Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), julio-agosto 2024,
Volumen 8, Número 4.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i4

# DETERMINACIÓN DE POLIAMINAS EN DEBARYOMYCES HANSENII INHIBIDA QUÍMICAMENTE EN SU ACTIVIDAD ORNITINA DESCARBOXILASA

## POLYAMINES DETERMINATION IN DEBARYOMYCES HANSENII WITH CHEMICALLY INHIBITED ORNITHINE DECARBOXYLASE ACTIVITY

**Dariel Tovar Ramírez**
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México

**Laura Teresa Guzmán Villanueva**
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México

**Andressa Teles**
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México

**Norma Angélica Estrada Muñoz**
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, México

**DOI:** https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i4.13389

# Determinación de Poliaminas en Debaryomyces Hansenii Inhibida Químicamente en su Actividad Ornitina Descarboxilasa

**Dariel Tovar Ramírez**[1]
dtovar04@cibnor.mx
https://orcid.org/0000-0003-1204-9576
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)
México

**Laura Teresa Guzmán Villanueva**
lguzman@cibnor.mx
https://orcid.org/0000-0002-9911-5291
Programa Investigadores por México (IxM) CONAHCYT (Consejo Nacional de Ciencia, Humanidades y Tecnología)
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)
Unidad Guerrero Negro, Baja California Sur
México

**Andressa Teles**
andteles84@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-8453-6050
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR)
México

**Norma Angélica Estrada Muñoz**
nestrada@cibnor.mx
https://orcid.org/0000-0003-4254-9627
Programa Investigadores por México (IxM) CONAHCYT (Consejo Nacional de Ciencia, Humanidades y Tecnología) y Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Baja California Sur
México

**RESUMEN**

El uso de inhibidores de ornitina descarboxilasa (ODC) es útil para estudiar a las poliaminas, pues es una enzima clave en su biosíntesis. Las poliaminas en algunas especies han mostrado efectos positivos sobre el desarrollo digestivo y crecimiento. Nuestro estudio evaluó las concentraciones de poliaminas en la levadura *Debaryomyces hansenii*, utilizada como probiótico en acuicultura, comparando la actividad normal de la ornitina descarboxilasa (ODC+) y la actividad inhibida químicamente (ODC-) por DL-2-difluorometilornitina (DFMO). Las poliaminas cuantificadas mediante HPLC fueron putrescina (put), espermina (spm) y espermidina (spd). Los resultados no mostraron cambios significativos en las concentraciones de spm y spd entre grupos. Sin embargo, la concentración de put en ODC- (2.04E-08 ± 3.45E-08 ng/mL) mostró un decremento significativo en relación a ODC+ (0.0010 ± 0.0017 ng/mL), lo cual puede deberse al uso de rutas alternas de biosíntesis que utiliza *D. hansenii* para producir esta molécula. En conclusión, la inhibición de ODC por DFMO en *D. hansenii* no afecta la producción de spm y spd, pero sí reduce significativamente la síntesis de put. Estos hallazgos subrayan el potencial de las poliaminas, especialmente de la put, para incrementar el crecimiento y mejorar el desarrollo del sistema digestivo en larvas y adultos de peces.

***Palabras clave:*** debaryomyces hansenii, poliamidas, ornitina descarboxilasa, inhibidor DFMO

[1] Autor principal
Correspondencia: lguzman@cibnor.mx

# Polyamines Determination in Debaryomyces Hansenii with Chemically Inhibited Ornithine Decarboxylase Activity


## ABSTRACT

The use of ornithine decarboxylase (ODC) inhibitors is helpful for studying polyamines, as it is a crucial enzyme in their biosynthesis. Polyamines in some species have shown positive effects on digestive development and growth. Our study evaluated concentrations of polyamines in the yeast *Debaryomyces hansenii*, used as a probiotic in aquaculture, comparing the normal activity of ornithine decarboxylase (ODC+) and the chemically inhibited activity (ODC-) by DL-2-difluoromethylornithine (DFMO). Polyamines quantified by HPLC were putrescine (put), spermine (spm) and spermidine (spd). Results showed no significant changes in spm and spd concentrations between the groups. However, the put concentration in ODC- (2.04E-08 ± 3.45E-08 ng/mL) showed a significant decrease compared to ODC+ (0.0010 ± 0.0017 ng/mL), which may be due to the synthesis routes used by *D. hansenii* to produce this molecule. In conclusion, inhibition of ODC by DFMO in *D. hansenii* does not affect spm and spd production but significantly reduces put synthesis. These findings remark the potential of polyamines, especially put, to increase growth and improve the development of the digestive system in fish larvae and adults.



***Keywords*:** debaryomyces hansenii, polyamines, ornithine decarboxylase, DFMO inhibitor

*Artículo recibido 10 julio 2024*
*Aceptado para publicación: 15 agosto 2024*

## INTRODUCCIÓN

El uso de probióticos ha experimentado un notable aumento en los últimos años con el fin de mejorar tanto los rendimientos como la calidad de los cultivos larvarios de peces (Balcázar *et al*., 2006). Una cepa destacada en este ámbito es *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 (*D. hansenii*), reconocida como un probiótico efectivo para animales acuáticos (Angulo *et al*., 2020). Diversos estudios han demostrado su impacto en la maduración del tracto digestivo (Guzman-Villanueva, 2008; Teles *et al*., 2022), el crecimiento (Tovar-Ramírez *et al*., 2004b) y sus propiedades inmunoestimulantes (Angulo *et al*., 2020; Guzman-Villanueva, 2014a). Además, posee efectos prebióticos debido a los componentes de su pared celular, principalmente glucanos y quitina, los cuales sirven como sustratos idóneos para la fermentación por parte de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta (Guzman-Villanueva *et al*., 2014; Phillips, 2018).

Por otra parte, esta levadura secreta poliaminas como la putrescina (put), espermidina (spd), y espermina (spm) (Tovar *et al*., 2004a), las cuales son cationes orgánicos (aminas alifáticas) fundamentales para el crecimiento y la diferenciación celular; además, están involucradas en diversos procesos moleculares, como la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Phillips, 2018). La biosíntesis de poliaminas está regulada por la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) EC 4.1.1.17 (Rodríguez-Páez *et al*., 1991; Campos-Gongora *et al*., 2018), sin embargo, existen pocos estudios sobre su uso en organismos de importancia acuícola.

La comprensión del papel fisiológico de las poliaminas se ha facilitado por el desarrollo de inhibidores potentes y específicos de la ODC, lo que ha abierto nuevas oportunidades de investigación como es su efecto al ser administradas a través de la dietas. Entre estos inhibidores irreversibles, destaca el DFMO (DL-2-difluorometilornitina), el cual ha sido empleado para explorar mecanismos relacionados con la regulación de los niveles de poliaminas y las enzimas implicadas en su metabolismo (Pegg, 1986; Raul, 2007).

Dentro de los inhibidores irreversibles, DFMO es uno de los más efectivos para inhibir a la ODC, por lo que su uso puede ayudar a conocer cuál es la ruta metabólica que es afectada en la síntesis de estas poliaminas (Rodríguez-Páez *et al*., 1991), especialmente en *D. hansenii* donde la información es escasa.

Aunque el papel de las poliaminas en la dieta de mamíferos ha sido objeto de estudios, la literatura sobre sus efectos en larvas de peces es insuficiente. Tovar-Ramírez *et al*., (2002) sugirieron que la secreción de spm y spd por *D. hansenii* mejoraban la maduración del tracto digestivo en larvas de *Dicentrarchus labrax*. Por otro lado, Teles *et al*., (2022) indicaron que las poliaminas provenientes de esta levadura podrían modular el desarrollo y la diferenciación larvaria al mejorar la expresión de proteína morfogénica ósea y del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA), así como aumentar la supervivencia de *Seriola rivoliana* pero no cuantifica las poliaminas presentes en *D.hansenii*.

Aunque existen diferentes reportes del uso de *D. hansenii* como probiótico en acuacultura, es difícil evaluar individualmente los procesos biológicos que involucra la presencia de las poliaminas en larvas de peces por lo que este trabajo propone la inhibición irreversible de la actividad ODC por DFMO para conocer los cambios en la síntesis de poliaminas y en experimentos futuros poder determinar si estas moléculas se pueden relacionar directamente al crecimiento y desarrollo larval.

## METODOLOGÍA

### Diseño experimental

Se evaluó la cinética de crecimiento y la síntesis de poliaminas en: (1) la levadura *D. hansenii* silvestre con actividad ornitina descarboxilasa normal como grupo control (ODC+) y (2) *D. hansenii* con actividad ornitina descarboxilasa químicamente inhibida por DFMO (ODC-). La inhibición química de la levadura se llevó a cabo siguiendo la metodología de Pegg (1986), utilizando DFMO al 2%, el cual actúa como un inhibidor químico e irreversible de la enzima ODC, encargada de la biosíntesis de poliaminas.

Cultivo de la levadura *Debaryomyces hansenii* y cinética de crecimiento

Para realizar la cinética de crecimiento *D. hansenii* ODC+ y ODC-, las levaduras fueron cultivadas en agar peptona dextrosa (YPD) con una composición de 2% de glucosa, 1% de peptona, 0.5% de extracto de levadura y 2% de agar según Sherman (1991) a 30 ºC durante 24 h. Posteriormente fue recolectada y suspendida en 25 mL, incubada 30 ºC durante 24 h y en agitación constante a 200 rpm.

El crecimiento de la levadura se monitoreó, midiendo el aumento de la densidad óptica (OD) a 550 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU® 640 durante un período de 24 h, hasta alcanzar la fase estacionaria temprana. Se tomaron alícuotas de tres mL cada cuatro h, las cuales fueron utilizadas

inmediatamente para cuantificar las poliaminas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase reversa. Para cada tratamiento se llevaron a cabo seis réplicas.

**Preparación de muestras para la extracción de poliamidas**

Se recolectó el pellet de levadura ODC+ y ODC-, se lavó y se resuspendió en 0.8 mL de ácido perclórico ($HClO_4$) 0.2 M. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a tres rondas de sonicación (10 s cada una, con intervalos en baño de hielo) al 100% de potencia (aproximadamente 12 voltios/pin; SonicMan™, Matrical, Inc., Spokane, WA, EE. UU.), las levaduras lisadas fueron centrifugadas a 3000 g durante 10 min a 4 °C utilizando una centrífuga BECKMAN GPR. Los sobrenadantes resultantes se neutralizaron con una solución saturada de carbonato de sodio 3 M. Estas muestras fueron utilizadas para cuantificar las poliaminas put, spd y spm por HPLC.

**Cuantificación de poliamidas mediante HPLC**

**Reactivos y estándares**

Los reactivos utilizados fueron cloruro de dansilo (cloruro de 5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilo, Fluka Biochemika, Suiza), ácido tricloroacético (99%, Fluka Biochemika, Suiza), acetonitrilo (ACN) de calidad HPLC, ácido perclórico (J. T. Baker, EE. UU.), carbonato de calcio, ácido acético, carbonato de sodio, agua de calidad HPLC y tolueno (99%, SIGMA, EE. UU.). Los estándares de aminas biogénicas fueron diclorhidrato de putrescina, triclorhidrato de espermidina, tetraclorhidrato de espermina y diclorhidrato de diaminopropano [diam; D2 (380-7)] como estándar interno, se disolvieron por separado en agua de calidad HPLC, alcanzando una concentración final de base libre de 8 mg $mL^{1}$. Estos estándares fueron adquiridos en Sigma Aldrich, EE. UU., bajo las referencias P 7505, S 0381, S 2876 para las aminas biogénicas y P0380 para L-prolina (99%).

**Determinación de poliamidas**

Se cuantificaron las poliaminas put, spd y spm de *D. hansenii* (ODC+) y en presencia del inhibidor DFMO (ODC-) en su fase exponencial mediante HPLC según el protocolo descrito por Mallé *et al*. (1996), con modificaciones de acuerdo con Guzmán-Villanueva (2008). Para ello, se utilizó un sistema de HPLC Waters modelo 2695 con detector de matriz de diodos (modelo 2996). La excitación de fluorescencia se estableció a 333 nm y la emisión a 390 nm. Se emplearon columnas LC-18-DB (150 X 5 mm, diámetro de partícula 5 µm; Supelcosil™ SIGMA-ALDRICH).

La separación de las poliaminas después de la derivatización del cloruro de dansilo se realizó mediante elución en gradiente $H_2O$/ACN (tiempo 0-22 min: $H_2O$ 40-0%, ACN 60-100%) a 25.0±2.0 °C y un flujo de 1 mL $min^{-1}$. Para la derivatización, se tomaron 100 µL del sobrenadante resultante de cada muestra (preparado según el procedimiento de extracción de poliaminas), las células fueron resuspendidas en 20 µL de diaminopropano como estándar interno. A continuación, se añadieron 200 µL de $CaCO_3$ saturado y 400 µL de solución de cloruro de dansilo 0.027 M, se mezclaron e incubaron en baño de agua a 60 °C durante 20 min. Posteriormente, se agregaron 100 µL de solución de L-prolina 0.08 M, se agitó y se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad. En seguida, se añadieron 500 µL de tolueno, se homogeneizó la mezcla y se dejó reposar durante 2 min a 25 °C. La fase orgánica se recuperó y se evaporó bajo corriente de nitrógeno. El producto (gránulo) se resuspendió en 200 µL de ACN, se filtró mediante una membrana Acrodisc (VWR) con un tamaño de poro de 0,.2 µm y se inyectaron alícuotas de 30 µL de cada muestra en el sistema de HPLC.

Las poliaminas resultantes fueron cuantificadas mediante un detector de fluorescencia (modelo 420-AC, Waters, Milford, MA) y la absorbancia de las poliaminas derivadas se midió a 254 nm. Previamente, se prepararon curvas de los patrones utilizando put (99% de pureza), spd (98% de pureza) y spm (95% de pureza) a concentraciones de 2.5, 5, 10 y 20 $ng^{-1}$ $\mu L^{-1}$, utilizando diaminopropano como estándar interno. Los resultados se expresan en mg $Kg^{-1}$. Para cuantificar las poliaminas, se realizó un análisis mediante la determinación del coeficiente de correlación (r) entre las áreas de los picos de cada compuesto y las concentraciones estándar de amina. Se inyectaron seis réplicas de cada solución estándar de amina y se aplicó una regresión lineal de mínimos cuadrados para calcular las pendientes, intersecciones y coeficientes de correlación.

La concentración de amina biogénica en cada muestra (Cx) se determinó utilizando la siguiente fórmula:

(1) Cx = RFx×cIS×Ax = AIS.

Donde: RFx es el factor de respuesta de la amina, cIS es la concentración del estándar interno, Ax es el área del pico de la amina biogénica y AIS es el área del pico del estándar interno.

El factor de respuesta de la amina RFx es calculado como:

(2) RFx=AIS/Ax×cx/cISRFx = AIS/Ax /times cx/cISRFx = AIS/Ax×cx/cIS.

Se empleó diclorhidrato de 1,3-diaminopropano como estándar interno (IS) debido a los múltiples pasos implicados en el procedimiento, y los datos se utilizaron para corregir las mediciones de recuperación (R). La recuperación se calculó utilizando la fórmula:

(3) %R = [(CF – CU)/CA] X 100

Donde: CF es la concentración de la muestra enriquecida, CU es la concentración de la muestra original, CA es la concentración del analito agregado.

**Análisis estadístico**

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para verificar la homogeneidad. Con los datos de cada tratamiento (ODC+ y ODC-) se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), $P \leq 0,05$, utilizando el software estadístico SPSS 24.0 (IBM SPSS, Armonk, NY). Los resultados se expresaron como media ± desviación estándar. Cuando existieron diferencias significativas, se aplicaron pruebas de rangos múltiples de Tukey para comparar las medias entre los tratamientos individuales.

**RESULTADOS**

**Cinética de crecimiento y concentración de poliaminas**

La cinética de crecimiento de *Debaryomyces hansenii* CBS 8339, tanto en ausencia como en presencia del inhibidor químico DFMO, mostraron una curva sigmoidea típica, similar a lo reportado por Tovar *et al*., (2002) y al comparar el crecimiento entre ODC+ y ODC- no se observaron diferencias significativas. Lo cual no concuerda con Pfaller (1987), quien menciona que las poliaminas son cruciales para el crecimiento y desarrollo celular. Además, el DFMO actúa como un potente inhibidor del crecimiento de células altamente proliferativas, incluidos los microorganismos eucariotas (Rodríguez-Páez *et al*., 1991).

En cuanto a la detección y cuantificación de poliaminas, nuestros resultados mostraron que la concentración más alta de poliaminas fue durante la fase exponencial (20 h). Las poliaminas spd y spm en ODC-, no presentaron diferencias significativas en relación con el grupo control ODC+ (Tabla 1). Sin embargo, ODC- mostró un decremento significativo en la concentración de put en presencia del inhibidor DFMO con respecto a ODC+ (Tabla 1).

Aunque diferentes levaduras sintetizan y secretan diversas poliaminas (Buts *et al*., 1994), *D. hansenii* fue seleccionada por su persistencia y capacidad de adherencia al tracto digestivo, así como por su habilidad para secretar put, spd y spm ya que es usada como probiótico en acuacultura (Tovar *et al*., 2004a). En contraste, estudios con *S. boulardii* indican que esta especie no secreta spm y spd (Buts e*t al*., 1994), mientras que *S. cerevisiae* puede sintetizar estas poliaminas (Tabor y Tabor, 1985) pero en menor concentración (Tovar *et al*., 2004a)

Nuestros resultados mostraron que la presencia del inhibidor DFMO no afectó significativamente la producción de spd y spm; sin embargo, si disminuyó la producción de put, esto concuerda con Luk *et al*., (1980), quienes reportaron que DFMO inhibe en un 65% la actividad de ODC, reduciendo así la síntesis de poliaminas. De otra mano, Kallio y McCann (1981) no observaron tal disminución durante la fase exponencial en *E. coli*, lo que podría deberse al aumento en la actividad descarboxilasa de arginina, otra vía de síntesis de poliaminas, pero desconocida en *D. hansenii*.

En relación a DFMO, la primera fase de la reacción es activada por la ODC y posteriormente esta sustancia se une covalentemente con un grupo nucleofílico de la enzima, produciendo una inhibición irreversible (Sjoerdsma,1981). Lo importante de este mecanismo es que introduce dos parámetros de especificidad: el compuesto no sólo debe entrar al sitio activo de la enzima, sino que por lo menos debe realizarse parte del mecanismo catalítico normal antes de que se transforme en un inhibidor irreversible (Rodríguez-Páez *et al*., 1991). Otro punto que hay que tomar en cuenta son las diferencias en las enzimas debidas a la especie, como, por ejemplo, DFMO inhibe a la ODC de *Pseudomonas aeruginosa* y no inhibe a *Klebsiella pneumoniae* (Kallio y McCann, 1981).

La put es una poliamina fundamental que desempeña un papel crucial en múltiples procesos biológicos, está implicada en respuestas al estrés, crecimiento y desarrollo en organismos como plantas, animales y hongos (Wu *et al*., 2017). Igarashi y Kashiwagi (1999) mencionan que la disminución de put puede ser benéfica ya que su acumulación podría afectar el crecimiento celular.

La descarboxilación de la ornitina no es la única ruta para la síntesis de put, algunos autores han reportado que la ruta de la arginina descarboxilasa podría estar involucrada también en la biosíntesis de put, así como ciertos procesos de retroconversión de spd a put (Valdés-Santiago y Ruiz-Herrera, 2014), estas rutas alternas para biosíntesis de poliaminas podrían explicar las diferencias significativas que se

presentaron en put pero no en spd y spm entre ODC- y ODC+.

Por otra parte, la inhibición de put en *Ustilago maydis* mostró no ser esencial para el crecimiento y menciona que su principal función radica en ser un intermediario en la biosíntesis de la spd (Valdés-Santiago L. *et al*., 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo son de gran interés ya que exploran una estrategia para modular los niveles de poliaminas en probióticos como es *D. hansenii* y su efecto sobre el crecimiento celular. Por otra parte, en un futuro es importante realizar más investigaciones sobre la producción de poliaminas y la administración en la dieta de *D. hansenii* durante etapas larvarias y la deshabituación alimenticia para ayudar a conocer los procesos implicados en el desarrollo y maduración digestiva en peces de importancia acuícola.

**ILUSTRACIONES, TABLAS, FIGURAS.**

Tabla 1. Concentración de poliaminas determinadas por HPLC.

| Poliaminas | ODC (+) (ng/mL) | ODC (-) (ng/mL) |
|---|---|---|
| **Putrescina** | 0.0010 ± 0.0017 | 2.04E-08 ± 3.45E-08* |
| **Espermidina** | 0.017 ± 0.0037 | 0.0091 ± 0.0062 |
| **Espermina** | 0.016 ± 0.0039 | 0.0090 ± 0.018 |

Valores expresados en media ± desviación estándar. ODC+ = Debaryomyces hansenii, ODC- = Debaryomyces hansenii inhibida en su actividad ODC con DMFO. * = diferencias significativas ($p \leq 0.05$), n = 6.

**CONCLUSIONES**

En nuestro estudio se encontró que DL-2-difluorometilornitina es un potente e irreversible inhibidor de la enzima ornitina descarboxilasa en *D. hansenii* y consecutivamente disminuye la biosíntesis de putrescina. Sin embargo, DFMO adicionado al medio de cultivo de la levadura, no afecta su crecimiento. Por lo anteriormente mencionado se concluye lo siguiente:

1. La cinética de crecimiento de la levadura *Debaryomyces hansennii* no es afectada por el inhibidor DFMO.

2. La inhibición de la enzima ODC por DFMO en la levadura *D. hansenii*, no afecta la producción de las poliaminas espermina y espermidina.
3. El inhibidor DFMO disminuye significativamente la síntesis de la poliamina putrescina en *Debaryomyces hansenii*.

Esta información es de gran interés ya que el uso de las poliaminas puede tener importantes usos en el crecimiento y salud animal. Nuestros resultados demuestran que la modulación de la producción de poliaminas puede tener aplicaciones en estudios futuros, como son el desarrollo de medidas profilácticas en cultivos acuícolas y estrategias para la creación de alimentos funcionales adicionados con probióticos como es *D. hansenii*, principalmente durante etapas larvarias donde pueden ocurrir altas mortalidades. Además, este trabajo puede ser usado como un antecedente para conocer el efecto de estas moléculas sobre el crecimiento celular, supervivencia y maduración digestiva, los cuales son procesos considerados cuellos de botella en la producción de larvas de peces, aunque aún se deberán realizar investigaciones sobre la producción de poliaminas y la administración en la dieta de *D. hansenii* durante la ontogenia y la deshabituación alimenticia, este tipo de investigaciones puede ayudar a generar conocimientos sobre los procesos implicados en el desarrollo y maduración digestiva en peces de importancia acuícola.

**REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**


Andlid T., Juárez RV., Gustafsson L. (1995). Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophtalmus maximus*). Microb. Ecol. 30:321-334.

Angulo M., Reyes-Becerril M., Medina-Córdova N., Tovar-Ramírez D., Angulo, C. (2020). Probiotic and nutritional effects of *Debaryomyces hansenii* on animals. Applied microbiology and biotechnology. 104, 7689-7699.

Balcázar JL., de Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Vendrell D., Muzquiz JL. (2006). The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology. 114:173-18.

Buts JP., Keyser N., Raedemaeker L. (1994). *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. Pediatric Research. 36(4):522-52.

Campos-Góngora E., Palande AS., León-Ramírez C., Pathan EK., Ruiz-Herrera J., Deshpande

MV. (2018). Determination of the effect of polyamines on an oil-degrading strain of *Yarrowia lipolytica* using an *odc* minus mutant. FEMS yeast research. 18(8).

Guzmán-Villanueva LT. (2008). Efecto de la levadura *Debaryomyces hansenii* silvestre e inhibida de su actividad ornitin-descarboxilasa sobre el desarrollo larvario de la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*). Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, SC). La Paz, BCS, México.

Guzmán-Villanueva LT. (2014a). Efecto del-glucano 1, 3/1, 6 sobre la respuesta inmune, la actividad enzimática digestiva y la expresión de genes de *Lutjanus peru* y *Sparus aurata*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR, SC). La Paz, BCS, México.

Guzmán-Villanueva LT., Tovar-Ramírez D., Gisbert E., Cordero H., Guardiola FA., Cuesta A., Meseguer J., Ascencio-Valle F., Esteban MA. (2014b). Dietary administration of β-1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. Fish & shellfish immunology. 39(1), 34-41.

Igarashi K. and Kashiwagi. (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. Biochem. J. 344:633-642.

Kallio A. and McCann J. (1981). Ornithine decarboxilase. Biochem. J. 218:641- 644.

Kallio, A. and McCann, PP. (1981). Difluoromethylornithine irreversibly inactivates ornithine decarboxylase of *Pseudomonas aeruginosa* but does not inhibit the enzymes of *Escherichia coli*. Biochemical Journal. 200(1), 69-75.

Luk, G., C. Civin, R. Weissman, and S. Balyn. (1980). Science. 216: 75-77.

Mallé P., Vallé M., Bouquelet S. (1996). Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. Journal of AOAC. 79(1):43-49.

McCann PP., Tardif C., Mamont PS. (1977). Regulation of ornithine decarboxylase by ODC-antizyme in HTC cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75:948-954.

Pegg AE. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. Biochem. J. 234:249-26.

Pfaller A., Gerarden T., Riley J. (1987). Growth inhibition of pathogenic yeast isolates by alpha-Difluoromethylornithine: An inhibition of ornithine decarboxilase. Mycophatologia. 98:3-8.

Phillips, MA. (2018). Polyamines in protozoan pathogens. Journal of Biological Chemistry. 293(48), 18746-18756.

Raul F. (2007). Revival of 2-(difluoromethyl) ornithine (DFMO), an inhibitor of polyamine biosynthesis, as a cancer chemopreventive agent. Biochem. Soc. Trans. 35(Pt 2):353-5. doi: 10.1042/BST0350353. PMID: 17371277.

Reyes-Becerril M., Tovar-Ramírez D., Ascencio-Valle F., Civera-Cerecedo R., Gracia-López V., Barbosa-Solomieu V. (2008a). Effects of dietary supplementation with live yeast *Debaryomyces hansenii* on immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. Aquaculture. 280(1-4):39-44.

Rodríguez-Páez L., Baeza-Ramírez l. and Wong-Ramírez C., 1991. Inhibidores de la ornitina descarboxilasa como agentes quimioterapéuticos potenciales. An. Ese. Nac. Cienc. Biol., Méx. 35: 151-166.

Sherman F. (1991). Getting started with yeast. En: Guthrie, Ch. and G.R. Fink (Eds). Methods in Enzymology, 194, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Acad. Press, NY. Pp. 3-21.

Sjoerdsma, A. (1981). Suicide enzyme inhibitors as potential drugs. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 30(1), 3-22.

Tabor CW. and Tabor H. (1985). Polyamines in microorganisms. Microbiological Reviews. 49(1):81-99.

Teles A., Álvarez-González CA., Llera-Herrera R., Gisbert, E., Salas-Leiva J., Rodríguez-Jaramillo MC., Tovar-Ramírez D. (2022). *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 promotes larval development in *Seriola rivoliana*. Aquaculture. 560, 738587.

Tovar, D., Zambonino, J., Cahu, C., Gatesoupe, FJ., Vázquez-Juárez, R., Lésel, R. (2002). Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Aquaculture. 204(1-2), 113-123.

Tovar-Ramírez D., Zambonino- Infante JL., Gatesuope FJ., Cahu C., Nolasco SH., Vázquez JR. (2004a). Polyamine producing yeast as potential probiotics for the spotted juveniles sand bass *Paralabrax maculofasciatus*. Aquaculture. 204:113-123.

Tovar-Ramírez D., Zambonino JL., Cahu C., Gatesoupe FJ., Vázquez-Juárez J. (2004b). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture. 234(1-4):415- 427.

Valdés-Santiago L., Guzmán-de-Peña D., Ruiz-Herrera J. (2010). Life without putrescine: disruption of the gene-encoding polyamine oxidase in *Ustilago maydis odc* mutants. FEMS yeast research. 10 (7), 928-940.

Valdés-Santiago L. and Ruiz-Herrera J. (2014). Stress and polyamine metabolism in fungi. Frontiers in Chemistry. 1, 42.

Wu CG., Tian JL., Liu R., Cao PF., Zhang TJ., Ren A., Shi L., Zhao MW. (2017). Ornithine decarboxylase-mediated production of putrescine influences ganoderic acid biosynthesis by regulating reactive oxygen species in *Ganoderma lucidum*. Applied and Environmental Microbiology. 83(20):1289-17. doi: 10.1128/aem.01289-17. PMID: 28802268; PMCID: PMC5627001.