículas dirigidas contra *E. coli* enterotoxigénica cargadas con gentamicina. Para ello, utilizaron neoglicanos de BSA-lactosa como matriz polimérica. Siguiendo la misma estrategia, es posible sintetizar nanopartículas núcleo-coraza con un núcleo central de BSA que encapsule un antibiótico, y una capa exterior o coraza funcionalizada con antagonistas glicomiméticos fucosilados y sialilados, para dirigir antibióticos hacia patógenos que reconozcan estos carbohidratos (Figura 8).

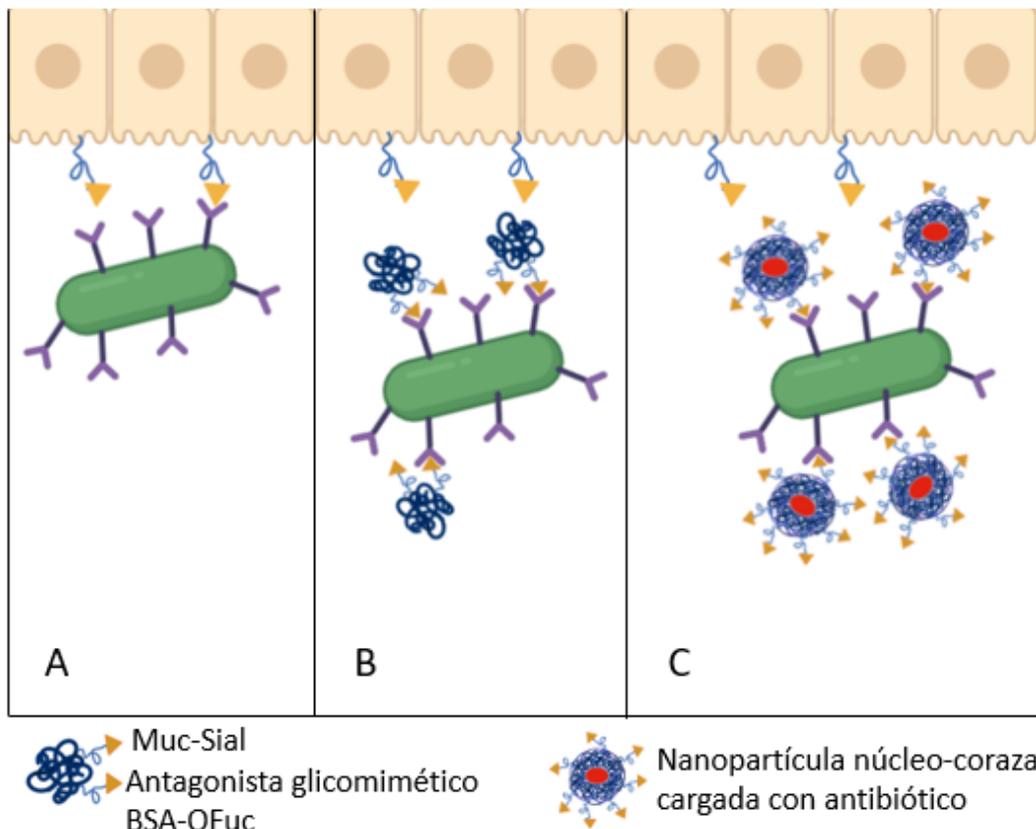


Figura 8. Terapia biodirigida con nanopartículas núcleo-coraza funcionalizadas con carbohidratos y cargadas con antibiótico.

Fuente: elaboración propia con información de Ramos-Clamont (2018)

2.6 Antibióticos con Potencial para el Encapsulamiento Biodirigido a *Campylobacter jejuni*

Muchas cepas de *C. jejuni* han adquirido resistencia a antibióticos comunes, por lo que el éxito en la terapia dirigida, además de la síntesis de nanopartículas y del biorreconocimiento, está en la elección del medicamento transportado y dirigido para controlar la infección. Un estudio realizado en México mostró que diferentes enterobacterias aisladas de pacientes con diarrea aguda tuvieron una mayor susceptibilidad a rifaximina, en comparación con otros antibióticos como ampicilina, ciprofloxacino, y trimetoprima/sulfametoxazol. En el caso de *C. jejuni* el 100% de las cepas aisladas fueron susceptibles a este antibiótico, demostrando que la rifaximina muestra una excelente actividad *in vitro* contra *C. jejuni* (Novoa-Farias *et al.*, 2017).

La rifaximina es un agente antimicrobiano derivado de la rifamicina, que se obtiene por la reacción de la forma oxidada de rifamicina B (rifamicina O) con 2-amino-4-metilpiridina (Calanni *et al.*, 2014). La rifaximina tiene una estructura análoga a la rifampicina, con la adición de un anillo de piridoimidazol (Figura 9), que provoca que la molécula sea insoluble en agua. Además, se ha observado que tiene una baja absorción sistémica después de su administración oral (< 0.4%), lo que favorece a la concentración del fármaco en la luz intestinal y da lugar a una acción bactericida sobre las posibles especies patógenas presentes. Además, está asociado con pocos eventos adversos (Schoendfeld *et al.*, 2014, DuPont *et al.*, 2005).

La rifaximina es un antibiótico de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se utiliza para combatir enfermedades gastrointestinales, como la diarrea del viajero y el síndrome del intestino irritable, así como para prevenir la encefalopatía hepática (Calanni *et al.*, 2014). Su acción bactericida se lleva a cabo, al inhibir la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a la subunidad β de la ARN polimerasa (Hartmann *et al.*, 1967). La rifaximina, hasta el momento, tiene una baja resistencia microbiana. A pesar de eso, las bacterias resistentes presentan mutaciones en el gen que codifica la subunidad β de la ARN polimerasa (O'Connor *et al.*, 2008).

3. HIPÓTESIS

Las nanopartículas núcleo-coraza fucosiladas y sialiladas, cargadas con rifaximina, serán reconocidas por *Campylobacter jejuni*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanopartículas núcleo-coraza fucosiladas y sialiladas cargadas con rifaximina dirigidas a *Campylobacter jejuni*.

4.2. Objetivos Particulares

Obtener oligosacáridos de fucoidan de *Macrocystis pyrifera* por métodos químicos, comparando la hidrólisis ácida controlada con la reacción de Fenton mediante rendimientos y espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier y reflexión total atenuada (FTIR-ATR).

Obtener antagonistas glicomiméticos a partir de la síntesis de neoglicanos fucosilados y de mucina submaxilar bovina y caracterizarlos por FTIR-ATR y electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE).

Determinar mediante ensayos con lectinas similares a ELISA (ELLAS), si los antagonistas glicomiméticos son reconocidos por lectinas comerciales.

Sintetizar nanopartículas núcleo-coraza utilizando un núcleo de albúmina sérica bovina (BSA), cargado con rifaximina y una coraza de antagonistas glicomiméticos, y caracterizarlas mediante DLS (DLS; tamaño de partícula y carga superficial), FTIR-ATR, eficiencia de encapsulamiento y determinación de la concentración mínima inhibitoria.

Determinar mediante ELLAS si las nanopartículas sintetizadas son reconocidas por las adhesinas de *C. jejuni*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

La rifaximina, BSA, mucinas submaxilares bovinas y el fucoïdan de *Macrocystis pyrifera*, se adquirieron en Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Las cepas de *Campylobacter jejuni* (ATCC 43442) aislado de heces de humano se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC). La batería de lectinas (*Ulex europaeus* I, *Maackia amurensis*, *Ricinus communis* I, y *Sambucus nigra*) para estudios de biorreconocimiento, se compraron en VECTOR Laboratories (Burlingame, CA, EUA) a excepción de *Anguilla anguilla* que se adquirió en EY Laboratories (CA, EUA). El caldo *Brucella* y demás medios de enriquecimiento para el cultivo de *C. jejuni* se adquirieron de Becton, Dickinson & Company (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 compraron en Hardy diagnostics (Santa María, CA, EUA). El resto de los reactivos utilizados fueron grado reactivo y se obtuvieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), a menos que se especifique lo contrario.

5.2. Crecimiento de la Bacteria

Para activar a la bacteria *C. jejuni* se siguieron las instrucciones del proveedor ATCC y las señaladas por Hartley-Tassel *et al.* (2018). *C. jejuni* se cultivó en caldo *Brucella* bajo condiciones microaerofílicas (5% O₂, 15% CO₂, 80% N₂) utilizando un sistema generador de atmosfera y bolsas Campygen anaerogen selladas con clips para cultivo de *C. jejuni*. La bacteria se incubó a 37 °C durante 48 h. Posteriormente, se realizó una resiembra y se incubó a 42 °C durante 48 h. Para obtener cultivos de bacteria bajo condiciones de crecimiento control y en condiciones de estrés térmico. Las bacterias se ajustaron con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), 0.02 M, pH 7.4, a una absorbancia de 0.6 a 660 nm (aproximadamente a 2x10⁸ UFC mL⁻¹), en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Vis (Thermo Scientific, USA). Las bacterias se utilizaron inmediatamente después de su ajuste.

5.3. Obtención de Oligosacáridos de Fucoïdan Utilizando Hidrólisis Ácida y la Reacción de Fenton

5.3.1. Hidrólisis Ácida

Los oligosacáridos de fucoïdan (OFuc) se prepararon según Oliveira *et al.* (2007), modificado por Sandoval-Larios (2020). Se añadieron 2 mL de HCl 0.01 N a 40 mg de fucoïdan que fueron disueltos agitando durante 2 min en un vórtex a velocidad moderada. Posteriormente, se incubaron durante 3 h a 100 °C en un baño María. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción enfriando los tubos en hielo con sal, durante 10 min, seguido de una neutralización con NaOH 0.01 N. Seguidamente, el tubo de reacción se centrifugó (Costar, mini centrifuge, DC, USA) a 25 °C, 5585 x g durante 20 min. El precipitado se guardó en congelación para su uso posterior. El sobrenadante se fraccionó por ultrafiltración (Amicon, MA, EUA), con membradas de celulosa (Millipore, Corp., Billerica, MA) de corte 3.0 kDa y 1.0 kDa, para obtener las fracciones indicadas en el Cuadro 1. Posteriormente, todas las fracciones se congelaron a -40 °C durante 48 h y al término de este periodo, se liofilizaron a -54 °C durante 48 h (Virtis Benchop, Modelo 2312, NY, EUA) y se guardaron a 4 °C hasta su análisis.

Cuadro 1. Fracciones obtenidas por ultrafiltración en tándem

Fracción	kDa
1	>1
2	<1

5.3.2. Reacción de Fenton

La fragmentación con H₂O₂ se llevó a cabo según Hou *et al.* (2012) con pequeñas modificaciones. Se añadieron 200 µL de H₂O₂ 0.2 M a 40 mg de fucoïdan previamente disueltos en 1 mL de agua

desionizada, posteriormente se incubaron en un baño María a diferentes temperaturas y tiempos, para determinar la mejor condición de escisión del fucoidan. Los tratamientos utilizados fueron 60, 80, 90 y 100 °C durante 8, 4, 4 y 2 h, respectivamente. Concluido el tiempo de incubación se agregó 1 mL de bisulfito de sodio 1 M para detener la reacción. Posteriormente, se centrifugó a 5585 x g (Costar, mini centrifuge, DC, USA) durante 20 min. El precipitado se guardó en congelación para su uso posterior. El sobrenadante se fraccionó por ultrafiltración (Amicon, MA, EUA), con membradas de celulosa (Millipore, Corp., Billerica, MA) de corte 1.0 kDa para obtener las fracciones señaladas en el Cuadro 1; las fracciones se liofilizaron a -54 °C durante 48 h (Virtis Benchop, Modelo 2312, NY, EUA) y se guardaron a 4°C hasta su análisis.

5.4. Síntesis de Neoglicoconjugados Fucosilados y Uso de Mucina Submaxilar Bovina como Glicoconjugados Sialilados

Los neoglicoconjugados fucosilados (BSA-OFuc) se sintetizaron mediante la reacción de Maillard controlada siguiendo la técnica de Sarabia-Sainz *et al.* (2013) con modificaciones. La conjugación se llevó a cabo individualmente, conjugando los OFuc > 1 kDa obtenidos por la reacción de Fenton (dializados con membrana de 1 kDa) con BSA. Para ello se disolvieron 20 mg de BSA en 20 mL de solución salina amortiguadora de fosfatos 20 mM (PBS) pH 8.5. Enseguida, se mezclaron individualmente, con 20 mg de OFuc y sus fracciones, posteriormente se congelaron a -40 °C durante 48 h. A continuación, se liofilizaron durante 48 h a -54 °C (Virtis Benchop 6.6, NY, USA). Los liofilizados resultantes se glicaron a 100 °C durante 30 min, deteniendo la reacción al añadir 20 mL de agua desionizada a 4 °C, manteniendo los tubos de reacción en baño de hielo con sal durante 1 min. Los remanentes de reactantes que no reaccionaron se removieron dializando con agua bidestilada a 4 °C (6 cambios), utilizando membranas de corte 14 kDa. En seguida, las muestras se congelaron a -40 °C, se liofilizaron y se guardaron a 4 °C hasta su análisis.

5.4.1. Caracterización de los Neoglicoconjugados Fucosilados

Los neoglicoconjugados de las fracciones $< y > 1$ kDa de OFuc se caracterizaron mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 8%. Se aplicaron 5 μ g de proteína en cada pozo, corriendo el gel a 100 V utilizando una fuente de poder (PowerPac 3000, Bio-Rad, CA, EUA). También se caracterizó por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier y Reflexión Total Atenuada (FTIR-ATR) utilizando un espectroscopio Cary 630 FTIR (Agilent, Santa clara, CA, USA) siguiendo los procedimientos establecidos en el Laboratorio de Función y Funcionalidad de Proteínas y Glicanos del CIAD. Como control positivo se llevó a cabo la síntesis de BSA-Lac, siguiendo las condiciones ya descritas, utilizando PBS pH 7.4. La mucina submaxilar bovina se utilizó como fuente de glicoconjugados sialilados. Para este propósito primero se dializó contra agua bidestilada utilizando membranas de corte de 14 kDa (6 cambios). Posteriormente se congeló a -40 y se liofilizó a -54°C (Virtis Benchop, Modelo 2312, NY, EUA) En seguida, se caracterizó por FTIR-ATR y DLS (tamaño y carga).

5.5. Reconocimiento de Glicoconjugados por Lectinas de Plantas

Para determinar si diferentes lectinas de plantas pueden reconocer a los carbohidratos conjugados en BSA-OFuc y al ácido siálico presente en las mucinas submaxilares bovinas, se utilizó un ensayo con lectinas similares a ELISAS (ELLAS). Se siguió el protocolo descrito por Sarabia-Sainz *et al.* (2013). Se utilizaron las lectinas biotiniladas de *Ricinus communis* 1 (RCA1), *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA) *Ulex europaeus* 1 (UEA1). RCA I reconoce Gal(β -1,4)GlcNAc, SNA y MAA reconocen Sia α 2-6Gal/GalNAc y Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, respectivamente. Por último, UEA1 reconoce Fuc α 1-2GlcNAc y AAA que reconoce Fuc α 1-3.

Los neoglicanos de BSA-OFuc y la mucina submaxilar bovina previamente dializada, se inmovilizaron individualmente en cajas de 96 pozos. Se utilizó una concentración de 30 μ g en 100 μ L de PBS pH 8.5 y se incubó durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, se efectuaron tres lavados con

PBS, pH 7.4. A continuación, se bloquearon las interacciones inespecíficas con 200 μL de BSA al 1.5% en PBS pH 7.4 durante 2 h a 25 °C. En seguida, se realizaron nuevamente tres lavados con PBS. Inmediatamente después, se añadieron por separado y a cada pozo, 100 μL de las diferentes lectinas a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ y se incubó durante 1 h a 25 °C. Nuevamente se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar a las lectinas que no reaccionaron y se incubó durante 1 h a 25 °C con de estreptavidina peroxidasa en dilución 1:1000 (100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$). Después de tres nuevos lavados con PBS, se incubaron con 100 μL de O-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) por 10 min a 25 °C para revelar la interacción. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (modelo 680, Bio-Rad, CA, USA) para cuantificar la interacción. El análisis se hizo por duplicado con nueve observaciones por réplica. Se utilizaron BSA-Lac y BSA nativa como controles positivo y negativo, respectivamente.

5.6. Síntesis de Nanopartículas Núcleo-Coraza Cargadas con Rifaximina

Para la síntesis de nanopartículas núcleo-coraza cargadas con antibiótico se siguió el protocolo descrito por Terán-Saavedra *et al.* (2020) con modificaciones menores. Para sintetizar el núcleo y encapsular la rifaximina (nanopartículas de BSA-RFX), se disolvieron 30 mg de BSA en 2 mL de agua desionizada. Posteriormente se añadió una solución de 2.5 mg de rifaximina en etanol absoluto, gota a gota y en agitación constante, seguido de la adición de 4 mL de etanol absoluto, para promover la desolvatación. En seguida, se añadieron 12 μL de glutaraldehído (8%) para inducir el entrecruzamiento de las moléculas de BSA y dar estabilidad a las nanopartículas formadas. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 30 min; transcurrido el tiempo, las nanopartículas se lavaron tres veces con agua desionizada y se recuperaron mediante centrifugación (4000 g durante 25 min a 25 °C).

Las nanopartículas de BSA cargadas con RFX (NPs BSA-RFX) se recubrieron independientemente con una coraza de BSA-OFuc (NPs BSA-BSA-OFuc) o de mucina submaxilar bovina dializada (NPs BSA-Muc-Sial) obteniendo partículas tipo núcleo-coraza. Para ello, las NPs BSA-RFX (núcleo) se suspendieron en 2 mL de agua desionizada y se adicionó 1 mL de una solución

específica de neoglicano (BSA-OFuc) o mucina submaxilar bovina a 2 mg/mL (coraza). Después de 10 min de agitación se agregaron 2 µL de glutaraldehído al 8%. La solución se mantuvo en agitación durante 2 h a 25 °C; transcurrido el tiempo de agitación, las NPs se lavaron tres veces con 2 mL de agua desionizada y se recuperaron mediante centrifugaciones (4000 g durante 25 min a 25 °C). Además, se sintetizaron nanopartículas conteniendo únicamente el núcleo de BSA, como control.

5.7. Determinación de Tamaño, Carga Superficial y Rendimiento de Encapsulamiento de las Nanopartículas Núcleo-Coraza

El tamaño medio y la carga superficial de las nanopartículas núcleo-coraza se determinó utilizando el principio de DLS en un equipo Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, UK). Las muestras de las nanopartículas recién sintetizadas se en agua desionizada y los datos fueron analizados con un ángulo de dispersión de 90° a una temperatura de 25 °C. Cada medición fue el resultado de tres repeticiones, para cada réplica se consideraron tres mediciones con un total de 9 observaciones.

El porcentaje de rendimiento del encapsulamiento se estableció según Sarabia-Sainz *et al.* (2011), usando la siguiente fórmula (ecuación 1):

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Cantidad de nanopartículas obtenidas (mg)}}{\text{Cantidad de neoglicano + cantidad de antibiótico (mg)}} \times 100 \quad (1)$$

5.8 Eficiencia de Encapsulamiento de Rifaximina

La eficiencia de encapsulamiento del antibiótico se determinó según lo descrito por Kumar y

Newton, (2016) con modificaciones. Se realizó la síntesis de nanopartículas BSA-RFX como se describió previamente en el apartado 5.6, omitiendo los lavados. Las nanopartículas se centrifugaron a 4000 x g durante 25 min. La rifaximina inicial se cuantificó de la solución previa a la centrifugación y la rifaximina libre se cuantificó del sobrenadante, por espectrometría UV-Vis a 233 nm con celdas de cuarzo. Posteriormente, se calculó la eficiencia de encapsulamiento siguiendo la ecuación 2.

Para efectos de comparación y determinación del antibiótico encapsulado, se realizó una curva patrón de rifaximina siguiendo el protocolo descrito por Correa *et al.* (2019) con modificaciones, las concentraciones utilizadas fueron 4, 6, 8, 10, 12 y 14 µg/mL. Se preparó una solución de 1 mg/mL de rifaximina en etanol absoluto, la cual se colocó durante 15 minutos en un baño con ultrasonido. Posteriormente, la solución se llevó a una concentración de 200 µg/mL con etanol al 20% y se filtró con papel Whatman de 250 mm. Por último, se prepararon diluciones a diferentes concentraciones de rifaximina y se leyeron a 233 nm con celdas de cuarzo en un espectrómetro de UV-Vis. Cada dilución se procesó por triplicado.

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{RFX inicial} - \text{RFX libre}}{\text{RFX Inicial}} \times 100 \quad (2)$$

5.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Campylobacter jejuni* de Rifaximina y de Nanopartículas Cargadas con Antibiótico para *Campylobacter jejuni*

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la rifaximina se determinó por la técnica de microdilución en placa según Correa *et al.* (2021) con modificaciones. Se preparó una solución de 5 mg/mL de rifaximina en etanol absoluto y se realizaron diluciones seriadas de 5 a 0.01 mg/mL con agua desionizada estéril. La bacteria *C. jejuni* se ajustó con PBS pH 7.4 a una densidad óptica de 0.6 a 620 nm. En placas de cultivo estériles de 96 pozos se agregaron 240 µL de caldo *Brucella* previamente desgasificado, 30 µL de la dilución de rifaximina correspondiente y 10% del inóculo de *C. jejuni* ajustado. Posteriormente, se colocó una película de plástico sobre la placa para

mantener las condiciones anaeróbicas. La cinética de crecimiento se realizó a 37 °C, durante 72 h en un lector de absorbancia de microplacas (Anthos Zenyth 340st, Alcobendas, Madrid). Se efectuaron lecturas de la muestra cada 30 min a 620 nm con agitación baja cada 30 s. Las concentraciones estudiadas de rifaximina fueron 500, 250, 125, 63, 31, 16, 8, 4, 2 y 1 µg/mL. Además, se colocaron pozos con inóculo en ausencia de rfx, así como pozos con inóculo sustituyendo la cantidad de rfx por etanol al 50% para verificar que el diluyente del antibiótico no afectó el crecimiento de la bacteria.

Para determinar la CMI de nanopartículas se llevó a cabo el mismo procedimiento, reemplazando las diluciones de RFX por diluciones de las nanopartículas cargadas con RFX de cada tratamiento (Nps BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial, además de nanopartículas de BSA-BSA-Lac y sólo de BSA como controles). Las concentraciones estudiadas fueron de 1 a 0.125 mg/mL. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado; la preparación y llenado de las placas de las soluciones de rifaximina se realizaron en ausencia de luz. La CMI se determinó como la concentración en la que no se presentó crecimiento después de 96 h de monitoreo.

5.10. Interacción de las Nanopartículas con Cepas de *Campylobacter jejuni*

Para establecer si las NPs pueden ser reconocidas por *C. jejuni*, se realizó un ensayo de ELLA para cuantificar la interacción adhesina-matriz encapsulante. El ensayo se realizó también con los antagonistas glicomiméticos (neoglicanos BSA-OFuc y mucina sialilada), para efecto de comparación. Se siguió el procedimiento establecido por Sarabia-Sainz *et al.* (2011;2012) con modificaciones. Las nanopartículas se biotinilaron para poder revelar la interacción entre los carbohidratos de la coraza y las lectinas bacterianas, aprovechando la alta afinidad de la estreptavidina hacia la biotina. La biotinilación se llevó a cabo diluyendo 3 mg de NPs en 2.4 mL de PBS a pH 7.4. A partir de esta mezcla se agregó la biotina, que anteriormente se diluyó 2.4 mg de biotina en 220 µL de dimetil sulfóxido. Las NPs o neoglicanos con biotina diluida se colocaron en un frasco ámbar e incubaron en obscuridad durante 2 h a 4 °C. Las muestras se dializaron en agua bidestilada con membranas de corte de 14 kDa, haciendo 6 cambios a un vaso de 2 L. Posteriormente, los tratamientos se congelaron a -40 °C, y liofilizaron a -54 °C (Virtis Benchop

6.6, Holanda).

En el ensayo se evaluó a 37 °C y 42 °C. Por lo tanto, la bacteria se sembró en medio *Brucella* a 37 °C durante 48 h, posteriormente se incubó a 42 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo, se realizaron tres lavados a la bacteria con PBS pH 7.4 para ajustar a una DO de 0.6 a 660 nm. A continuación, se añadió 1 mL de glutaraldehído al 10 % a 9 mL de la bacteria ajustada fijarla a los pozos de placas de ELISA. Se agregaron 100 µL de bacteria por pozo, incubando durante 2 h a 25 °C; se efectuaron 2 lavados con TPBS(PBS pH 7.4 0.02 M conteniendo 0.05% de tween 20) y un lavado con PBS pH 7.4, posteriormente, se bloquearon interacciones no específicas con 100 µL de BSA al 1.5% por 24 h a 4 °C. Después de tres nuevos lavados con TPBS y PBS, la bacteria se incubó (2 h, 25 °C) con 100 µL de NPs o neoglicanos (50 µg/100 µL) previamente biotinilados. Después de 3 lavados con TPBS y PBS, se incubó por 1 h a 25 °C con extravidina peroxidasa (1:1000 v/v en PBS pH 7.4), se lavó con TPBS y PBS, y se desarrolló el color con OPD, incubando 10 min a 25 °C. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA (Anthos modelo Zenyth 340st, Alcobendas, Madrid), para cuantificar la interacción. Las pruebas se realizaron por triplicado.

5.11. Análisis Estadístico

Los valores obtenidos de todas las determinaciones de los ensayos ELLAs se analizaron mediante un análisis de varianza de una sola vía. Se estimaron significancias de $p \leq 0.05$. Cuando existió efecto del tratamiento, se realizó una prueba de comparación de medias a través de la prueba de Tukey-Kramer. Se realizó estadística descriptiva para el reporte de los datos de distribución de tamaño y carga superficial. Los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS Statistical Software 2007 (NCSS, LLC, Utah, USA). Las gráficas se obtuvieron con el software SigmaPlot 11 (Systat Software, CA, USA).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Rendimiento y Caracterización de Oligosacáridos de Fucoïdan

La síntesis de neoglicanos con potencial de antagonistas glicomiméticos requiere de oligosacáridos de baja masa molecular; ello debido a su mayor reactividad durante la glicación (Ledesma-Osuna *et al.*, 2008). Con el fin de encontrar las mejores condiciones para la obtención de oligosacáridos fucosilados (OFuc), se evaluaron las técnicas de hidrólisis ácida y reacción de Fenton. Según Pomin *et al.* (2005), el mecanismo de acción de la hidrólisis ácida en polisacáridos sulfatados inicia con una desulfatación de la molécula, para posteriormente escindir el enlace glicosídico de la unidad no sulfatada dando como resultado oligosacáridos homogéneos. Sandoval-Larios (2020) obtuvo oligosacáridos de fucoïdan mediante esta técnica incubando fucoïdan a diferentes tiempos (1-120 min) en presencia de 0.01 N de HCl, a 100 °C. Debido a los bajos rendimientos obtenidos en este trabajo de tesis, se decidió probar otras condiciones, además de evaluar la obtención de oligosacáridos mediante la reacción de Fenton, para motivos de comparación. En la reacción de Fenton los radicales OH, generados por la presencia de H₂O₂, rompen los enlaces glicosídicos mediante un proceso oxidativo. El mecanismo propuesto inicia con la separación de un H enlazado a un C, después al reaccionar con el O₂ se forma el radical peroxilo. El ataque del radical OH puede llevar a la escisión del enlace glicosídico (abstracción del H del C1, C4 o C5) o a la formación de un residuo estable (abstracción en C2, C3 o C6) (Miller *et al.*, 2001).

6.1.1 Rendimiento de Obtención de OFuc por Hidrólisis Ácida y Reacción de Fenton

Para la fragmentación por hidrólisis ácida, se utilizaron las condiciones propuestas por Sandoval-Larios (2020), aumentando el tiempo de reacción a 180 min. En la Figura 10 se presentan los rendimientos obtenidos después de la separación por ultrafiltración. Se obtuvieron rendimientos de 10 y 9 % para las fracciones 1 (>1 kDa) y 2 (< 1 kDa), respectivamente, indicando que únicamente

el 19 % del fucoïdan fue escindido. Se realizaron varios intentos para volver a fragmentar la fracci3n de fucoïdan remanente, sin que se obtuvieran mayores rendimientos. Una posibilidad es aumentar la concentraci3n del 1cido presente; sin embargo, deben establecerse cuidadosamente los tiempos de hidr3lisis para evitar que las mol3culas de fucosa resulten da1adas, produciendo una degradaci3n que afecte el biorreconocimiento. En la b3squeda de otras alternativas se decidi3 probar la reacci3n de Fenton, incubando al fucoïdan con H₂O₂ 0.2 M a 60 3C/8 h, 80 3C/4 h, 90 3C/ 4 h y 100 3C/ 2 h. Como se observa en la Figura 10, el rendimiento de estos tratamientos, comparado con la hidr3lisis 1cida, fue mayor. El tratamiento a 60 3C durante 8 h escindi3 al 83.2 % del fucoïdan presente, mientras que en los tratamientos a 80 y 90 3C durante 4 h se obtuvo un rendimiento de 56 y 40.4%, respectivamente. Al llevar a cabo la reacci3n a 100 3C durante 2 h se obtuvo el mayor rendimiento, escindiendo al polisac1rido en un 93.8%.

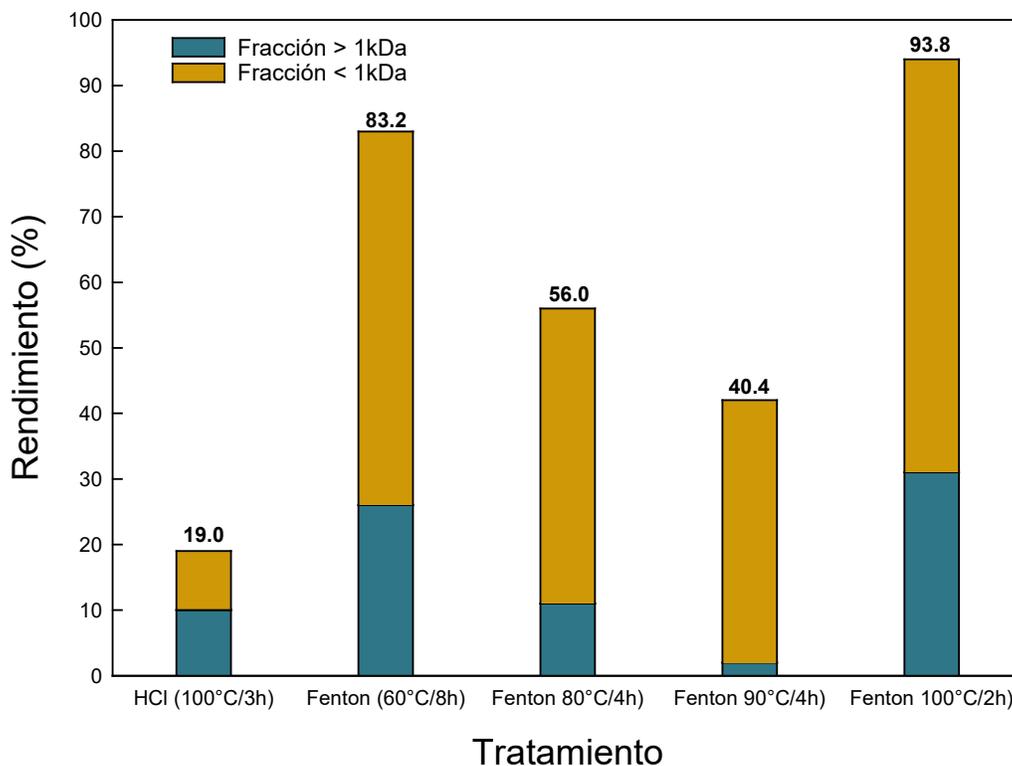


Figura 10. Rendimientos de la fragmentaci3n del fucoïdan por hidr3lisis 1cida y reacci3n de Fenton.

Hou *et al.* (2012) obtuvieron rendimientos de 43 % en fracciones de OFuc < 3 kDa, al escindir fucoidan en presencia de H₂O₂ a 90 °C durante 6 h, comparable con el rendimiento obtenido en este estudio a 90 °C durante 4 h. Sin embargo, en este estudio se logró obtener un mayor rendimiento (93.75%) al probar una temperatura de reacción mayor y tiempos menores (100 °C/2 h) a la utilizada por otros autores (Hou *et al.*, 2012; Jo y Choi, 2014). Al aumentar la temperatura aumenta la velocidad de reacción obteniéndose moléculas con menor masa molecular (Miller y Fry, 2001). Con los resultados anteriores, se puede concluir que la hidrólisis ácida a las condiciones probadas, es poco eficiente para la obtención de OFuc en comparación con la Reacción de Fenton, debido a su bajo rendimiento (19 %). Sin embargo, es importante caracterizar los compuestos obtenidos en la reacción de Fenton para determinar si pueden tener utilidad como antagonistas glicomiméticos.

6.1.2. FTIR-ATR del Fucoïdan Nativo y sus Oligosacáridos

Para determinar posibles cambios en la estructura de los oligosacáridos de fucoidan, se realizó una comparación entre sus espectros FTIR-ATR y los del fucoidan nativo. Debido al bajo rendimiento del tratamiento con hidrólisis ácida, el tratamiento fue descartado, por lo que se presentan únicamente los resultados obtenidos en la reacción de Fenton. El espectro del fucoidan nativo (Figura 11), concordó con el reportado para el fucoidan de *M. pyrifera* (Cid *et al.*, 2020; Beratto-Ramos *et al.*, 2019). Se registró una banda entre 3000 y 3400 cm⁻¹ correspondiente a la humedad de la muestra y al estiramiento de los grupos –OH, presentes en las moléculas de fucosa. El pico de absorción a los 2930 cm⁻¹ se asignó al estiramiento del grupo C-H presente en carbohidratos (Cid *et al.*, 2020). La señal a 1618 cm⁻¹ correspondió al anión COO⁻, asociado al ácido urónico en algas pardas, presente en pequeñas cantidades en algunos fucoidanes y constituyente importante del alginato, un polisacárido que puede co-precipitar en el proceso de obtención del fucoidan (Shekhar *et al.*, 2011).

La banda a 1417 cm⁻¹ se debe a la vibración de estiramiento del enlace C=O del grupo carboxilo, presente en todos los carbohidratos (Guo *et al.*, 2014). Se registró un pico de absorción a 1372

cm^{-1} provocado por la vibración de flexión simétrica del grupo CH_3 del fucoidan. La banda a 1218 cm^{-1} se asigna al estiramiento asimétrico del grupo $\text{S}=\text{O}$, característico de polisacáridos sulfatados (Shekhar *et al.*, 2011). A 1080 cm^{-1} se registró una banda de absorción típica del estiramiento del grupo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ de piranosas (Synytsya *et al.*, 2010). La banda de absorción en 1026 cm^{-1} también corresponde a la vibración del estiramiento del grupo $\text{C}-\text{O}-\text{C}$. Se registró una banda a 962 cm^{-1} provocada por la vibración de estiramiento del grupo $\text{CO}-\text{S}$. Las bandas de absorción registradas a 844 y 820 cm^{-1} se atribuyen a la vibración del grupo $\text{C}-\text{O}-\text{S}$, por grupos sulfatos sustituidos en posición axial en el carbono 4 y en posición ecuatorial en el carbono 2 o 3, respectivamente (Beratto-Ramos *et al.*, 2019).

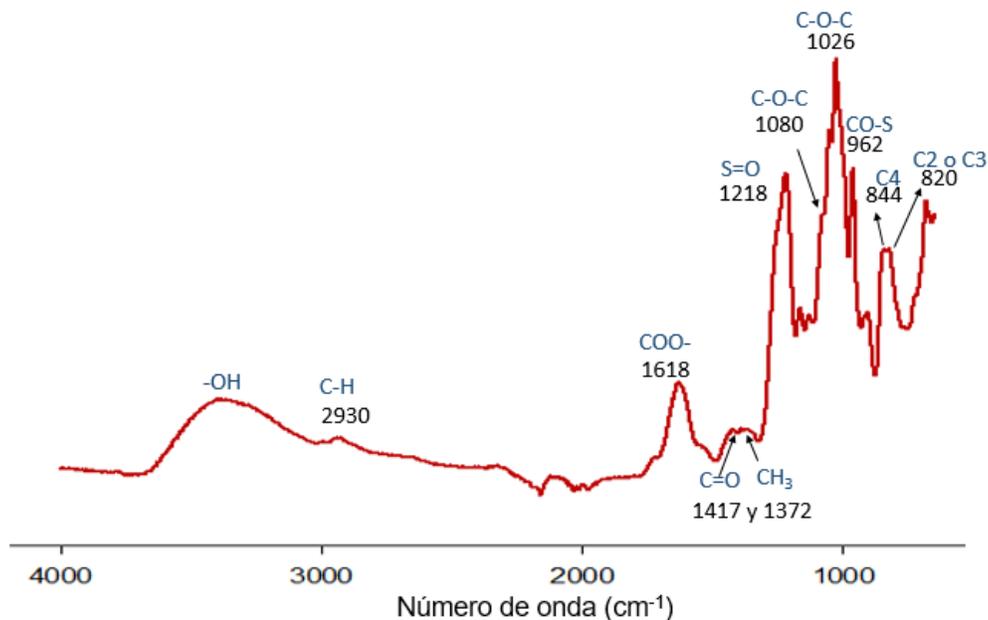


Figura 11. Espectro FTIR-ATR del fucoidan de *Macrocystis pyrifera*.

La Figura 12 muestra la comparación de los espectros de fucoidan nativo con el de los oligosacáridos obtenidos por la reacción de Fenton para la fracción 1 ($> 1 \text{ kDa}$) de los tratamientos a 60 , 80 y $100 \text{ }^\circ\text{C}$. Los espectros FTIR-ATR de los oligosacáridos de fucoidan obtenidos por la fragmentación a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h, conservaron la misma intensidad de las bandas de absorción del espectro del fucoidan nativo. En el resto de las condiciones únicamente se observaron disminuciones en las regiones correspondientes al número de grupos OH (banda entre 3000 y 3400

cm⁻¹) y grado de sulfatación (bandas a 1218, 844 y 820 cm⁻¹, respectivamente). Esto es un indicio de que estas fracciones conservaron las mismas propiedades estructurales del fucoidan, sin afectar sus grupos; es decir, es una prueba indirecta de que se realizó con éxito la fragmentación de la molécula para obtener oligosacáridos de menor masa molecular (Jo y Choi, 2014).

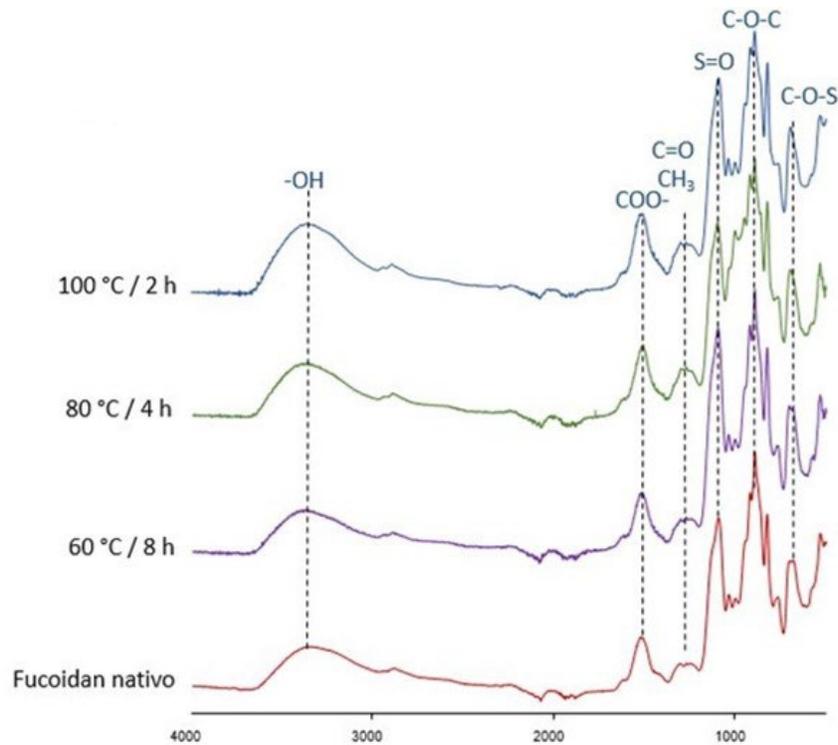


Figura 12. Comparación de los espectros FTIR-ATR de fucoïdan de *M. pyrifera* y los oligosacáridos > a 1kDa obtenidos por reacción de Fenton en diferentes tratamientos.

Por otro lado, los espectros FTIR-ATR de las fracciones 2 (< 1 kDa) de todos los tratamientos (Figura 13), presentaron una disminución significativa en las bandas asignadas a los grupos OH y C-H (entre 3000-3400 y a 2930 cm⁻¹). Además, se observó disminución en la banda a 1618 cm⁻¹ correspondiente a los grupos carboxilo (COO-) y un desplazamiento de la banda atribuida a los grupos sulfato (S=O) de 1218 a 1112 cm⁻¹. También, se observó la disminución de la banda C-O-C (1026 cm⁻¹) que corresponde a los enlaces glucosídicos, el aumento en la banda CO-S (entre 900 y 945 cm⁻¹) y la disminución de la banda atribuida a los grupos sulfato localizados en posición axial en el carbono 4 (C-O-S). Los cambios en las señales correspondientes a los grupos que involucran al S podrían indicar desulfatación (Oliveira *et al.*, 2007).

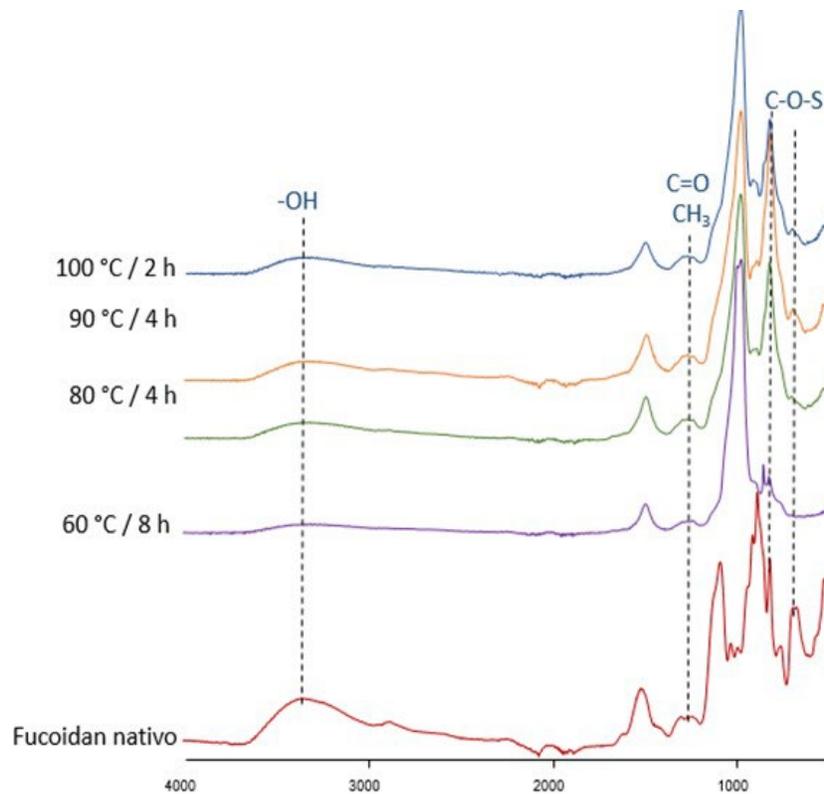


Figura 13. Comparación de los espectros FTIR-ATR de fucoidan de *M. pyrifera* y los oligosacáridos < 1 kDa, obtenidos por reacción de Fenton en diferentes tratamientos.

El corrimiento en la banda a 1112 cm^{-1} podría deberse a la introducción de enlaces éster o de grupos oxo en la cadena principal o a la producción de subproductos de oxidación (Miller y Fry, 2001). En el estudio realizado por Zhao *et al.* (2006) se observó la introducción de estos grupos a la cadena, al degradar con H_2O_2 al porfirán, un polisacárido sulfatado (Zhao *et al.*, 2006). Esto, se ha establecido como una característica estructural del ataque de radicales $\text{OH}\cdot$ (Miller y Fry, 2001). Además, la formación de grupos oxo no afectó la actividad antioxidante del porfirán extraído de algas rojas (Zhao *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta el momento no hay reportes sobre si afecta la bioactividad del fucoidan, por ejemplo, en el biorreconocimiento tipo lectina-carbohidrato, por lo que se decidió utilizar sólo las fracciones > 1 kDa, debido a su similitud con el fucoidan nativo. La reacción de Fenton a 100 °C durante 2 h, fue la técnica más rápida y efectiva para obtener oligosacáridos de fucoidan > 1 kDa. Por lo anterior, se continuó con la caracterización por DLS (tamaño medio; carga superficial) con la fracción > 1 kDa obtenida a las condiciones mencionadas.

6.1.3. Distribución de Tamaño y Carga Superficial de los Oligosacáridos de Fucoïdan

Se analizaron el tamaño de la molécula y la carga superficial del fucoïdan de *M. pyrifera* y se compararon con los de los oligosacáridos obtenidos mediante la reacción de Fenton a 100 °C por 2 h. En la Figura 14A se muestra como en el fucoïdan nativo se encuentran poblaciones entre 10000 y 1000 nm. Esta polidispersidad es normal en los polisacáridos naturales debido a sus diversas funciones biológicas dentro del organismo que los produce. El fucoïdan participa en la construcción de las paredes celulares de las algas pardas y por tanto, en el soporte de su estructura, protegiendo también al alga de la desecación (Ponce y Stortz, 2020). Además, intervienen en la extrusión de esporas y gametos de los órganos reproductores, previniendo la liberación prematura de los gametos femeninos. La degradación de la pared celular y de la pared que contiene a los gametos, da lugar a diferentes tamaños de molécula de fucoïdan (Skriptsova, 2015). Los fucoïdanos desempeñan un papel sustancial en la morfogénesis de los cigotos de las algas fucoïdes, ya que participan en el establecimiento de la polaridad celular y la fijación del eje de división celular, determinando así la dirección del desarrollo de los polos rizoidales y apicales de los talos jóvenes. La degradación de la pared celular del cigoto durante la fertilización da lugar a estructuras fucoïdales de diferentes tamaños (Skriptsova, 2015). Otro factor que influye en el tamaño de partícula es el método de extracción de fucoïdan utilizado (Zayed y Ulber, 2020).

La evidencia de que la reacción de Fenton fragmentó al fucoïdan se muestra en las figuras 14B y 14C donde se observa el desplazamiento del tamaño de las poblaciones hacia el lado izquierdo. La distribución de tamaño de OFuc > 1 kDa se encontró entre 1000 y 10 nm, mientras que la de los OFuc < 1 kDa se localizó entre 1000 y 1 nm, predominando la población entre 1 y 10 nm. Los tamaños promedio de la molécula de fucoïdan y sus fracciones se presentan en el Cuadro 2. La molécula de fucoïdan presentó un tamaño medio de 755.09 ± 31.20 nm, mientras que en los OFuc se observó una disminución de tamaño medio a 180.80 ± 66.61 y 134.68 ± 31.20 nm para las fracciones > 1 kDa y < 1 kDa, respectivamente.

Además, la fragmentación del fucoïdan ocasionó una disminución de la carga eléctrica negativa de las partículas, la cual puede estar asociada a la desulfatación de la molécula. En el Cuadro 2 se observa que la disminución de la carga estuvo asociada a la disminución del tamaño de partícula.

Mientras que el fucoidan nativo presentó una carga superficial de -49.01 ± 0.72 , la carga de las fracciones de > 1 kDa y < 1 kDa, fue de -23.15 ± 1.99 , y -15.18 ± 2.30 , respectivamente. Estas observaciones podrían correlacionar con la disminución de grupos sulfatos, observado en los espectros FTIR-ATR de las fracciones de oligosacáridos (Figuras 12 y 13).

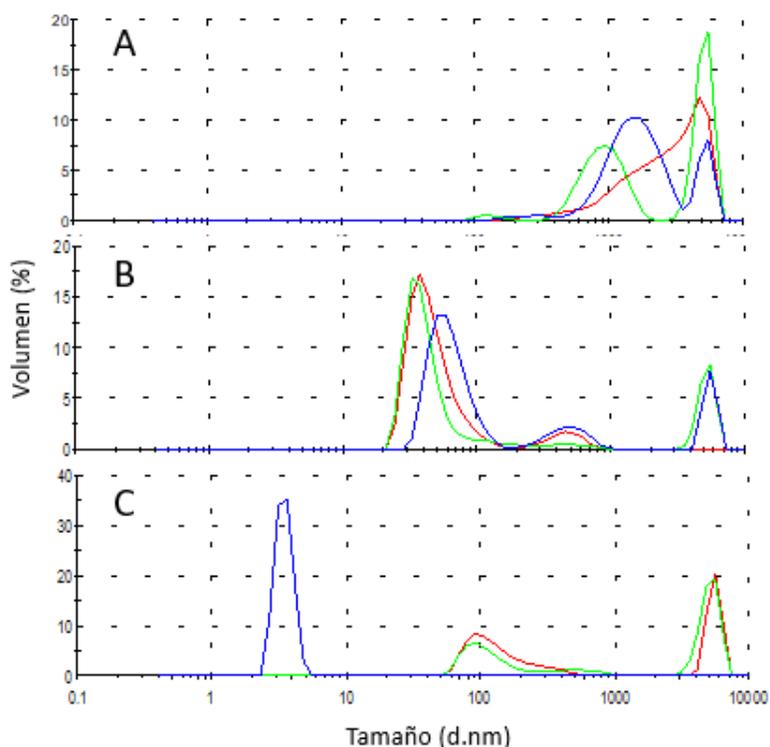


Figura 14. Distribución de tamaño de oligosacáridos de fucoidan obtenidos por reacción de Fenton a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. A: Fucoidan nativo; B: OFuc > 1 kDa; C: OFuc < 1 kDa.

Cuadro 2. Distribución de tamaño y carga superficial de los oligosacáridos de fucoidan obtenidos por reacción de Fenton a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h.

	Fucoidan nativo	Fracción > 1 kDa	Fracción < 1 kDa
Tamaño medio (nm)	755.09 ± 31.45	180.80 ± 66.61	134.68 ± 31.20
Potencial Z (mV)	-49.01 ± 0.72	-23.15 ± 1.99	-15.18 ± 2.30
PDI*	0.5	0.6	0.5

Los datos se muestran como el promedio \pm desviación estándar.

*IPD: Índice de polidispersidad

6.2. Caracterización de Neoglicanos BSA-OFuc

6.2.1. Espectros FTIR-ATR de los Neoglicanos Fucosilados

Los neoglicanos de BSA-OFuc se obtuvieron mediante una reacción de Maillard controlada. Para comprobar la conjugación entre la BSA y los oligosacáridos de fucoïdan, se analizó la estructura de los neoglicanos por FTIR-ATR. La Figura 15 muestra la comparación entre el espectro de la BSA y los neoglicanos fucosilados. El espectro característico de la BSA se muestra en azul verde, destacando las señales emitidas por las amidas I y II (1652 y 1543 cm^{-1} , respectivamente). La modificación de la BSA con los OFuc se evidenció en las bandas a 1221 , 1026 , 962 y 838 cm^{-1} de los espectros en amarillo y rojo, dentro de la región de la huella dactilar de carbohidratos. Estas modificaciones corresponden a los grupos S=O, C-O-C, CO-S y C-O-S respectivamente. Estos grupos funcionales son propios del fucoïdan y no se encuentran en la albúmina. En resumen, los resultados indican que se llevó a cabo con éxito la conjugación entre la BSA y los oligosacáridos de fucoïdan de las fracciones $> 1\text{ kDa}$. Debido a que los patrones de los OFuc de la región de huella dactilar de los carbohidratos son muy similares a los del fucoïdan (Figura 15), también, se confirma que la estructura de la molécula de fucosa se conservó durante la fragmentación por la reacción de Fenton.

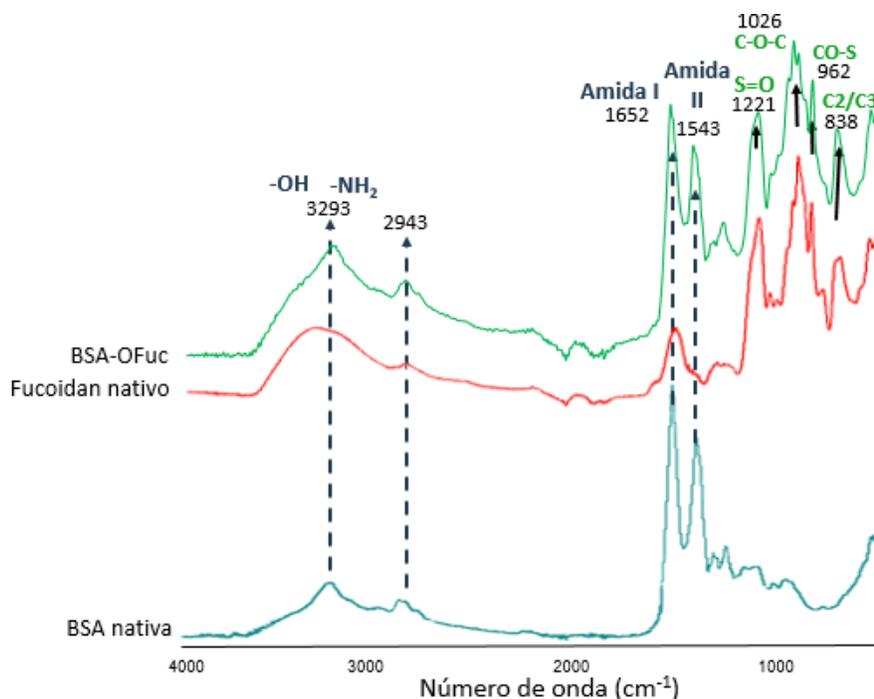


Figura 15. Espectros FTIR-ATR del neoglicano fucosilado.

6.2.2. SDS-PAGE de glicoconjugados BSA-OFuc

Como prueba adicional de que la glicación se llevó a cabo se estudió el perfil electroforético de los neoglicanos obtenidos con las fracciones de OFuc, comparándolo con el de la BSA sin modificar. En la Figura 16 se presenta la electroforesis SDS-PAGE del gel de poliacrilamida al 8% obtenido. Todos los neoglicanos migraron menos que la BSA, lo cual es un indicio de la modificación. La BSA-Lac (control positivo), mostró la menor migración, indicando que el número de modificaciones con lactosa fue mayor al de las modificaciones de la BSA con OFuc. Este comportamiento es predecible debido a la menor masa molecular de la lactosa y se ha observado en estudios anteriores (Sarabia-Sainz *et al.*, 2009, 2011). La menor migración de los neoglicanos BSA-OFuc fue menos evidente, indicando que el número de modificaciones fue menor.

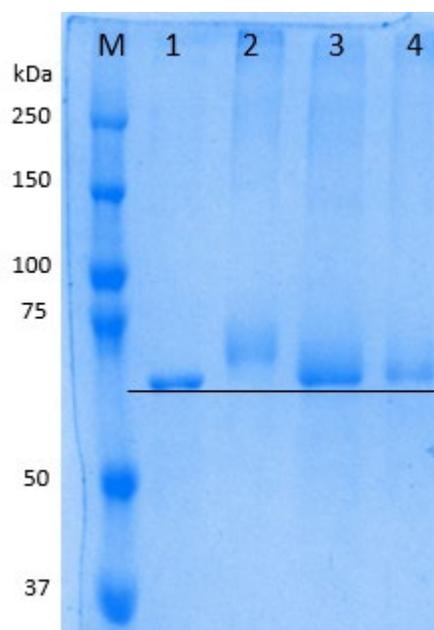


Figura 16. Diferencias en la migración de las bandas de neoglicanos fucosilados en gel SDS-PAGE. M: marcado de masa molecular; 1: BSA; 2: BSA-Lac; 3: BSA-OFuc₁; 4: BSA-OFuc₂.

El análisis de migración utilizando el software Image Lab™ (Image Lab 3.0, BioRad) indicó una masa molecular aproximada de 66.3 kDa para la BSA, mientras que para la BSA-Lac (carril 2), la BSA-OFuc₁ (carril 3) y la BSA-OFuc₂ (carril 4) fueron de 76.3, 68.3 kDa y 69.6 kDa, respectivamente. El Cuadro 3 muestra la estimación de monosacáridos agregados mediante la reacción de Maillard, con base en sus masas moleculares. De acuerdo con lo anterior, en el neoglicano BSA-OFuc₁ se conjugaron aproximadamente 11 moléculas de fucosa, mientras que en BSA-OFuc₂ la conjugación fue con 20 fucosas. Este comportamiento concuerda con Ledesma-Osuna *et al.* (2008), quienes observaron que los carbohidratos de menor masa molecular son más reactivos en la reacción de Maillard. Cabe resaltar que la estimación de moléculas conjugadas se realizó considerando la masa de la fucosa, sin tomar en cuenta la posibilidad de que algunos de los monosacáridos conjugados a la albúmina estuvieran sulfatados. Los resultados obtenidos son únicamente una aproximación que puede mejorarse determinado el grado de sulfatación de los neoglicoconjugados y realizando un análisis de espectrometría de masas. No obstante, el perfil electroforético de los neoglicanos confirma los resultados de FTIR-ATR.

Cuadro 3. Estimación del grado de glicación de BSA-OFuc con base en su masa molecular.

	Masa molecular (kDa)	Monosacáridos conjugados*
BSA nativa	66.6	-
BSA-Lac	76.6	29.1
BSA-OFuc₁	68.6	11.9
BSA-OFuc₂	69.9	20.0

*Cálculo de monosacáridos conjugados: (masa molecular del neoglicano-masa molecular BSA nativa) / masa molecular de la fucosa (o lactosa, según corresponda).

6.3. Caracterización por FTIR-ATR, Tamaño Medio y Carga Superficial de la Mucina Submaxilar Bovina

Para evaluar la posibilidad de utilizar a la mucina bovina (Muc-Sial) como antagonista glicomimético, se caracterizó mediante FTIR-ATR. La Figura 17 presenta el espectro FTIR-ATR típico obtenido, el cual concuerda con reportes previos (Lewis *et al.*, 2013). El espectro presenta las cuatro bandas características de la mucina. La primera a 3300 cm⁻¹ correspondiente a la vibración producida por el estiramiento de NH (Cid *et al.*, 2020). A 1638 cm⁻¹ se encontró la vibración de estiramiento C=O de la Amida I (Beratto-Ramos *et al.*, 2019). La señal a 1541 cm⁻¹ se asignó a la vibración de flexión N-H y la vibración de estiramiento C-N de la banda Amida II. Además, se presentó una banda a 1032 cm⁻¹ que corresponde al grupo C-O-C característico de carbohidratos que glicosilan a la mucina (Cid *et al.*, 2020). Existe evidencia de que la presencia de carbohidratos en la mucina, como el ácido siálico, contribuyen individualmente a su patrón general, observado principalmente por la conservación de la banda de absorción a 1638 cm⁻¹ que podría deberse a la presencia del grupo C=O en los carbohidratos contenidos en la glicoproteína (Lewis *et al.*, 2013). Además de observar el espectro FTIR-ATR de la mucina, también, se caracterizó el tamaño promedio de la molécula y su carga superficial. El tamaño medio de la mucina fue de 1020.12±178.64 nm, presentando una carga superficial negativa de -40.88±4.49, impartida principalmente por el ácido siálico presente (Sandberg *et al.*, 2008). El índice de polidispersidad fue muy alto (0.99). Bhavanandan *et al.* (1999), atribuyen la alta polidispersidad de las mucinas a una combinación de múltiples genes homólogos, el empalme alternativo (alternative splicing), la heterogeneidad de la glicosilación, así como otras modificaciones postraduccionales, contribuyen a la polidispersidad extrema de las mucinas.

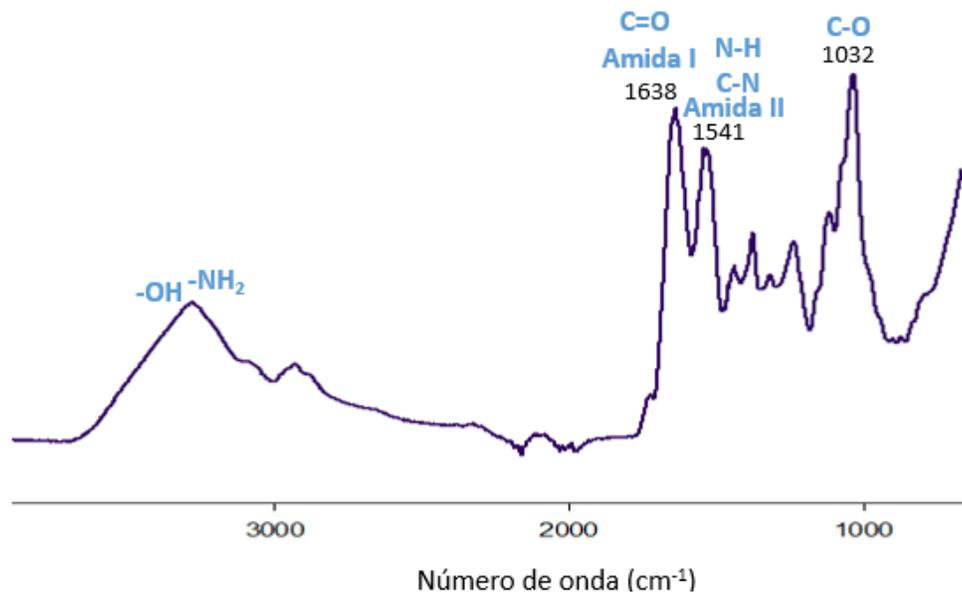


Figura 17. Espectro FTIR-ATR de la mucina submaxilar bovina

6.4. Ensayo de Biorreconocimiento de BSA-OFuc y Muc-Sial

Una vez confirmada la glicación de la BSA con los oligosacáridos OFuc, se utilizó un ensayo con lectinas (ELLA), similar a ELISA, para determinar si las lectinas de UEA-1 (*Ulex europaeus agglutinin 1*) y de AAA (*Anguilla anguilla*), específicas para fucosa, podían reconocerlos. En la figura 18 se presentan los resultados obtenidos, comparados con la lectina de RCA-1 que reconoce galactosa. Como se puede observar la señal de reconocimiento fue muy baja (absorbancia 0.01-0.032 UA) y mayor para la lectina de RCA-1. Sin embargo, se presenta mayor reconocimiento de la lectina AAA que de la lectina UEA-1 hacia los OFuc. Esto puede deberse a que la mayoría de los enlaces que unen a la fucosa en el fucoideano de *M. pyrifera* son del tipo α 1-3 (Zou *et al.*, 2021). La lectina de AAA reconoce fucosas unidas mediante este tipo de enlaces (Wu *et al.*, 2004), mientras que la de UEA-1, reconoce fucosas unidas mediante enlaces α 1-2 (Balducci *et al.*, 1996), los cuales se encuentran en menor proporción en la molécula de fucoideano de *M. pyrifera* (Zou *et al.*, 2021). Una posible razón del reconocimiento de la lectina de RCA-1 es la presencia de galactosas en el fucoideano de *Macrocystis pyrifera*. No obstante, para confirmar el biorreconocimiento hacia los neoglicanos de fucosa es recomendable determinar la presencia de fucosa en los mismos, probar diferentes concentraciones de lectinas y neoglicanos para el ensayo

de ELLA y realizar estudios de espectrometría de masas y otros encaminados a determinar la estructura de los OFuc y de los BSA-OFuc obtenidos.

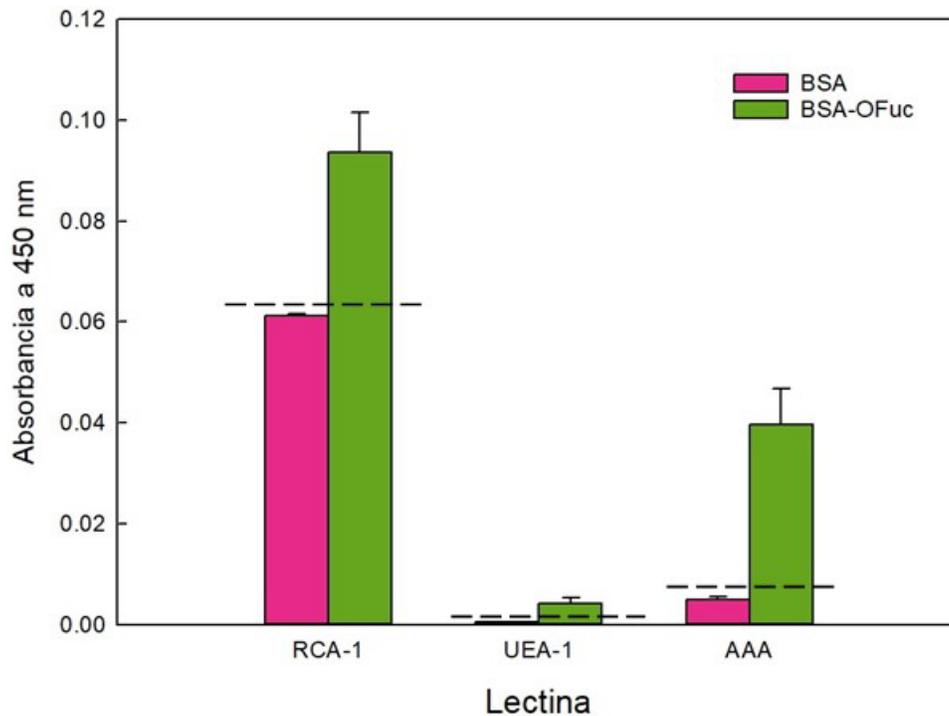


Figura 18. Biorreconocimiento de BSA-OFuc por lectinas vegetales. RCA-1: *Ricinus communis* 1; UEA-1: *Ulex europaeus* 1 y AAAS; *Anguilla anguilla*. Las líneas punteadas indican la interacción inespecífica de las lectinas con la BSA.

Para evaluar el reconocimiento de lectinas hacia la Muc-Sial, se utilizaron las lectinas de SNA-1 (*Sambucus nigra*), que reconoce ácido siálico unido a la galactosa terminal en α -2,6 (Kaku *et al.*, 2007) y la de MAA (*Maackia amurensis*) que se une a estructuras de glicanos que contienen ácido siálico unido por enlaces α -2,3 (Imberty *et al.*, 2000). La Figura 19 presenta los resultados obtenidos. Se observó un mayor reconocimiento por la lectina de MAA en comparación con la lectina SNA. La Muc-Sial es un polímero natural utilizado en aplicaciones de biomateriales por su viscoelasticidad, lubricidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. La glicosilación de esta molécula es tanto del tipo N como del tipo O-glicano. Para el caso de la N-glicosilación, predominan las N-acetilgalactosaminas terminales que pueden estar sulfatadas o fucosiladas; no se ha identificado la presencia de ácido siálico (Kim *et al.*, 2019). En cambio, las estructuras de los

O-glicanos se encuentran preferentemente sialilados (81.9%) siendo los principales el ácido *N*-acetylneuramínico (Neu5Ac) y el ácido *N*-glycolylneuramínico (Neu5Gc). Otros estudios han demostrado que en bovinos predominan las uniones de ácido siálico en α -2,3 (Velásquez *et al.*, 2007). En resumen, la batería de lectinas utilizada reconoció a los neoglicanos y a la mucina, de manera específica dependiendo del carbohidrato. Por otro lado, los O-glicanos no sialilados de la mucina contienen galactosas terminales, lo mismo que los N-glicanos. Esto pudiera explicar el reconocimiento de RCA-1 (Kim *et al.*, 2019;2020).

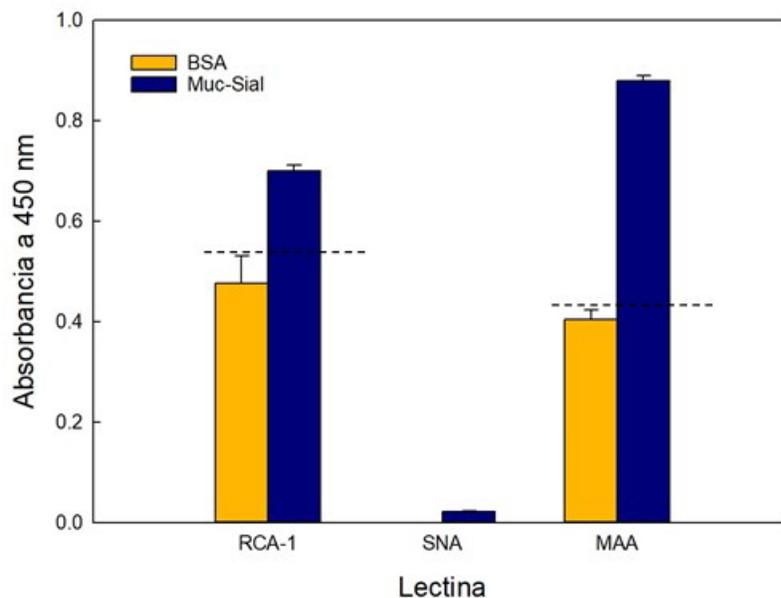


Figura 19. Biorreconocimiento de Muc-Sial por lectinas vegetales. RCA-1: *Ricinus communis* 1; SNA: *Sambucus nigra* 1 SNA y MAA: *Maackia amurensis*. Las líneas punteadas indican la interacción inespecífica de las lectinas con la BSA.

6.5. Síntesis y Caracterización de Nanopartículas BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial

6.5.1. Tamaño Medio y Potencial Z de las Nanopartículas Núcleo-Coraza

Después de comprobar la glicación de la albúmina con la fucosa, se sintetizaron nanopartículas

núcleo-coraza con núcleo de albúmina sérica cargado con rifaximina (BSA-RFX) y coraza fucosilada. Además, se sintetizaron nanopartículas con núcleo BSA-RFX y coraza sialilada, utilizando Muc-Sial como fuente de ácido siálico. La distribución de tamaño y carga superficial de dichas nanopartículas se determinó mediante DLS y los resultados se resumen en el Cuadro 4. Las nanopartículas de BSA (núcleo de BSA) presentaron un tamaño promedio de 168.6 ± 1.3 nm, mientras que en las nanopartículas de BSA-BSA-OFuc, BSA-Muc-Sial y BSA-BSA-Lac (control) cargadas con rifaximina, se observó un aumento de tamaño (Cuadro 4), que podría estar indicando la correcta incorporación de la coraza. De acuerdo con el índice de polidispersidad (0.08-0.09), todas las nanopartículas sintetizadas presentaron poblaciones monodispersas.

Cuadro 4. Distribución de tamaño y carga superficial de NPs BSA-OFuc, BSA-Muc-Sial y BSA-BSA-Lac

	Nanopartículas			
	BSA	BSA-BSA-Lac	BSA-BSA-OFuc	BSA-Muc-Sial
Tamaño medio (nm)	168.6 ± 1.3	230.9 ± 2.5	209.5 ± 1.9	235.9 ± 3.1
Potencial Z (mV)	-28.57 ± 0.36	-30.31 ± 0.81	-41.4 ± 0.86	-35.2 ± 4.6
PDI*	0.08	0.08	0.08	0.09

Los datos se muestran como el promedio \pm desviación estándar.

*PDI: Índice de polidispersidad

La carga superficial (Potencial Z) de las nanopartículas es un parámetro importante para la estabilidad de las partículas en soluciones coloidales (Nel *et al.*, 2009). En este estudio, todas las nanopartículas tuvieron un aumento en cargas negativas en comparación con las nanopartículas de BSA. Por lo que, el aumento de cargas negativas también es un indicio de la incorporación funcionalización de la coraza con neoglicanos y ácido siálico. Sin embargo, es importante realizar más estudios para determinar la presencia de fucosa y ácido siálico, así como un análisis de estabilidad en solución.

6.5.2 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Espectroscopia de Energía Dispersiva (EDS) las Nanopartículas Núcleo-Coraza

La Figura 20 presenta las micrografías de las nanopartículas núcleo (BSA) y las nanopartículas núcleo-coraza funcionalizadas con OFuc (Figura 20B) o con mucinas (Figura 20C). En todos los casos se observaron agregados que dificultaron la medición de las nanopartículas, posiblemente debido al recubrimiento de las nanopartículas con Au-Pd. Las nanopartículas BSA presentaron tamaños entre 85-100 nm; las BSA-BSA-OFuc entre 107 y 131 nm y las BSA-Muc-Sial entre 137 y 224 nm. Estos tamaños son menores que los obtenidos mediante la técnica de DLS, debido a que las muestras utilizadas para SEM se encontraban liofilizadas. No obstante, se conservó la diferencia entre las nanopartículas núcleo y las nanopartículas núcleo coraza.

El análisis composicional de las nanopartículas se realizó mediante espectroscopia de energía dispersiva. La Figura 21 muestra que los principales componentes de las nanopartículas fueron C, y O. En el caso de las nanopartículas BSA-BSA-OFuc se detectó la presencia de S, que pudiera estar siendo aportado por los grupos sulfato de los oligosacáridos de fucoïdan. Para el caso de las nanopartículas BSA-Muc-Sial se observó un ligero aumento en el contenido de N, debido posiblemente a la presencia de mucinas.

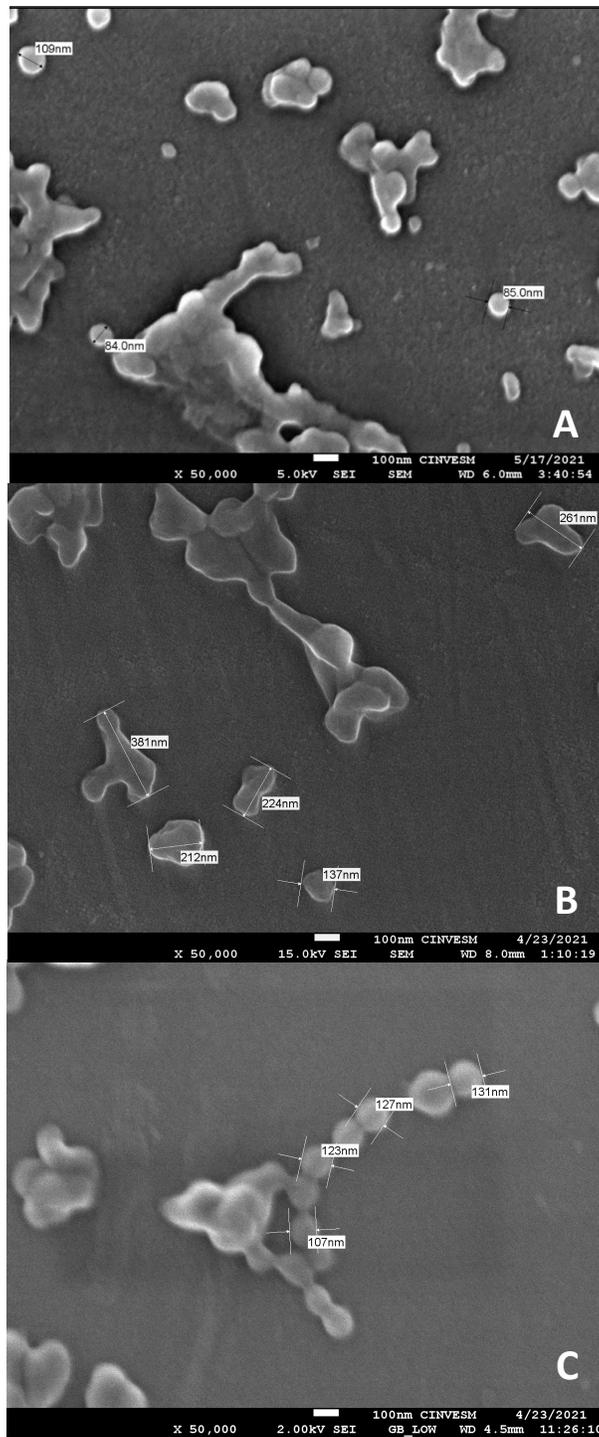


Figura 20. Micrografías de nanopartículas sintetizadas. A) núcleo (BSA); B) núcleo coraza BSA-BSA-OFuc y C) núcleo-coraza BSA-Muc-Sial.

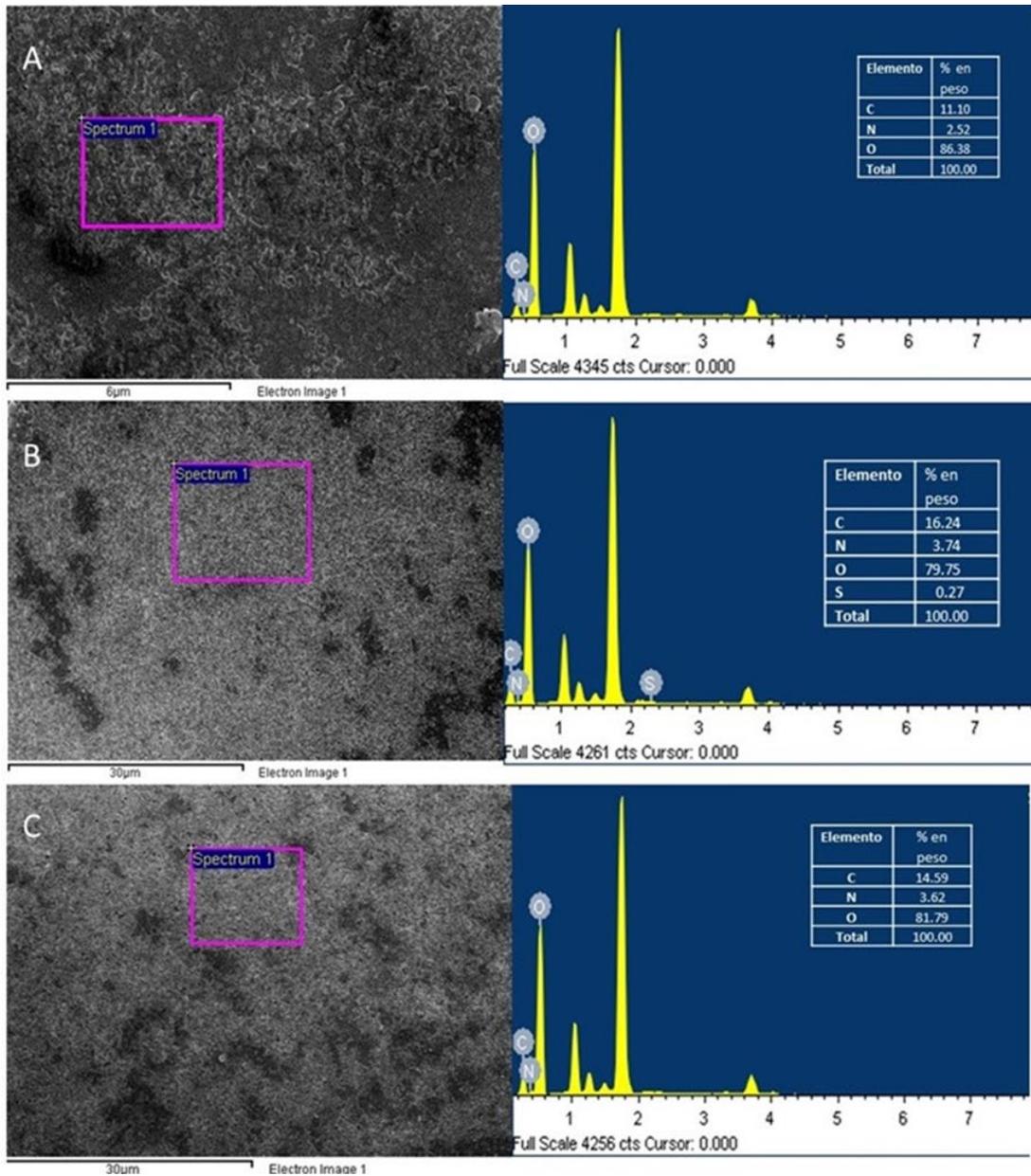


Figura 21. Análisis composicional por espectroscopia de energía dispersiva de las nanopartículas sintetizadas. A) núcleo (BSA); B) núcleo coraza BSA-BSA-OFuc y C) núcleo-coraza BSA-Muc-Sial.

6.6 Eficiencia de Encapsulamiento de Rifaximina

Muchas cepas de *C. jejuni* han adquirido resistencia a antibióticos comunes, por lo que el éxito en la terapia dirigida, además de la síntesis de nanopartículas y del biorreconocimiento, está en la

elección del medicamento transportado y dirigido para controlar la infección. En este estudio se decidió cargar a las nanopartículas núcleo-coraza con rifaximina, debido a que existe evidencia de baja resistencia de *C. jejuni* hacia este antibiótico (Novoa-Farias *et al.*, 2017). El porcentaje de rifaximina encapsulada en las nanopartículas núcleo de BSA sintetizadas (BSA-RFX) fue del 24.02 ± 0.20 . Esta cantidad fue baja comparada con la obtenida por Kumar *et al.* (2021) quienes obtuvieron eficiencias de encapsulamiento de 59, 92 y 98% al cargar nanopartículas sintetizadas con diferentes proporciones de quitosano-alginato de sodio, con rfx. Estas diferencias pueden deberse a la matriz utilizada, al método de obtención de las nanopartículas y al solvente utilizado (Kumar *et al.*, 2021).

6.7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de Rifaximina y Nanopartículas Cargadas con antibiótico para *Campylobacter jejuni*

Se estudió el efecto de nueve concentraciones de rifaximina libre sobre *C. jejuni*; las concentraciones evaluadas fueron 1, 2, 4, 8, 16, 31, 63, 125 y 250 $\mu\text{g/mL}$. La Figura 22 muestra las curvas de crecimiento de la bacteria a diferentes concentraciones. Con base en este comportamiento, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de rifaximina fue de 31 $\mu\text{g/mL}$. Este resultado concuerda con lo encontrado en otros estudios (Gomi *et al.*, 2001; Ouyang-Latimer *et al.*, 2011) que reportan la excelente actividad *in vitro* de la rifaximina contra diversas enterobacterias, incluyendo *Campylobacter spp.*, con una CMI de 32 $\mu\text{g/mL}$.

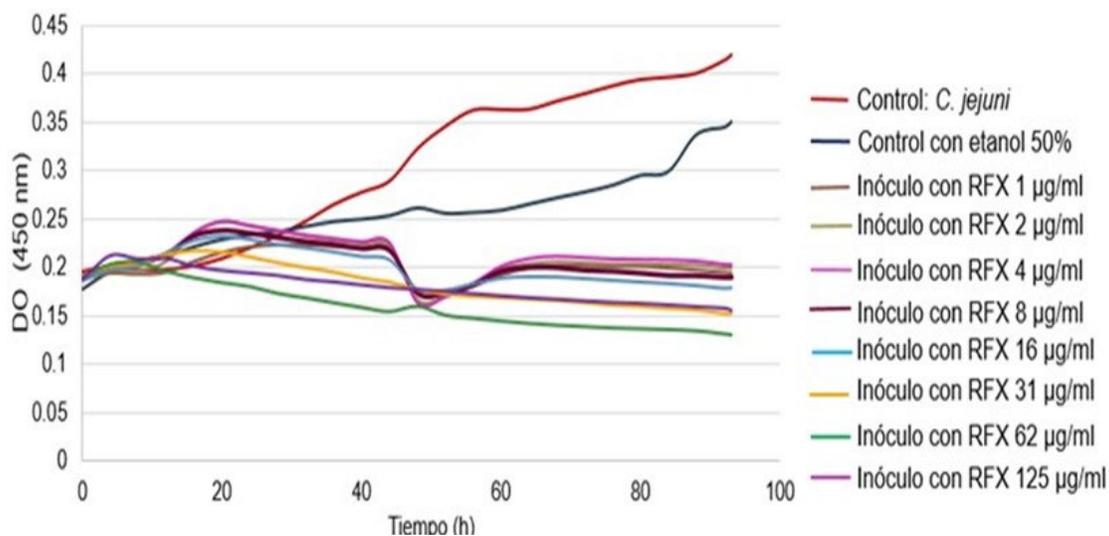


Figura 22. Concentración Mínima Inhibitoria de rifaximina contra *C. jejuni*.

Para observar el efecto bactericida de las nanopartículas cargadas con rfx, se evaluaron cinco concentraciones de 62 a 1000 µg/mL de nanopartículas BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial de manera individual. La concentración mínima inhibitoria para los dos tipos de nanopartículas, fue de 1 mg/mL (Figura 23). Basados en la CMI del fármaco libre y en la eficiencia de encapsulamiento, se esperaría una CMI de 133 µg/mL. Por lo que, probablemente la liberación del fármaco se vio afectada por una fuerte interacción química entre la BSA y la rifaximina. En el estudio realizado por Fonseca *et al.* (2017) se observó un retraso en la liberación del fármaco encapsulado en un núcleo de BSA, probablemente ocasionada por una interacción entre el fármaco y la BSA, así como por un posible endurecimiento de la red polimérica durante el proceso de reticulación. Sin embargo, en nuestro estudio, es necesario realizar cinéticas de liberación del fármaco y determinar la concentración mínima bactericida para obtener más información al respecto.

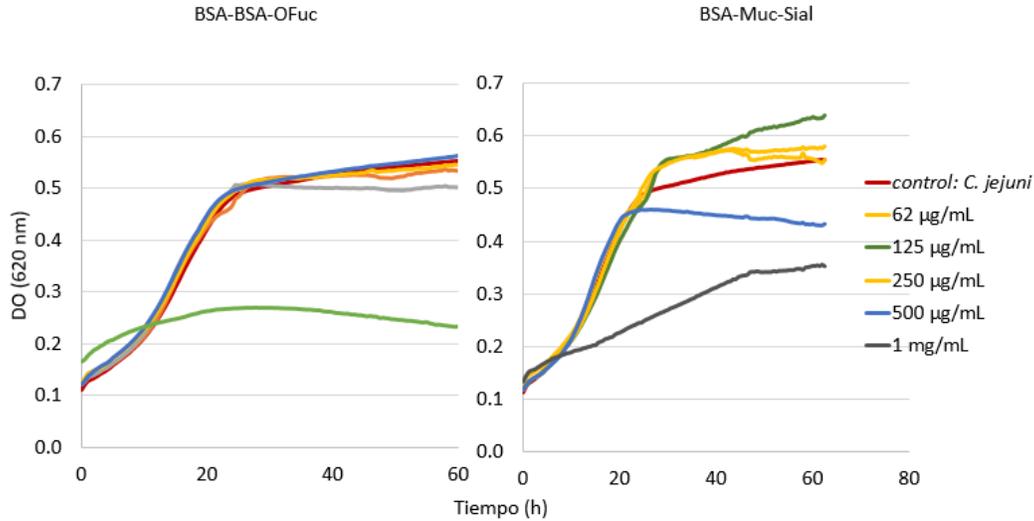


Figura 23. Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial cargadas con rifaximina.

6.8. Interacción de las Nanopartículas Núcleo-Coraza con las adhesinas de *Campylobacter jejuni*

Para comprobar el reconocimiento de las adhesinas de *C. jejuni* hacia las diferentes nanopartículas se realizó un ensayo de ELLA biotinilando a las nanopartículas núcleo y a las nps núcleo-coraza. Se probaron dos temperaturas de cultivo para *C. jejuni*, debido a la evidencia previa de una mayor expresión de adhesinas que se unen a ácido siálico, cuando el microorganismo se somete a 42 °C (Dasti *et al.*, 2010). La Figura 24 muestra los resultados obtenidos. Se observó que las nanopartículas núcleo, sintetizadas a partir de BSA fueron reconocidas por *C. jejuni*. Este comportamiento puede deberse a la presencia de pequeñas contaminaciones de la albúmina con alguna glicoproteína sérica. Tal sería el caso de la fibronectina plasmática. La unión de *C. jejuni* a fibronectina celular ha sido demostrada previamente (Konkel *et al.*, 2020). La fibronectina es una glicoproteína de 220 kDa que se presenta en su forma plasmática siendo sintetizada por los hepatocitos y secretada al torrente sanguíneo, la saliva y otros fluidos corporales, donde circula como un dímero compacto (To y Midwood, 2011). Además, existe la fibronectina celular sintetizada por varios tipos de células, como los fibroblastos y las células endoteliales, incorporándose a la matriz extracelular (Sottile y Hocking, 2002; To y Midwood, 2011). Estudios *in vitro* demuestran la unión de la fibronectina celular a las adhesinas CadF y FlpA de *C. jejuni* (Konkel *et al.*, 2020).

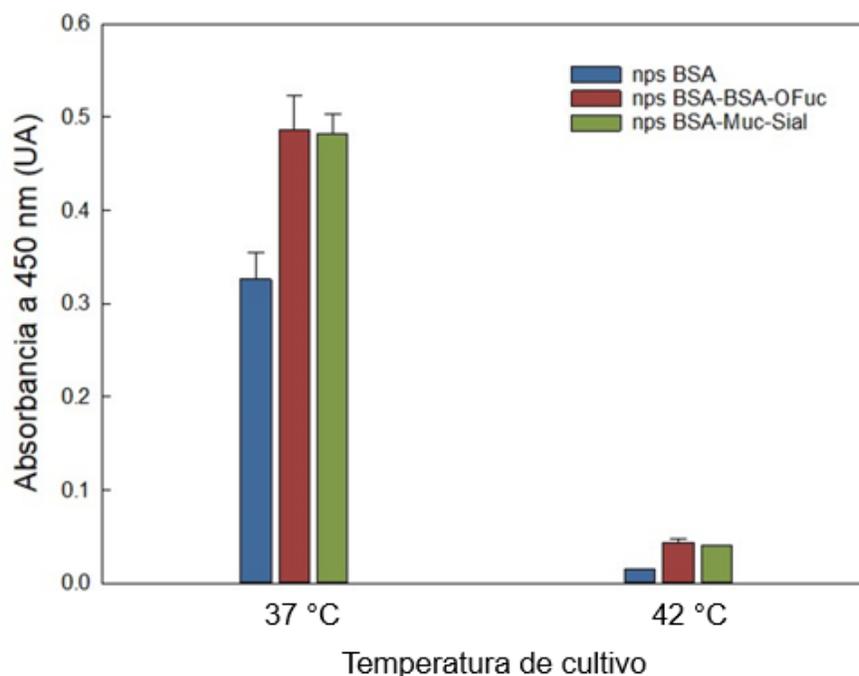


Figura 24. Biorreconocimiento de las nanopartículas BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial por *C. jejuni* en dos condiciones de crecimiento.

Por otro lado, la bacteria reconoció a las nanopartículas BSA-BSA-OFuc y BSA-Muc-Sial con mayor afinidad que a las nanopartículas núcleo (Figura 24), siendo este resultado una evidencia de que la bacteria reconoce las estructuras oligosacáridas de fucosa y los O-glicanos sialilados presentes en la mucina submaxilar bovina. Existe evidencia de que *C. jejuni* presenta reconocimiento tipo lectina, que puede estar asociado con la infección. Se ha demostrado que la adherencia de *C. jejuni* es inhibida por oligosacáridos fucosilados y sialilados (Schneider *et al.*, 2017). Varias investigaciones reportan la unión *in vitro* de *C. jejuni* a glicanos fucosilados y la reducción de la adhesión del patógeno a células intestinales, en presencia de fucosas (Cinco *et al.*, 1984; Ruiz-Palacios *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos en esta tesis contribuyen a dar soporte a las observaciones previas.

Los glicanos presentes en las mucinas desempeñan un papel importante en la inhibición de la adhesión de los patógenos a las células epiteliales. Puede decirse que las mucinas actúan como antagonistas glicomiméticos de los receptores celulares que reconoce la bacteria en los enterocitos. Existe evidencia de que los O-glicanos presentes en las mucinas son utilizados como ligandos para la adherencia de diversos patógenos bacterianos (Naughton *et al.*, 2013). Se ha demostrado que los

glicanos presentes en la mucina intestinal del pollo inhiben la invasión de las células HCT-8 por *C. jejuni* (Byrne *et al.*, 2007; Ruiz-Palacios *et al.*, 2003). Los estudios de McAuley *et al.* (2007) sugieren que existen al menos dos ligandos para las adhesinas de *C. jejuni* en las mucinas un oligosacárido sialilado y otro no sialilado que de acuerdo con Ruiz-Palacios *et al.* (2003) sería el antígeno fucosilado Lewis X. En este sentido es importante realizar estudios de inhibición de la adhesión en presencia de las nanopartículas BSA-Muc-Sial.

7. RESUMEN DE HALLAZGOS, CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

7.1. Resumen de Hallazgos

Los espectros FTIR-ATR de los OFuc > 1 kDa (reacción de Fenton a 100 °C/2 h) mostraron mayor similitud al espectro del fucoídano nativo y mayor rendimiento. La conjugación de éstos con BSA (BSA-OFuc), se confirmó con los cambios en la carga superficial, el patrón de migración electroforética y los espectros de infrarrojo.

Los BSA-OFuc fueron reconocidos con mayor afinidad por la lectina de *Anguilla anguilla* mientras que la mucina submaxilar bovina (Muc-Sial) fue reconocida con mayor afinidad por la lectina *Maackia amurensis*.

Las nanopartículas sintetizadas con núcleo de BSA-rifaximina y corazas BSA-OFuc y Muc-Sial presentaron una concentración mínima inhibitoria de 1mg/mL hacia *C. jejuni*, siendo reconocidas con mayor afinidad por la bacteria cultivada a 37 °C que a 42 °C, evidenciando una posible diferencia en la expresión de las adhesinas del patógeno.

7.2. Conclusión

Los oligosacáridos obtenidos a partir de fucoídano de *M. pyrifera* exitosamente conjugados con albúmina de suero bovino y utilizados para funcionalizar nanopartículas núcleo-coraza cargadas con rifaximina, son reconocidos por *C. jejuni*, lo mismo que las nanopartículas funcionalizadas con mucina submaxilar bovina. Ambas nanomatrices presentan potencial como vectores activos dirigidos hacia este patógeno.

7.3. Recomendaciones

- Realizar estudios de espectrometría de masas para mejorar la caracterización de los hidrolizados y neoglicanos.
- Optimizar la síntesis de nanopartículas núcleo-coraza para obtener un mayor rendimiento del proceso.
- Realizar la síntesis de nanopartículas cargadas con rifaximina con diferentes proporciones de núcleo:antibiótico para aumentar la eficiencia de encapsulamiento.
- Realizar ensayos de liberación del antibiótico encapsulado en el núcleo de albúmina, para complementar la información sobre su acción en el crecimiento de *C. jejuni*.

8. REFERENCIAS

- Abraham S.N., Sharon N., Ofek I. and Schwartzman J.D. Adhesion and colonization. 2015. Adhesion and colonization. Mol. Med. Microbiol.1:409-421
- Alzheimer M., Svensson S.L., König F., Scheweinlin M., Metzger M., Waller H. and Sharma C.M. 2020. A three-dimensional intestinal tissue model reveals factors and small regulatory RNAs important for colonization with *Campylobacter jejuni*. PLoS Pathog. 16(2):e1008304.
- Amábile-Cuevas, C.F. 2010. Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. Infect. Dev. Ctries. 4(3):126-131
- Backert S. and Hofreuter D. 2013. Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. J. Microbiol. Methods. 95(1):8-23.
- Baldus S.E., Thiele J., Park Y.O., Hanisch F.G., Bara J. y Fischer R. 1996. Characterization of the binding specificity of *Anguilla anguilla agglutinin* (AAA) in comparison to *Ulex europaeus agglutinin* I (UEA-I). GlycoconjJ, 13(4), 585-590.
- Beratto-Ramos A., Agurto-Muñoz C., Pablo Vargas-Montalba J., y Castillo R. 2020. Fourier-transform infrared imaging and multivariate analysis for direct identification of principal polysaccharides in brown seaweeds. Carbohydr. Polym. 230: 115561.
- Bhavanandan V. P., Gupta D., Woitach J., Guo X. y Jiang W. 1999. Molecular basis of the polydispersity of mucins: implications for the generation of saccharide diversity. Biosci. Rep. 19(3): 209-217.
- Bhunia A.K. 2018. Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis. Springer Science. Segunda edición. New York. 351.
- Boehm M., Hoy B., Rohde M., Tegtmeyer N., Bæk K. T., Oyarzabal O.A., Brøndsted L., Wessler S. y Backert S. 2012. Rapid paracellular transmigration of *Campylobacter jejuni* across polarized epithelial cells without affecting TER: role of proteolytic-active HtrA cleaving E-cadherin but not fibronectin. Gut pathog. 4(1):3.
- Bulitta J.B., Ly N.S., Landersdorfer C.B., Wanigaratne N.A., Velkov T., Yadav R., Oliver A., Martin L., Shin B.S., Forrest A., Tsuji B.T. (2015). Two mechanisms of killing of *Pseudomonas aeruginosa* by tobramycin assessed at multiple inocula via mechanism-based modeling. Antimicrob. Agents Chemother. 59(4):2315-27.
- Burnham P.M y Hendrixson D.R. 2018. *Campylobacter jejuni*: collective components promoting a successful enteric lifestyle. Nat. Rev. Microbiol. 16(9):551-565
- Bushnak I.A., Labeed F.H., Sear R.P., Keddie J.L. 2010. Adhesion of microorganisms to bovine submaxillary mucin coatings: effect of coating deposition conditions. Biofouling. 26(4):387-97.
- Byrne C. M., Clyne M. y Bourke B. 2007. *Campylobacter jejuni* adhere to and invade chicken intestinal epithelial cells in vitro. Microbiology, 153:561-569.

- Cárdenas-Perea y M.E., López O.R.C., Gándara-Ramírez J.L. y Pérez-Hernández M.A. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*. 94:35-43
- Cid H., Ortiz C., Pizarro J y Mirano-Piraján J. C. 2020. Effect of copper (ii) biosorption over light metal cation desorption in the surface of *Macrocystis pyrifera* biomass. *J. Environ. Chem. Eng.*. 8:103729.
- Cinco M., Banfi E., Ruaro E., Crevatin D. y Crotti D. 1984. Evidence for L-fucose (6-deoxy-L-galactopyranose)-mediated adherence of *Campylobacter spp.* to epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 21(3):347-351.
- Cruz-Hernández J. y Licea-Puig M.E. 2010. Glucosilación no enzimática y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev. Cuba Endoc.* 21(2):223-255
- Correa C.B.M., Kogawa A.C., Chorilli M. y Salgado HRN. 2019. Eco-friendly and miniaturized analytical method for quantification of rifaximin in tablets. *Drug Anal. Res.* 3(2):23-29.
- Dasti, J.I., Tareen, A.M., Lugert, R., Zautner, A.E., y Gross, U. 2010. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. *Int. J. Med. Microbiol.* 300(4):205-211.
- Davis B.D., Chen L.L., Tai P.C. (1986). Misread protein creates membrane channels: an essential step in the bactericidal action of aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83(16):6164-8.
- Day, C., Semchenko, E., & Korolik, V. (2012). Glycoconjugates Play a Key Role in *Campylobacter jejuni* Infection: Interactions between Host and Pathogen. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2. doi:10.3389/fcimb.2012.00009
- de Jesús Valle M.J., López-Díaz D., Velázquez-Salicio M. y Sánchez-Navarro A. 2016. Development and *in vitro* Evaluation of a Novel Drug Delivery System (Albumin Microspheres Containing Liposomes) Applied to Vancomycin. *J. Pharm. Sci.* 105(7):2180–2187.
- DuPont H.L. 2014. Acute Infectious Diarrhea in Immunocompetent Adults. *N. Engl. J. Med.* 370(16):1532–1540.
- EFSA .2014. European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food 2012 published. *Eurosurveillance* 12:3590.336.
- Eucker T.P. y Konkel M.E. 2012. The cooperative action of bacterial fibronectin-binding proteins and secreted proteins promote maximal *Campylobacter jejuni* invasion of host cells by stimulating membrane ruffling. *Cell Microbiol.* 14(2):226–238.
- Fonseca D.P., Khalil N.M. y Mainardes R.M. 2017. Bovine serum albumin-based nanoparticles containing resveratrol: characterization and antioxidant activity. *J. Drug Deliv. Sci.* 39:147-155.
- Foster M.A., Iqbal J., Zhang C., McHenry R., Cleveland B.E., Romero-Herazo Y., Fannesbeck C., Payne D.C., Chappell J.D., Halasa N. y Gómez-Duarte O.G. 2015. Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County, Tennessee. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83(3):319-324.
- Gomi H., Jian Z.D., Adachi J.A., Ashley D., Lowe B., Verenkar M.P., Steffen R., y DuPont H.L. 2001. *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Enteropathogens Causing Traveler’s Diarrhea in Four Geographic Regions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(1):212-6.

- Gustafsson A., Kacs Kovics I., Breimer M.E., Hammarson L. y Holgersson J. 2005. Carbohydrate phenotyping of human and animal milk glycoproteins. *Glycoconj. J.* 22:109-118.
- Giacomelli M., Salata C., Martini M., Montesissa C. y Piccirillo A. 2014. Antimicrobial resistance of *C. jejuni* and *C. coli* from poultry in Italy. *Microb. Drug. Resist.* 20:181-188.
- Guerry P., Ewing C.P., Schirm M., Lorenzo M., Kelly J., Pattarini D., Majam G., Thibault P. y Logan S. 2007. Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Mol. Microbiol.* 60:299–311.
- Gustafsson A., Kacs Kovics I., Breimer M.E., Hammarström L. y Holgersson J. 2005. Carbohydrate phenotyping of human and animal milk glycoproteins. *Glycoconj. J.* 22(3):109–118.
- Guo X., Ye X., Sun Y., Wu D., Wu N., Hu Y. y Chen S. 2014. Ultrasound effects on the degradation kinetics, structure, and antioxidant activity of sea cucumber fucoidan. *J. Agric. Food Chem.* 62(5):1088-95.
- Hartley-Tassell L.E., Day C.J., Semchenko E.A., Tram G., Calderon-Gomez L.I., Klipic Z., Barry A.M., Lam A.K., McGuckin M.A. y Korolik V. 2018. A peculiar case of *Campylobacter jejuni* attenuated aspartate chemosensory mutant, able to cause pathology and inflammation in avian and murine model animals. *Sci. Rep.* 8(1):12594.
- Hermans D., Van D.K., Martel A., Van I.F., Messens W., Heyndrickx M., Haesebrouck F. y Pasmans F. 2011. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Vet. Res.* 42:82.
- Hernández-Cortez C., Aguilera-Arreola M.G., y Castro-Escarpulli G. 2011. Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enf. Inf. Microbiol.* 31(4):137-151.
- Hoepers P.G., Medina G., Rossi D.A. y Fernandez, H. 2016. About *Campylobacter spp.* En B. B. Fonseca, H. Fernandez, y D. A. Rossi (Eds.). *Campylobacter spp. and Related Organisms in Poultry: Pathogen-Host Interactions, Diagnosis and Epidemiology.* Cham: Springer International Publishing. New York, 1-18.
- Hou Y., Wang J., Jin W., Zhang H. and Zhang Q. 2012. Degradation of *Laminaria japonica* fucoidan by hydrogen peroxide and antioxidant activities of the degradation products of different molecular weights. *Carbohydr. Polym.* 87:153-159.
- Hurtado R.A. y Arancibia F.L. 2010. Enfermedades diarreicas agudas, consejos, tratamiento y prevención. Universidad, Ciencia y Sociedad. 1:53.
- Imberty A., Gautier C., Lescar J., Pérez, S. Wyns, L., y Loris, R. 2000. An Unusual Carbohydrate Binding Site Revealed by the Structures of Two *Maackia amurensis* Lectins Complexed with Sialic Acid-containing Oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 275(23): 17541-17548
- Instituto Mexicano del Seguro Social. 2019. Gastroenteritis, tercera causa de urgencias médicas en el IMSS. Recuperado de <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201903/061>.
- Jackson B.R., Zegarra J.A., López-Gatell H., Sejvar J., Arzate F., Waterman S., Núñez A. S., López B., Weiss J., Cruz R.Q., Murrieta D.Y., Luna-Gierke R., Heiman K., Vieira A.R., Fitzgerald C., Kwan P., Zárate-Bermúdez M., Talkington D., Hill V.R., Mahon B. y GBS Outbreak Investigation Team. 2014. Binational outbreak of Guillain–Barré syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection, México and USA, 2011. *Epidemiol. Infect.* 142(5):1089-1099.

- Jo B.Y. y Choi S-Y. 2014. Degradation of fucoidans from *Sargassum fulvellum* and their biological activities. *Carbohydr. Polym.* 1111:822-829.
- Karbasi M. y Maldadlou A. 2018. Interface-related attributes of the Maillard reaction-born glycoproteins. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 58(10):1595-1603.
- Kaku H., Kaneko H., Minamihara N., Iwata K., Jordan E.T., Rojo M. A., . . . Shibuya N. 2007. Elderberry bark lectins evolved to recognize Neu5Ac alpha2,6Gal/GalNAc sequence from a Gal/GalNAc binding lectin through the substitution of amino-acid residues critical for the binding to sialic acid. *J. Biochem.* 142(3):393-401.
- Kim D-Y. y Shin W-S. 2015. Characterisation of bovine serum albumin–fucoidan conjugates prepared via the Maillard reaction. *Food Chem.* 173:1-6.
- Kim J., Lee J., Jang Y., Ha J., Kim D., Ji M., . . . Kim H.H. 2019. N-glycans of bovine submaxillary mucin contain core-fucosylated and sulfated glycans but not sialylated glycans. *Int. J. Biol. Macromol.* 138:1072-1078.
- Kim J., Ryu C., Ha J., Lee J., Kim D., Ji M., . . . Kim H. H. 2020. Structural and Quantitative Characterization of Mucin-Type O-Glycans and the Identification of O-Glycosylation Sites in Bovine Submaxillary Mucin. *Biomolecules.* 10(4).
- Kim J., Lee B., Lee J., Ji M., Park C.S., Lee J., Kang M., Kim J., Jin M., Kim H.H. 2021. N-Glycan modifications with negative charge in a natural polymer mucin from bovine submaxillary glands, and their structural role. *Polymers.* 13(1):103.
- Konkel, M.E., Talukdar, P.K., Negretti, N.M. y Klappenbach, C.M. 2020. Taking Control: *Campylobacter jejuni* Binding to Fibronectin Sets the Stage for Cellular Adherence and Invasion. *Front. Microbiol.*, 11(564).
- Kumar D., Kumar S., Kumar S., Rohatgi S. y Kundu P.P. 2021. Synthesis of rifaximin loaded chitosan-alginate core-shell nanoparticles (Rif@CS/Alg-NPs) for antibacterial applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 183:962-971.
- Ledesma-Osuna A.I., Ramos-Clamont G. y Vazquez-Moreno L. 2008. Characterization of bovine serum albumin glycosylated with glucose, galactose and lactose. *Acta. Biochim. Pol.* 55(3):491-497.
- Lewis S.P., Lewis A.T., Lewis P.D. 2013. Prediction of glycoprotein secondary structure using ATR-FTIR. *Vib. Spectrosc.* 69:21-29.
- Liechty W.B., Kryscio D.R., Slaughter B.V., Peppas N.A. (2010) Polymers for drug delivery systems. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering.* 1:149-173.
- Llópiz A. 2016. Compuestos bioactivos aislados de cianobacterias y microalgas: propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Bionatura.* 1(2):79-87.
- Ma G. 2014. Microencapsulation of protein drugs for drug delivery: Strategy, preparation, and applications. *J. Control. Release.* 193:324-340
- Makarovsky D., Fadeev L., Salam B.B., Zelinger E., Matan O., Inbar J., Jurkevitch E., Gozin M. y Burdman S. 2018. Silver Nanoparticles Complexed with Bovine Submaxillary Mucin Possess Strong Antibacterial Activity and Protect against Seedling Infection. 84: e02212-17.
- Marshall B.M y Levy S.B. 2011. Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin.*

Microbiol. Rev. 24:718-733.

- McAuley J.L., Linden S.K., Png C. W., King R.M., Pennington H.L., Gendler S.J., . . . McGuckin M. A. (2007). MUC1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Investig.* 117(8):2313-2324.
- McGuckin M.A., Lindén S.K., Sutton P. y Florin T.H. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nat. Rev.* 9:265-275.
- Meylan E., Tschopp J. y Karin M. 2006. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature.* 7098:39-44.
- Miller J.G. y Fry S.C. 2001. Characteristics of xyloglucan after attack by hydroxyl radicals. *Carbohydr. Res.* 332:389-403
- Moore R.A., Bates N.C., Hancock R.E. (1986). Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29(3):496-500.
- Naughton J.A., Mariño K., Dolan B., Reid C., Gough R., Gallagher M E., . . . Clyne M. 2013. Divergent mechanisms of interaction of *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni* with mucus and mucins. *Infection and immunity*, 81(8), 2838-2850.
- Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M.V., Somasundaran P., Castranova V. y Thompson M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat. Mater.* 8(7):543-557.
- Novoa-Farias O., Frati-Munari A.C., Peredo M.A., Flores-Juárez S., Novoa-García O., Galicia-Tapia J. y Romero-Carpio C.E. 2017. Susceptibilidad a la rifaximina y otros antimicrobianos de bacterias aisladas en pacientes con infecciones gastrointestinales agudas en el sureste de México. *Rev. Gastroenterol. Méx.* 82(3):233.
- Ó Cróinín T. y Backert S. 2012. Host epithelial cell invasion by *Campylobacter jejuni*: trigger or zipper mechanism?. *Front. Cell Infect. Microbiol.* (2):25.
- Oliveira I.R., Bessler H.C., Bao S.N., Lima R. y Giugliano L.G. 2007. Inhibition of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesion to Caco-2 cells by human milk and its immunoglobulin and non-immunoglobulin fractions. *Braz. J. Microbiol.* 38:86-92.
- Organización Mundial de la Salud. 2013. The global view of campylobacteriosis: report of expert consultation. Utrecht, Netherlands 9-11 July 2012. WHO Report 2013:57.
- Organización Mundial de la Salud. 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Obtenido de la página web: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/surveillancereport/en/>
- Organización Mundial de la Salud. 2017. Enfermedades diarreicas. Obtenido de la página web: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- Ouyang-Latimer J., Jafri S., VanTassel A., Jiang Z.D., Gurleen K., Rodriguez S., Nandy R.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., McKenzie R., Steffen R. y DuPont H.L. 2011. *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility of Bacterial Enteropathogens Isolated from International Travelers to Mexico, Guatemala, and India from 2006 to 2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(2):874-878

- 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.
- Ramos-Clamont Montfort G. 2018. Síntesis y evaluación de antagonistas glicomiméticos para *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* enteropatógena, utilizando glicanos extraídos de algas marinas. Solicitud: 00000000288346. Convocatoria Ciencia Básica 2017-2019.
- Ruiz-Palacios G.M., Cervantes L.E., Ramos P., Chavez-Munguia, B. y Newburg, D. S. 2003. *Campylobacter jejuni* binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection. *J. Biol. Chem.* 278(16): 14112–14120.
- Sandberg T., Blom H. y Caldwell K.D. 2008. Potential use of mucins as biomaterial coatings. I. Fractionation, characterization, and model adsorption of bovine, porcine, and human mucins. *J Biomed Mater Res A*. 91(3):762-672.
- Sandoval Larios G. 2020. Síntesis y evaluación de nanomatrices de neoglicanos de fucoidan como antagonistas glicomiméticos para *Campylobacter jejuni* (tesis de maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Sonora, México.
- Sarabia-Sainz A-I., Ramos-Clamont G., Candia-Plata M.M.D. y Vazquez-Moreno L. 2009. Biorecognition of *Escherichia coli* K88 adhesin for glycosylated porcine albumin. *Int. J. Biol. Macromol.* 44(2):175-181.
- Sarabia-Sainz A-I., Ramos-Clamont G., Winzerling J. y Vázquez-Moreno L. 2011. Bacterial recognition of thermal glycation products derived from porcine serum albumin with lactose. *Acta. Biochim. Pol.* 58:95–100.
- Sarabia-Sainz A-I., Ramos-Clamont Montfort G., Lizardi-Mendoza J., Sánchez-Saavedra M., Candia-Plata M., Guzman R., Lucero-Acuña A. y Vázquez-Moreno L. 2012. Formulation and characterization of gentamicin-loaded albumin microspheres as a potential drug carrier for the treatment of *E. coli* K88 infections. *Int. J. Drug Deliv.* 4(2):209-218.
- Sarabia-Sainz H.M., Armenta-Ruiz C., Sarabia-Sainz A-I., Guzmán-Partida A.M., Ledesma-Osuna A.I., Vázquez-Moreno L. y Ramos-Clamont Montfort G. 2013. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to neoglycans synthesized with prebiotic galactooligosaccharides. *Food Chem.* 141:2727–2734.
- Schneider M., Al-Shareffi E. y Haltiwanger R. S. 2017. Biological functions of fucose in mammals. *Glycobiology*. 27(7):601-618.
- Secretaria de salud. 2019a. Boletín epidemiológico. 52(36):21
- Secretaria de Salud. 2019b. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad por causas sujetas a vigilancia epidemiológica en México, 2017. Disponible en https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/498153/ANUARIO_MORTALIDAD_2017.pdf con acceso el 2 de abril del 2020.
- Serio A.W., Keepers T., Andrews L., Krause K.M. (2018). Aminoglycoside Revival: Review of a Historically Important Class of Antimicrobials Undergoing Rejuvenation. *EcoSal Plus*. Nov;8(1).
- Shekhar H.S.S., Lyons G., McRoberts C., McCallD., Andrews F. y McCormack R. 2011. Brown

seaweed species from Strangford Lough: compositional analyses of seaweed species and biostimulant formulations by rapid instrumental methods. *J Appl Phycol.* 24:1141-1157.

- Skriptsova, A.V. 2015. Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russ. J. Mar. Biol.* 41(3):145-156.
- Solanki V., Tiwari M. y Tiwari V. 2018. Host-bacteria interaction and adhesin study for development of therapeutics. *Int. J. Biol. Macromol.* 112:54–64.
- Sottile J. y Hocking D.C. 2002. Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. *Mol. Biol. Cell.* 13(10):3546-3559.
- Synytsya A., Kim W-J., Kim S-M., Pohl R., Synytsya A., Kvasnička F., Copícová J. y Park Y.I. 2010. Structure and antitumour activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydr. Polym.* 81:41-48.
- Ponce N.M.A. y Stortz C.A. 2020. A Comprehensive and Comparative Analysis of the Fucoidan Compositional Data Across the Phaeophyceae. *Front. Plant Sci.* 11(1844).
- Taber H.W., Mueller J.P., Miller P.F., Arrow A.S. (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Rev.* 51(4):439-57.
- Tang B., Qian Y., Gou Y., Cheng G. y Fang G. 2018. VE-Albumin Core-Shell Nanoparticles for Paclitaxel Delivery to Treat MDR Breast Cancer. *Molecules.* 23(11):2760.
- Teran-Saavedra N.G., Sarabia-Sainz J.A., Velázquez-Contreras E.F., Ramos-Clamont Montfort G.R., Pedroza-Montero M. y Vazquez-Moreno L. 2020. Albumin-Albumin/Lactosylated Core-Shell Nanoparticles: Therapy to Treat Hepatocellular Carcinoma for Controlled Delivery of Doxorubicin. *Molecules.* 25(22):5432.
- Tiralongo J. y Moran A.P. 2009. Bacterial lectin-like interactions in cell recognition and adhesion. *Microbial. Glycobiology.* 551-565
- To W.S., y Midwood K.S. 2011. Plasma and cellular fibronectin: distinct and independent functions during tissue repair. *Fibrogenesis Tissue Repair,* 4:21.
- van der Meel R., Vehmeijer L.J., Kok R.J., Storm G. y van Gaal E.V. 2013. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 65(10):1284–1298.
- Vegge C.S., Brondsted L., Li Y.P., Bang D.D. y Ingmer H. 2009. Energy taxis drives *Campylobacter jejuni* toward the most favorable conditions for growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5308–5314.
- Velásquez J.G., Canovas S., Barajas P., Marcos J., Jiménez-Movilla M., Gallejo R., Balletas J., Avilés M. y Coy P. 2007. Role of Sialic Acid in Bovine Sperm–Zona Pellucida Binding. *Mol. Reprod. Dev.* 74:617-628.
- Vhora I., Patil S., Bhatt P., Gandhi R., Baradia D. y Misra A. 2014. Receptor-targeted drug delivery: current perspective and challenges. *Ther. Deliv.* 5(9):1007–1024.
- Wilhelmi I., Roman E. y Sanchez-Fauquier A. 2003. Viruses causing gastroenteritis. *Clin. Microbiol. Infect.* 9(4):247–262.
- Wu A.M., Wu J.H., Singh T., Liu J. H. y Herp A. 2004. Lectinochemical studies on the affinity of *Anguilla anguilla agglutinin* for mammalian glycotopes. *Life Sci,* 75(9):1085-1103.

- Yalda-Lucero A. 2014. Etiología y manejo de la gastroenteritis aguda infecciosa en niños y adultos. *Rev. Méd. Clín. Las Condes*. 25(3):463-472.
- Yang G., Liu Y., Wang H., Wilson R., Hui Y., Yu A., Wibowo D., Zhang C., Whittaker A., Middelberg A. y Zhao C. 2019. Bioinspired Core-Shell Nanoparticles for Hydrophobic Drug Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 58(40):14357-14364.
- Young K.T., Davis L.M., y Dirita V.J. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 5(9):665–679.
- Zayed A y Ulber R. 2020. Fucoidans: Downstream Processes and Recent Applications. *Mar. Drugs*. 18(3):170.
- Zhao T., Zhang Q., Qi H., Zhang H., Niu X., Xu Z. y Li Z. 2006. Degradation of porphyrin from *Porphyra haitanensis* and the antioxidant activities of the degraded porphyrins with different molecular weight. *Int. J. Biol. Macromol.* 38:45-50.
- Zou P., Yang X., Yuan Y., Jing C., Cao J., Wang Y., Zhang L., Zhang C. y Li Y. 2021. Purification and characterization of a fucoidan from the brown algae *Macrocystis pyrifera* and the activity of enhancing salt-stress tolerance of wheat seedlings. *Int. J. Biol. Macromol.* 180:547-558.