

Tesis Doctoral

Polisacáridos del alga roja *Nemalion* helminthoides: caracterización, modificación química y actividad biológica

Pérez Recalde, María Mercedes

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pérez Recalde, María Mercedes. (2012). Polisacáridos del alga roja *Nemalion* helminthoides: caracterización, modificación química y actividad biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pérez Recalde, María Mercedes. "Polisacáridos del alga roja *Nemalion* helminthoides: caracterización, modificación química y actividad biológica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Polisacáridos del alga roja *Nemalion helminthoides*:
caracterización, modificación química y actividad biológica**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área
Ciencias Biológicas

Lic. María Mercedes Pérez Recalde

Directora de Tesis: Dra. María Cristina Matulewicz
Directora asistente: Dra. María Josefina Carlucci
Consejera de estudios: Dra. Lilia Lauría de Cidre

Lugar de trabajo: Departamento de Química Orgánica - CIHIDECAR, FCEyN, UBA
Laboratorio de Virología, Departamento de Química Biológica, FCEyN, UBA

Buenos Aires, 2012

POLISACARIDOS DEL ALGA ROJA *NEMALION HELMINTHOIDES*: CARACTERIZACION, MODIFICACION QUIMICA Y ACTIVIDAD BIOLOGICA

La presente Tesis comprende cuatro temas principales:

Estudio del sistema de polisacáridos del alga roja *Nemalion helminthoides*, familia Liagoraceae, orden Nemaliales. Se determinó que la matriz de la pared celular estaba compuesta: **(i)** mayoritariamente por α -D-(1 \rightarrow 3)-mananos con unidades monosulfatadas en C-4 ó C-6, con un promedio de un grupo sulfato cada cuatro residuos, y un grado de polimerización de \sim 200; **(ii)** en menor proporción por α -D-(1 \rightarrow 3)-mananos con ramificaciones simples de β -D-xilosa en C-2, de similar grado de sulfatación también en C-4 ó C-6, y peso molecular promedio de \sim 10 kDa; **(iii)** por xilanos neutros β -D-(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4), de \sim 6 kDa. Por último, de pared fibrilar se aislaron (1 \rightarrow 4)- β -D-xilanos neutros.

Modificaciones químicas de las fracciones de mananos y xilomananos de *Nemalion helminthoides*. **(i)** A partir de los mananos nativos se generaron polisacáridos modificados con 43-50% de sulfatación, constituidos mayormente por unidades disulfatadas en C-2 y C-6 y de unidades trisulfatadas. **(ii)** A partir de las fracciones de xilomananos se obtuvieron, por degradación de Smith, derivados sin ramificaciones de xilosa.

Estudio de actividad antiviral de fracciones nativas y modificadas de *Nemalion helminthoides*. Los xilomananos inhibieron *in vitro* al virus herpes simplex (HSV-1 y HSV-2) y al virus dengue (DENV-2) agregados durante la adsorción viral. Los mananos sobresulfatados inhibieron DENV-2 agregados durante la adsorción viral, y HSV-1 y HSV-2 colocados durante y/o después de la adsorción viral *in vitro*. Utilizando un modelo de infección intranasal de ratones BALB/c con HSV-2, los mananos sobresulfatados protegieron de la enfermedad en un 100% con una única dosis, por la misma vía.

Evaluación de acción inmunomoduladora de polisacáridos de *Nemalion helminthoides*. Fracciones de xilomananos indujeron proliferación de linfocitos T humanos (línea H9) y macrófagos murinos (línea RAW). En macrófagos, además, estimularon la secreción de citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α y de óxido nítrico. La respuesta de citoquinas también se detectó en plasma de ratones BALB/c inyectados por vía intravenosa. Los animales tratados con xilomananos no desarrollaron la enfermedad al ser infectados, una hora después, con HSV-2.

Palabras clave: polisacáridos de algas rojas, Nemaliales, *Nemalion helminthoides*, mananos sulfatados, xilomananos sulfatados, sulfatación de mananos, antiherpéticos, polisacáridos inmunomoduladores.

POLYSACCHARIDES FROM THE RED SEAWEED *NEMALION HELMINTHOIDES*: CHARACTERIZATION, CHEMICAL MODIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

This Thesis comprises four main topics:

Study of the polysaccharide system from the red seaweed *Nemalion helminthoides* family Liagoraceae, order Nemaliales. It was determined that the cell wall matrix was composed: **(i)** mainly by α -D-(1 \rightarrow 3)-mannans with monosulfated units at C-4 or C-6, one sulfate group every four residues, on average, and a polymerization degree of \sim 200; **(ii)** in minor amount by α -D-(1 \rightarrow 3)-mannans with β -D-xylose at C-2, with similar sulfation degree at C-4 or C-6, and average molecular weight of \sim 10 kDa; **(iii)** by neutral β -D-(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4) mixed linkage xylans, of \sim 6 kDa. Finally, from the fibrillar wall, neutral (1 \rightarrow 4)- β -D-xylans were isolated.

Chemical modifications of mannan and xylomannan fractions from *Nemalion helminthoides*. **(i)** From the native mannans, oversulfated polysaccharides with a 43-50% sulfation were prepared. These mainly constituted by disulfated units at C-2 and C-6, and trisulfated units. **(ii)** From the xylomannan fractions, derivatives without xylose branches were obtained, by Smith degradation.

Study of antiviral activity of native and modified fractions of *Nemalion helminthoides*. Xylomannans were inhibitors of herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2) and dengue virus (DENV-2) *in vitro* when were added during viral adsorption. Oversulfated mannans were inhibitors of DENV-2 when were incorporated during viral adsorption, and HSV-1 and HSV-2 during and/or after viral adsorption *in vitro*. Oversulfated mannans were evaluated in BALB/c mice with intranasal infection with HSV-2, 100% of the mice receiving one dose were protected.

Evaluation of immunomodulatory effect by *Nemalion helminthoides* polysaccharides. Xylomannans fractions were inductors of human T lymphocytes (H9 line) and murine macrophages (RAW line) proliferation. Besides, this compounds were able to stimulate secretion of nitric oxide and cytokines (IL-6 and TNF- α) in macrophages. Cytokine response was also observed in BALB/c mice inoculated by intravenous route. Remarkably no illness was developed in mice treated with xylomannans fractions one hour before HSV-2 infection.

Keywords: red seaweed polysaccharides, Nemaliales, *Nemalion helminthoides*, sulfated mannans, sulfated xylomannans, mannan sulfation, antiherpetic, immunomodulatory polysaccharides.

Agradezco fundamentalmente a la Dra. Cristina Matulewicz, por su generosidad y apertura al poner toda su sabiduría de química de polisacáridos al servicio de una tesis en biología. Por adentrarse en las cuestiones biológicas y confiar tanto en mí para poder hacerlo. Por darme total libertad en las decisiones cotidianas de trabajo, en elegir cursos y congresos, y respaldarme siempre. Y sobre todo por no colocar jamás al saber en un lugar de poder, sino de posibilidad de intercambio. GRACIAS Cristina!

Agradezco también a la directora asistente, Dra. M. Josefina Carlucci, por recibirme tan cálidamente en su grupo de investigación en Virología y por comprender mis horarios y tiempos al trabajar en otro laboratorio. Por darme todas las herramientas para trabajar correctamente con animales, permitirme formar parte del inicio de la línea de inmunomodulación, y sobre todo por su gran afecto y optimismo, confiando siempre en que la tesis llegaría a buen puerto.

Al Dr. Carlos Pujol, por darme la instrucción inicial en las determinaciones con virus, y estar siempre tan dispuesto a lo largo de estos años a colaborar conmigo. También por su inmensa ayuda en el trabajo en el bioterio, e inclusive venir para ello en días feriados, gracias Carlos.

Al Lic. Hugo Benavides, del INIDEP, por su fundamental colaboración en la recolección y reconocimiento del alga, por estar atento cada verano a la “llegada” de Nematium y hacerme saber que siempre podía contar con su desinteresada y profesional ayuda.

Al Dr. Miguel Nosedá, de la Universidade Federal do Paraná, Brasil, por todos los espectros a temperatura que efectuó. Gracias Miguel, la tesis no habría sido posible sin esos espectros. Y por los consejos y el apoyo por mail, también gracias.

Al “Labo Cerezo” en su totalidad. Gracias por nunca hacerme sentir sola. Por todo lo que aprendí de ustedes compartiendo equipos, reactivos, material, cuentos de vacaciones, chocolates... Gracias: Dres. Carlos Stortz, Diego Navarro, Cecilia Rodríguez, Andrea Ponce, Marina Ciancia, Héctor Prado y Lic. Virginia Fernández, Florencia Basanta, Vanina Cosenza, Melissa Rabanal, Gloria Salatto. A las chicas por su trato siempre amistoso. Y a Juan Cabrera y Martín Briozzo, los biólogos pichones de Ceci, por toda su buena onda. También al Dr. Cerezo, por fundar la línea de polisacáridos de algas, y alentarme a terminar de una vez la tesis todo el último año.

Gracias especiales al Dr. Diego Navarro, cuya asistencia desinteresada sobre temas varios de la mesada de QO, el CGL, RMN, el masa, y tantas cosas más fue esencial en mis primeros años de trabajo; a la Dra. Cecilia Rodríguez, por ayudarme con los preparados de microscopía, con bibliografía y muuuucho aliento, y a la Lic. Vanina Cosenza “la reina del TOPSPIN” por asistirme una y mil veces mientras analizaba los espectros de RMN.

Gracias también a la Dra. Dilsia Canelón, nuestra visitante venezolana, por todo lo compartido, para mí de gran ayuda, y por inyectar al labo de amistad y energía “chévere” cada vez que vino.

A la Dra. Rosalía Agustí, jefa espiritual del L6, por ser tan zen. Rosi..qué hubiera sido de todos nosotros sin vos... Gracias por tus respuestas siempre calmas y criteriosas, por tu confianza, comprensión y solidaridad. Un enorme plus haberte tenido cerca en esta etapa formativa.

A la casi Dra. María Eugenia Giorgi, por compartir confidencias, alegrías y tristezas dentro del L6, por saber que siempre contamos la una con la otra allí dentro, y por su amistad, gracias Euge!

Al Dr. Carlos Lima, por nuestras charlas de política y espectáculos, y por ofrecerme café y cariño cada vez que lo necesité; por su siempre buena onda conmigo en los vaivenes de lo cotidiano.

A mis compañeras de QB, Carolina Artuso y Cecilia Mateu, por estar dispuestas a compartirme células, virus, reactivos, y todo lo necesario para poder trabajar en las distintas técnicas. Gracias chicas, por todo! Gracias Ceci por cuidarme los ratones cuando tuve que viajar, y gracias Caro por la charla y tu escucha siempre generosa mate de por medio.

Hago extensivo el gracias a todo el Labo de Virología, siempre hubo alguien para asistirme en el solidario clima del cuarto de cultivo: Pablo, Clau, Carlos, Vivi, Guille, Isa, Guada, LauraT, Flavia, July, Belén, Mónica... Gracias especiales a la Dra. Cybele García, por tus palabras y mirada amigas sin excepción, por nuestras charlas al salir de yoga y por darme siempre tus opiniones sinceras. También a los Dres. Andrea Barquero, Laura Alché, Luis Scolaro, Nelly Candurra, Sandra Cordo, Elsa Damonte por sus ejemplos de trabajo y por todo su afecto. A Ana Carro, Eliana Acosta y Susana Mersich por compartirme el cuartito y escritorio de QB19-B durante todo 2010, y también su día a día: fue un muy lindo lugar para estar, con su compañía!

A la Dra. Noemí Torres, mi coordinadora de docencia del CBC, por enseñarme tanto sobre el profesionalismo y el respeto, y darme testimonio y afectuosos consejos para la tesis.

A Sergio Jacob y Maripi, que invariablemente me transmitieron buen humor en todo este tiempo.

A Cristian Rodríguez por efectuarnos las corridas de CG en la columna 2380 y por lo compartido en sus asiduas visitas al L6, gracias.

A los Dres. Adriana Kolender y José Estévez, ex-tesistas del grupo, por hacerme saber que podía contar con ellos. Y por recibirme en sus labos aun cuando yo no sabía muy bien de qué hablaba!

A los Dres. Olga Tarzi, Fernando Durán, Lucía Gandolfi, Adriana Cirigliano, por su generoso aliento pasillesco en la etapa de escritura. También a mi vecino del L5, Guille, por la compañía vespertina.

A los Dres. Pablo Schwarzbaum y Paula Faillace, directores de mi tesina de licenciatura en FFyB, por acompañarme con tiempo y consejos también en esta etapa. Y por interesarse siempre en mí y en mi desarrollo profesional, gracias.

A Ricardo, por su fundamental ayuda en momentos clave, infinitas gracias.

Al gran grupo de yoga del Campo de Deportes de Ciudad, especialmente a su profe Hebe Faldutti, por todo lo compartido en estos años, y más que nada por ayudarme a pulverizar las tensiones a la salida del labo oommm!

A mis amigos biólogos: ayer compañeros de estudio, hoy interlocutores de charlas imprescindibles que ayudan a abrir y recorrer caminos. Qué sería de nosotros sin nosotros! Y sin las pizzas o varenikes amasados por Pato...GRACIAS: Guillermina Bilbao, Marcos Cervini, Claudia Alonso, Leila Haiek, Agustina de Dios, Flor Siri, Patricia Demkura, Romina Cutrullis, Darío Salvucci, Marian Massó, Jerónimo Auzmendi *et al.*

A los amigos químicos “que el pasillo de Orgánica me dio”: Verónica Mendoza y Gustavo Kashiwagi, por ser tan únicos en su especie y por todo lo compartido. A Vero también por transmitirme toda su experiencia con la tesis, con visión de amiga, y ayudarme con el Chem Draw y tantas otras cosas...

Gracias a mis amigas de la vida: Margarita Quinn, Magdalena Castex, Mercedes Rocha, María Mérega, Alejandra Rodríguez, Majo Chena, Diany Fernández, por todo lo compartido en este tiempo y mucho antes también. Por alentarme tanto en este tramo final, ayudarme a desenchufar y escuchar mis cuentos sobre ciencia y científicos.

A la barra de la calle Balbastro, por los domingos de asado y guitarras, que ahora quedaron un poco atrás pero que tanto me alegraron en los primeros años del doctorado. Son geniales.

GRACIAS enormes a mis hermanos Viviana, Ignacio, Guadalupe, por nuestra preciada fraternidad, que tanto sostiene con sus puentes visibles e invisibles, también para estas cosas, y por toda su alegría. También a mis queridos cuñados, y a mi primera sobrina, que está llegando en estos días. Gracias a Viví por esperarme con guisitos “con onda” cuando salía muy tarde del labo.

Y gracias sobre todo a mis padres, José (que me llevó en auto con ratones a bordo) y Alicia (que desde siempre me transmitió el amor por las plantas), porque cada uno a su manera me enseñaron sobre la independencia de pensamiento y sobre el renovar contrato con las utopías. Gracias aparte por el gran apoyo espiritual que me brindaron en los momentos menos gratos de este camino, y la excelente energía que me transmitieron en la etapa final. DEDICADO A USTEDES.

debes amar la arcilla que va en tus manos
debes amar su arena hasta la locura
y si no, no lo emprendas que será en vano
sólo el amor alumbra lo que perdura
sólo el amor convierte en milagro el barro

debes amar el tiempo de los intentos
debes amar la hora que nunca brilla
y si no, no pretendas tocar lo cierto

de una canción de Silvio Rodríguez

La presente Tesis fue posible gracias a becas doctorales de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y de la Universidad de Buenos Aires. Resultados generados en la misma se encuentran publicados en:

Pérez Recalde, M., Carlucci, M. J., Nosedá, M y Matulewicz, M. C. (2011) “Chemical modifications of algal mannans and xylomannans: effects on antiviral activity” *Phytochemistry* 73, 57-64.

Pérez Recalde, M.; Nosedá, M., Pujol, Carlos A., Carlucci, María J. y Matulewicz, M. C. (2009) “Sulfated mannans of the red seaweed *Nemalion helminthoides* of the South Atlantic” *Phytochemistry* 70, 1062-1068.

También durante el período de trabajo la autora participó en las siguientes publicaciones, en temas relacionados:

Pérez Recalde, M.; Prado, H. y Matulewicz, M.C. (2010) “Carbohydrates”, Capítulo en el libro *Research Methods in Plant Science: Vol. 1. Soil Allelochemicals*. Editorial Studium Press LLC.

Mateu, C., **Pérez Recalde, M.**, Artuso, C., Hermida, G., Linero, F., Scolaro, L., Pujol, C., Damonte, E. y Carlucci, M.J. (2011) “Emergence of HSV-1 syncytial variants with altered virulence for mice after selection with a natural carrageenan” *J Sex Transm Dis* 38, 548-554.

POLISACARIDOS DEL ALGA ROJA
***NEMALION HELMINTHOIDES*:**
CARACTERIZACION, MODIFICACION QUIMICA Y
ACTIVIDAD BIOLOGICA

INDICE

Prólogo	1
Objetivos	2

SECCION I

Capítulo 1: INTRODUCCION: *Nemalion helminthoides*

1.1. Sobre la especie <i>Nemalion helminthoides</i>	3
1.1.1. Datos taxonómicos y biológicos	3
1.1.2. Datos morfológicos y reproductivos.....	8

Capítulo 2. INTRODUCCION: Polisacáridos de algas rojas

2.1. Pared celular de algas rojas	11
2.2. Polisacárido fibrilares de pared	11
2.3. Polisacáridos de matriz	13
2.3.1. Galactanos sulfatados	13
2.3.2. Otros polisacáridos de matriz: Mananos y xilomananos sulfatados, xilanos... 17	
2.4. Polisacáridos caracterizados de especies del orden Nemaliales	18
2.4.1. Xilanos neutros	18
2.4.2. Xilomananos y mananos sulfatados	19
2.5. Determinación de estructura química de polisacáridos	21

Anexo I Tablas RMN	25
---------------------------------	----

Capítulo 3: RESULTADOS y CONCLUSIONES: Caracterización química de polisacáridos de *N. helminthoides*

Abreviaturas utilizadas

3.1. Obtención de extractos acuosos	27
3.1.1. Análisis de monosacáridos componentes de los extractos	30
3.1.2. Tinción con azul de toluidina	33

FRACCIONAMIENTO DEL PRIMER EXTRACTO

3.2. Obtención de fracciones de mananos y xilomananos sulfatados	36
3.2.1. Estudios de homogeneidad	39

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE POLISACARIDOS DEL PRIMER EXTRACTO

3.3. Análisis de fracciones mayoritarias	43
3.3.1. Análisis por metilación y de sulfatación-metilación	43
3.3.2. RMN	47
3.4. Análisis de fracciones minoritarias: xilomananos sulfatados	53
3.4.1. RMN	53
3.4.2. Análisis por metilación y degradación de Smith	56
3.5. Análisis por RMN de las fracciones minoritarias N1 y N2	60

XILANOS NEUTROS

3.6. Aislamiento de xilanos neutros	63
3.6.1. Análisis estructural: xilanos β -D-(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 4)	66
3.7. Extracciones alcalinas a residuo final: aislamiento de xilanos β-D-(1\rightarrow4)	69

Capítulo 4. RESULTADOS y CONCLUSIONES: Modificaciones químicas a fracciones de *N. helminthoides*

4.1. Sulfatación de mananos	73
4.1.1. Análisis estructural de los productos de sulfatación.....	74
4.1.1.1. RMN	74
4.1.1.2. Metilación de N6S-2h y N6S-3h	76
4.1.2. Sulfatación de N5.....	78
4.2. Eliminación de ramificaciones a xilomananos	81
4.2.1. Controles con fracciones modelo	81
4.2.2. Obtención de N3-Smith y N4-Smith	82

Anexo II: Espectros de cromatografía gaseosa-espectrometría de masa	87
--	-----------

Capítulo 5. METODOS EXPERIMENTALES Sección I

EXTRACCION DE POLISACARIDOS

5.1. Material algal	94
5.2. Extracciones acuosas a 90 °C	94
5.2.1. Extracción y aislamiento por diálisis y liofilización (PD)	94
5.2.2. Extracción y aislamiento por precipitación con isopropanol (PP).....	95

FRACCIONAMIENTO

5.3. N1-N7: fracciones sulfatadas a partir de PP-1	96
5.4. Obtención de fracciones neutras a partir de PPD-2: xilanos mixtos	98
5.4.1. Separación de polisacáridos cargados y neutros	98
5.4.2. Columna de intercambio aniónico	98
5.5. Aislamiento de xilanos β-D-(1\rightarrow4): extracciones alcalinas a residuo final	99

MODIFICACIONES QUIMICAS

5.6. Sulfatación de mananos	99
5.6.1. Obtención de sales de piridinio de N5 y N6	99
5.6.2. Método de sulfatación con el complejo SO ₃ -piridina	99
5.6.3. Método con H ₂ SO ₄ -DCC	100
5.6. Oxidación y degradación de Smith a xilomananos	100

ANALISIS DE COMPOSICION DE EXTRACTOS CRUDOS Y DE FRACCIONES NATIVAS Y MODIFICADAS

5.8. Determinación de monosacáridos componentes.....	101
5.8.1. Hidrólisis total a monosacáridos.....	101
5.8.2. Preparación de alditos acetilados.....	101
5.8.3. Cromatografía gaseosa de los monosacáridos derivatizados.....	102
5.9. Determinación cuantitativa de hidratos de carbono totales	102

5.10. Determinación cuantitativa del contenido de sulfato	102
5.10.1. Método turbidimétrico	103
5.10.2. Cromatografía iónica con detector conductimétrico	104
5.11. Determinación del contenido de proteínas	104
5.12. Determinación del peso molecular promedio	104
5.12.1. Dosaje de extremos reductores	105
5.12.2. Cálculo del peso molecular promedio numérico	105
5.13. Homogeneidad por HPSEC	105

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE FRACCIONES NATIVAS Y MODIFICADAS

5.14. Metilación	106
5.14.1. Metilación con NaOH-CH ₃	106
5.14.2. Metilación con NaOH-(CH ₃ O) ₂ SO ₂	107
5.14.3. Análisis de monosacáridos componentes de los polisacáridos metilados	108
5.15. Estudios de desulfatación-metilación	108
5.15.1. Desulfatación de fracciones mayoritarias; N5, N6 y N7.....	108
5.15.2. Metilación de fracciones desulfatadas.....	109
5.16. RMN	109
5.17. Cromatografía gaseosa-espectrometría de masa	110

SECCION II

Capítulo 6. INTRODUCCION: Polisacáridos como antivirales

ACTIVIDAD ANTIVIRAL	111
6.1. Virus Herpes	113
6.1.1. Mananos y xilomananos sulfatados como antivirales.....	115
6.2. Virus Dengue	116
6.3. Actividad anticoagulante	117
6.4. Desarrollos para uso clínico	117

Capítulo 7. INTRODUCCIÓN: Inmunomodulación por polisacáridos

7.1. Polisacáridos botánicos como inmunomoduladores	119
7.2. Mecanismos de acción inmunomoduladora de polisacáridos	120
7.3. Polisacáridos inmunomoduladores de plantas y hongos	124
7.4. Inmunomodulación por polisacáridos de algas	126

Capítulo 8. RESULTADOS y CONCLUSIONES: Actividad antiviral de fracciones de *N. helminthoides*

Abreviaturas utilizadas

8.1. Estudio de la actividad antiviral y virucida contra HSV	129
8.1.1. Efecto de las fracciones nativas N1-N6 sobre las primeras etapas de la infección	129
8.1.2. Efecto de las fracciones químicamente modificadas en etapas tempranas de la infección.....	132
8.1.3. Efecto virucida	135
8.1.4. Efecto de las fracciones activas post-adsorción	136
8.2. Citotoxicidad en células Vero	139
8.3. Actividad antiviral en ratones infectados por vía intranasal con HSV-2	141
8.4. Efecto inhibitorio en la adsorción de DENV	142

8.5. Inhibición de virus Junín (JUNV)	144
8.6. Ensayo de actividad anticoagulante	145

Capítulo 9. RESULTADOS y CONCLUSIONES: Actividad inmunomoduladora

9.1. Efecto sobre la proliferación de linfocitos Thumanos (línea H9)	147
9.2. Efecto sobre la proliferación de monocitos humanos (línea U937)	149
9.3. Macrófagos murinos línea RAW 264.7	150
9.3.1. Cito toxicidad	150
9.3.1. Efecto sobre la proliferación celular	151
9.3.3. Efecto sobre la liberación de citoquinas	153
9.3.4. Cuantificación de IL-6	153
9.3.5. Cuantificación de TNF- α	154
9.3.6. Cuantificación de óxido nítrico (NO)	155
9.4. Evaluación de la actividad inmunoestimuladora <i>in vivo</i>	156
9.5. Efecto inmunoprotector de los xilomananos en una infección viral	159

Capítulo 10. METODOS EXPERIMENTALES Sección II

10.1. LINEAS CELULARES Y VIRUS	162
10.1.1. Preparación de las suspensiones virales	163
10.2. Ensayos de citotoxicidad	163
10.3. Determinación de la actividad antiviral	164
10.3.1. Reducción en el número de placas.....	164
10.3.2. Inhibición del rendimiento viral.....	164
10.3.3. Actividad virucida	164
10.3.4. Acción de los compuestos después de la adsorción	164
10.4. Ensayo de la actividad anticoagulante	165
10.5. Ensayo de protección en un modelo de infección intranasal	166
10.6. Acción inmunomoduladora	165
10.6.1. Ensayo sobre la proliferación celular.....	166
10.6.2. Efecto sobre la liberación de citoquinas en macrófagos RAW 264.7	166

10.6.3. Efecto de inyección intravenosa de las fracciones sobre citoquinas plasmáticas	167
10.6.4. Efecto inmunoprotector en una infección viral	167

Anexo III: Fracciones F3 y F6 de <i>N. fastigiata</i>	168
--	-----

SECCION III

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES	169
---	-----

Citas bibliográficas	177
-----------------------------------	-----

PROLOGO

Las algas son utilizadas por el hombre desde hace cientos de años, como alimento, fertilizantes agrícolas, para remedios populares o nutrición de animales, entre otros usos. A la explotación de praderas naturales se suman las prácticas de cultivo, que llevan varios siglos en culturas orientales y cuyas bases científicas se esclarecieron en las últimas décadas, optimizando los rendimientos y cuidando la ecología (Alveal, 1988). Además del uso directo del alga, como alimento o fertilizante, muchos productos extraídos de las mismas tienen aplicaciones importantes: polisacáridos, pigmentos, vitaminas. En particular, los polisacáridos de pared celular de algas rojas y pardas se utilizan intensivamente en las industrias de alimentos, farmacéutica y de cosmética, y se los conoce como ficocoloides. A su vez, la actividad farmacológica que muchos polisacáridos presentan como antivirales, antitumorales o anticoagulantes genera un foco importante que se encuentra aún en fase de investigación.

Dentro de las algas rojas, varias son conocidas por su importancia económica: para alimentación, las especies del género *Porphyra* (“nori”) utilizadas en comida japonesa en todo el mundo representa una industria de enormes beneficios - sólo Japón produce 600.000 toneladas al año -. En cuanto a los polisacáridos, las industrias del ágar y carragenano, ficocoloides usados como aditivos alimentarios, gelificantes y/o viscosantes se proveen de algas rojas de los géneros *Gracilaria*, *Gelidium*, *Kappaphycus*, *Chondrus*, *Gigartina*, *Euchema*, siendo Filipinas e Indonesia los principales productores de carragenanos y Chile de ágar.

En Argentina, seis géneros se cosechan y comercializan en la actualidad, tres de ellos de algas rojas (*Gigartina*, *Gracilaria*, *Porphyra*) para carragenano, ágar y alimentación respectivamente y otros tres del grupo de las pardas (*Lessonia*, *Macrocystis*, *Undaria*). (fuente: empresa Soriano S.A.). Dado que sólo en Patagonia se registran al menos doscientas especies de algas, queda aún mucho por conocer sobre estos recursos de las costas argentinas.

En el marco general de un proyecto de investigación sobre polisacáridos de algas rojas del Mar Argentino y sus posibles aplicaciones, en el presente trabajo de Tesis se aislaron y caracterizaron los del alga roja *Nemalion helminthoides* (Vellay Batters, 1902) de la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires.

La presente Tesis posee los siguientes:

Objetivos generales

- Estudiar el sistema de polisacáridos de pared celular del alga roja *Nemalion helminthoides* recolectada en las costas de la provincia de Buenos Aires.
- Analizar posibles aplicaciones terapéuticas de polisacáridos extraídos de dicho recurso, de fracciones nativas o bien modificadas químicamente.

Objetivos específicos

- Caracterizar químicamente los polisacáridos de *Nemalion helminthoides* obtenidos tanto por extracciones acuosas como con soluciones alcalinas.
- A partir de extractos acuosos, obtener fracciones de diferentes estructuras promedio
- Generar fracciones modificadas químicamente en parámetros estructurales relevantes para la actividad antiviral.
- Evaluar la citotoxicidad y la actividad contra virus herpes simplex (HSV-1 y HSV-2) y dengue (DENV-2) de fracciones de polisacáridos nativas y modificadas.
- Determinar la capacidad protectora de fracciones activas en un modelo murino de infección intranasal con HSV-2.
- Analizar la capacidad inmunomoduladora de las fracciones de polisacáridos, tanto *in vitro* como *in vivo* en modelo murino.

Los primeros tres Objetivos específicos se desarrollan en la Tesis a lo largo de la Sección I, y los tres siguientes en la Sección II.

Sección I



Capítulo 1: *NEMALION HELMINTHOIDES*

1.1. Sobre la especie *Nemalion helminthoides*

De distribución cosmopolita y hábitat de aguas templadas, *N. helminthoides* está presente en los cinco continentes (www.algaebase.org). Se trata de un alga bentónica cuyos talos pueden recolectarse en meses de primavera-verano, siendo en la costa atlántica argentina muy abundantes entre octubre y febrero.

La especie fue incorporada a la flora argentina a partir de una publicación (Pujals, 1960) que constituyó el primer reporte de su presencia en Argentina, en Mar del Plata y Miramar, provincia de Buenos Aires. Luego se registró también en las costas de Chubut, Santa Cruz e Islas Malvinas. Fuera de la publicación mencionada, no existían otros estudios biológicos ni químicos sobre la especie en Argentina hasta las originadas durante el presente estudio.

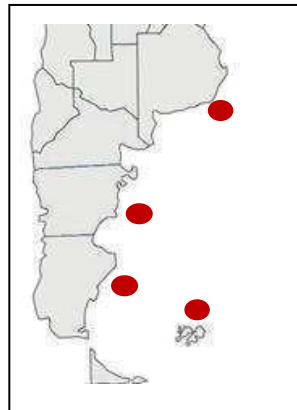


Figura 1. Distribución de *N. helminthoides* en las costas de Argentina; en la provincia de Buenos Aires es donde se la encuentra más abundante, entre octubre y febrero.

1.1.1. Datos taxonómicos y biológicos

El Phylum Rhodophyta dentro de Plantae comprende al gran grupo de las algas rojas (Yoon et al., 2006), en el cual se cuentan descritas alrededor de 6200 especies, la gran mayoría multicelulares - macroalgas -, de hábitat marino y climas cálidos, aunque también hay especies de zonas polares (Lee, 1980). Se presenta a continuación la ubicación taxonómica de *N. helminthoides*.

Ubicación taxonómica de *N. helminthoides*

Reino	Plantae
Subreino	Billiphyta
Phylum	Rhodophyta
Clase	Florideophyceae
Subclase	Nemaliophycidae
Orden	Nemaliales
Familia	Liagoraceae
Género	<i>Nemalion</i>

El phylum Rhodophyta es un grupo distinguible de otros linajes eucarióticos por una combinación única de parámetros bioquímicos y estructurales; entre ellos (Maggs et al., 2007):

- ausencia de flagelo y de centríolos en todos los estadios del ciclo de vida.
- almidón de florídeas en citoplasma, en lugar de almidón en plástidos, como polisacárido de reserva.
- clorofila a como única clorofila y presencia abundante de otros pigmentos accesorios: ficoeritrina y ficocianina.
- presencia de “pit-plugs” entre células como resultado de una citocinesis incompleta.

Si bien se describieron varias especies de agua dulce, la mayoría de las algas rojas son marinas y de hábitats templados o tropicales, donde cumplen importantes roles ecológicos (Graham et al., 2000)

Las determinaciones taxonómicas de Rhodophyta se basaron tradicionalmente en características estructurales y de reproducción/ciclo de vida. Además, la composición de polisacáridos de pared fue sugerida como criterio taxonómico, habiéndose reconsiderado órdenes y familias entre algas agarófitas y carragenófitas según este criterio (Maggs y Pueschel, 1989). En la actualidad, sin embargo, las secuencias moleculares y ultraestructuras de pit-plugs son fundamentales para las nuevas clasificaciones.

Las división clásica de algas rojas es en dos grandes clases: Bangiophyceae y Floridophyceae. La evidencia molecular actual (Yoon et al., 2006; Saunders y Hommersand, 2004; Muller et al., 2001) indica que ambas clases tendrían un ancestro común (Fig. 2) y que estos dos grupos hermanos, a su vez, serían parafiléticos de las recientemente establecidas clases Porphyridiophyceae, Rhodellophyceae, Stylenomatophyceae y Compsopogonophyceae. También la recientemente incluida clase Cyanodophyceae se habría separado de las demás Rhodophyta tempranamente.

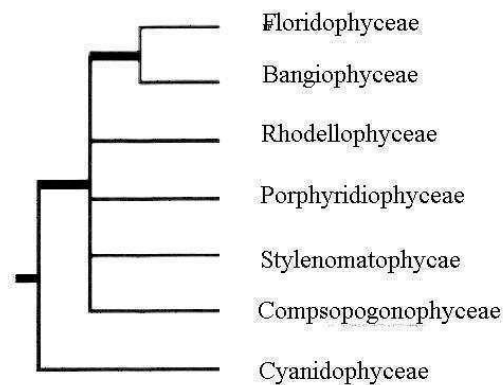


Figura 2. Propuesta de clasificación en clases de Yoon et al. (2006). La actual clase Bangiophyceae tendría un ancestro común con las Floridophyceae. La clase Cyanidophyceae habría divergido tempranamente dentro de las Rhodophyta.

A diferencia de todas las demás clases, las Floridophyceae exhiben una enorme diversidad y riqueza estructural, así como complejos ciclos de vida haplo-diploides. Es, por lo mismo, el grupo más abundante en cuanto a número de especies, unas 6000, englobando a más del 90% de las algas rojas.

En cuanto a las subclases dentro de Floridophyceae, pueden ser cuatro (Saunders y Hommersand, 2004) o cinco (Le Gall y Saunders, 2007) según dos clasificaciones vigentes: Ahnfeltiophycidae, Hildenbrandiophycidae, Rhodymeniophycidae y Nemaliophycidae, incorporándose Corallinophycidae como quinta subclase. En ambos modelos, de todas formas, el grupo de las rodimeniofíceas conforman el grupo mayoritario dentro de las algas rojas, abarcando más de 4700 especies, y prácticamente todas las de alta relevancia económica y ecológica.

Las nemaliófitas, en cambio, son una subclase conformada por sólo unas 750 especies, clasificadas en ocho órdenes. Se presenta un árbol evolutivo actual que comprende dichos órdenes (Fig. 3) y los de las demás subclases de Floridophyceae, según ultraestructura de pit-plugs, por Le Gall y Saunders (2007).

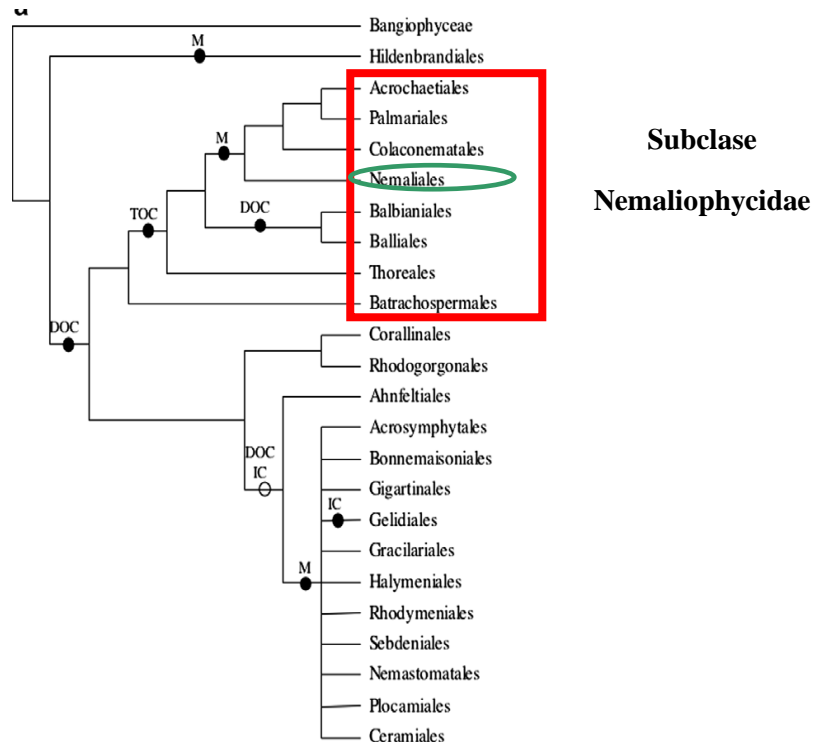


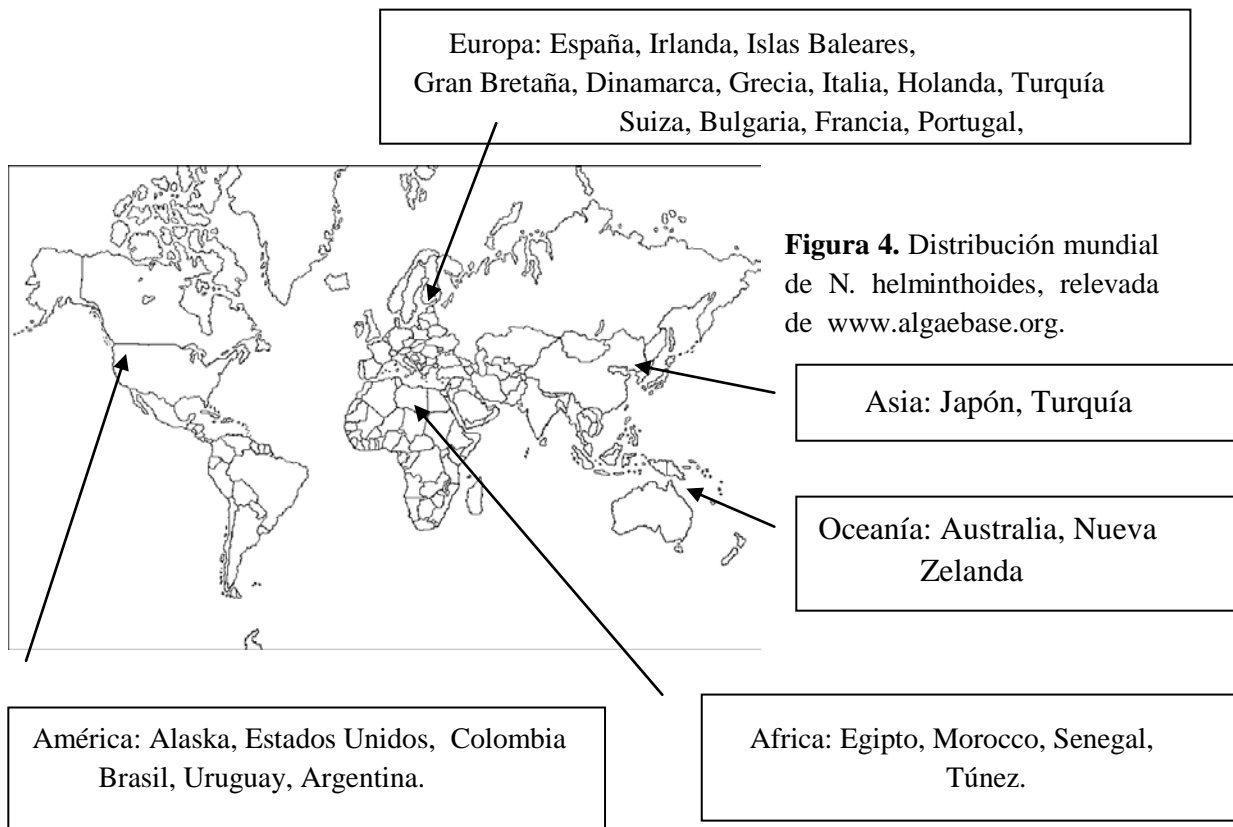
Figura 3. Relaciones evolutivas de los órdenes de la clase Floridophyceae, basadas en ultraestructura de pit-plugs de acuerdo a Le Gall y Saunders (2007). Los órdenes de la subclase Nemaliophycidae se recuadran en rojo para este trabajo.

En el orden Nemaliales – unas 240 especies - se distinguen actualmente tres familias: Galaxauraceae, Scinaiaceae y Liagoraceae; a esta última pertenece *N. helminthoides*, así como otras 150 especies relacionadas, comprendidas en 22 géneros. Dentro de este grupo se detectaron matrices extracelulares altamente calcificadas en los géneros *Galaxaura* y *Liagora*; su depósito de carbonato de calcio es diferente de la calcita de las Corallinales, y consiste principalmente en cristales de aragonita.

En el género *Nemalion* se reconocen actualmente otras seis especies además de *N. helminthoides*; las mismas se enumeran a continuación, junto con su lugar registrado de distribución (www.algaebase.org): *N. amoenum* (Camerún), *N. attenuatum* (India, Sri

Lanka), *N. cari-cariense* (Colombia), *N. longicollem* (Caribe: Islas Vírgenes), *N. perpusillum* (Mauricio) y *N. vermiculare* (Japón, Corea, Rusia, China).

De acuerdo a los datos bibliográficos, la especie *N. helminthoides* sería la más ampliamente distribuida, con reportes en los cinco continentes (Fig. 4). Asimismo, sería la única presente en Argentina.



Denominaciones aceptadas anteriormente para la especie y que hoy se reconocen como sinónimos son: *Nemalion multifidum*, *Nemalion lubricum*, *Helminthora multifida*, entre otros. De hecho, la cepa de la especie que ofrece para cultivo la Universidad de Texas lleva la denominación *N. multifidum* (catálogo UTEX LB 743).

N. helminthoides es una especie comestible en Oriente; en Japón se la conoce con los nombres comunes de Umisomen o Tsukomo Nori. El nombre común en Occidente es “spagueti de mar” o “gusano de mar” dado su aspecto; por el momento sólo en Europa se está expandiendo su uso para consumo humano en ámbitos gourmet.



Figura 5. Ubicación en perspectiva del lugar de ocurrencia de *Nemalion helminthoides* en Cabo Corrientes, Mar del Plata, Buenos Aires, uno de los lugares de recolección para el presente trabajo.

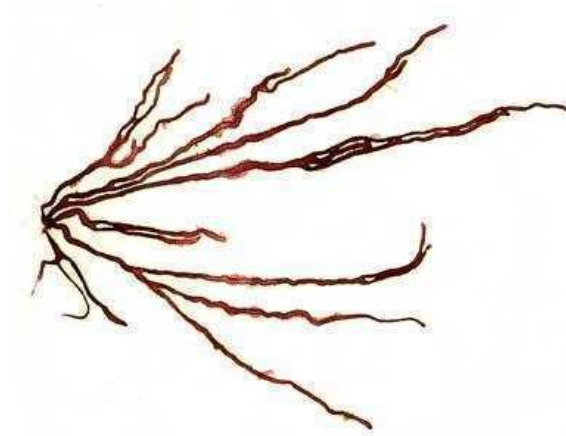


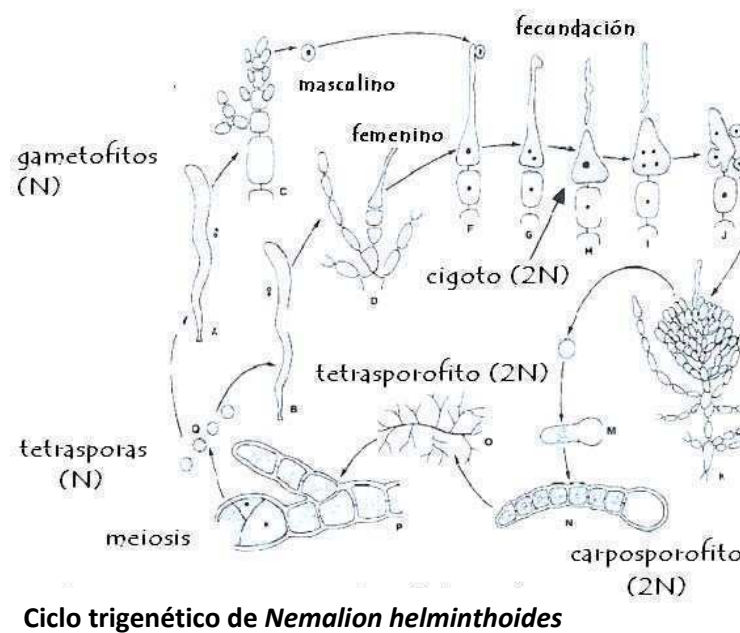
Figura 6. Aspecto estirado de un típico talo de *N. helminthoides*.

1.1.2. Datos morfológicos y reproductivos

La reproducción de algas rojas puede ser asexual en las especies unicelulares más primitivas, o sexual, cuya expresión más simple es la alternancia de dos generaciones heteromórficas. En Floridophyceae, sin embargo, opera un ciclo de vida de tres generaciones único en la naturaleza, y sólo compartido con algunos taxones de Fungi.

Se considera que en algas rojas esta complejidad respondería a una compensación evolutiva frente a la falta de flagelo en gametas. *N. helminthoides* exhibe este tipo de reproducción trigenética (Fig. 7); en la misma alternan:

- un esporofito (2N) que produce esporas por meiosis, denominadas tetrasporas por su agrupación de a cuatro;
- un gametofito (N) que se genera a partir de las tetrasporas y, con sus variantes gametofito femenino y masculino, es la generación productora de gametas;
- un carposporofito (2N), generación microscópica y parásita de los gametofitos femeninos: luego de la fecundación produce carposporas, que al ser liberadas dan lugar a la generación esporofítica.



Ciclo trigenético de *Nemalion helminthoides*

Figura 7. Ciclo de vida de tres generaciones del género *Nemalion*: un gametofito haploide genera gametas cuya fecundación da lugar a un carposporofito diploide. Por liberación de esporas se genera un tetrasporofito también diploide y éste produce tetrasporas por meiosis, reanudando la generación gametofítica.

En el caso de *N. helminthoides* los gametofitos femeninos y masculinos ocurren en el mismo talo, tratándose de plantas monoicas. Además, esta fase gametofítica es la única

detectable macroscópicamente, puesto que se da una alternancia heteromórfica con el esporofito, que es de tamaño extremadamente pequeño.

Por lo tanto, el material recolectado y analizado en el presente estudio comprende la fase gametofítica de la especie. En el caso de su variante femenina, los talos pueden contener asociada la fase microscópica parásita carposporofítica; aun así, su aporte en masa sería mínimo, sin modificar el objeto de estudio como los polisacáridos de talos gametofíticos.



Figura 8. Talos gametofíticos de *Nemalion helminthoides* adheridos a las rocas de Cabo Corrientes, Mar del Plata, uno de los lugares de recolección para el presente trabajo.

Los gametofitos de *N. helminthoides* se presentan en general en grupos conspicuos y llamativos, de hasta 15 ejes, que surgen de un callo basal por medio del cual se fijan sobre mejillines (*Brachyodontes purpuratus*) y a las rocas (Figs. 5, 6 y 8). Pueden medir hasta un metro de largo y hasta 3,5 mm de diámetro; son en general afinados hacia los ápices, simples o con alguna ramificación dicotómica; de color rojo oscuro, castaño pardo o verdoso pardo, mucilaginosos y muy resbaladizos (Pujals, 1960).



**Capítulo 2: INTRODUCCION A POLISACARIDOS
DE ALGAS ROJAS**

Además de las características distintivas de las algas rojas nombradas en el Cap.1, éstas se distinguen de todos los otros grupos de plantas por su composición singular de polisacáridos de pared celular y de matriz intercelular. Muchas especies contienen galactanos sulfatados de estructura única en la naturaleza, entre los cuales destacan por su abundancia los de nombres comunes ágar y carragenano.

2.1. Pared celular de algas rojas

La pared celular de algas rojas está conformada por polisacáridos, proteoglicanos, péptidos, proteínas, lípidos y material inorgánico asociado. Si bien no existe un modelo acabado de su estructura, se cree que tendría tres dominios similares a los de plantas superiores (Carpita y Gibeaut, 1993): una pared fibrilar, una matriz amorfa y un dominio glicoproteico. Según dicho modelo, la pared fibrilar y la matriz amorfa están compuestas por polisacáridos, de los cuales en la actualidad es mayor su conocimiento que del resto de los componentes de pared.

La pared fibrilar junto con el dominio glicoproteico formarían un estrecho reticulado en el cual se encuentra embebida la matriz amorfa; esta última, laxa, se suele extender a los espacios intercelulares, por lo que se la denomina también matriz extracelular. En la pared fibrilar, en cambio, se distinguen polisacáridos de estructura rígida, que se entrecruzan con las glicoproteínas en secuencias de aminoácidos caracterizadas como “cellulose binding domains” (Liu et al., 1996; Flores et al., 1997) formando el reticulado que da soporte a la pared. La misma, en su conjunto, puede representar hasta un 30-50% del peso seco del alga (Craigie, 1990).

2.2. Polisacáridos fibrilares de pared

Entre los polisacáridos de estructura rígida, las algas rojas contienen celulosa, (1→4)-β-D-glucano, en baja proporción, no más del 10% de la pared (Fig. 9). Se la caracterizó en varias especies, obteniéndose la misma estructura secundaria determinada para celulosa de plantas superiores (Mukai et al., 1981; Toffanin et al., 1994).

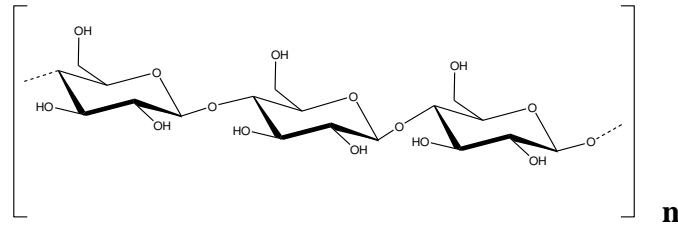


Figura 9. Estructura química de la celulosa: (1→4)-β-D-glucano.

Otro tipo de polisacárido fibrilar identificado en algas rojas es (1→4)-β-D-manano. Se caracterizó en varias especies de *Porphyra* (Mukai et al., 1981) y *Bangia* (Gretz et al., 1982), en fases reproductivas genéricas, en las cuales está ausente la celulosa, al igual que en algunas algas verdes del orden Sifonales. En algas rojas, se considera que estos mananos son exclusivos de sólo dicha fase reproductiva de las Bangiophycidae.

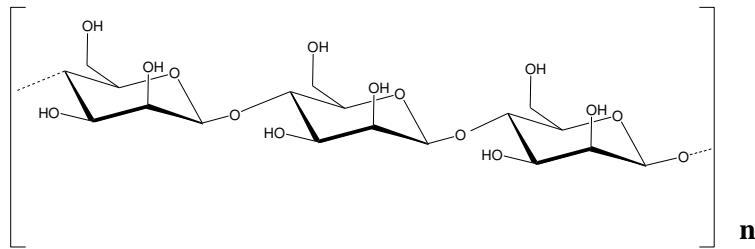


Figura 10. Estructura química del (1→4)-β-D-manano, componente de pared fibrilar de algas rojas Bangiophycidae.

Por último, se caracterizaron (1→4)-β-D-xilanos o bien (1→3)-β-D-xilanos como componentes fibrilares de pared. Si bien la xilosa es el monosacárido universal de todas las algas, en los órdenes de Floridophyceae Palmariales y Nemaliales, así como en algunas especies de la clase Bangiophyceae, se detecta en mayor proporción. En efecto, con soluciones alcalinas se aislaron (1→4)-β-D-xilanos de *Palmaria palmata* (como *Rhodomenia palmata*, Turvey y Williams, 1970), *Nothogenia fastigiata* (como *Chaetangium fastigiatum*, Matulewicz y Cerezo, 1987a), *Scinaia hatei* (Mandal et al., 2010) y de β-D-xilanos (1→3) en especies de *Bangia* y *Porphyra* (Painter, 1983).

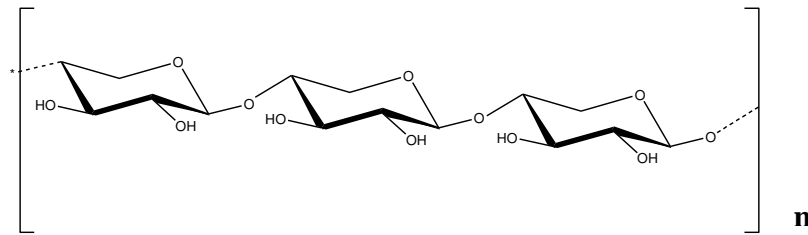


Figura 11. Estructura química del (1→4)-β-D-xilano, componente de pared fibrilar de especies de algas rojas de los órdenes Nemaliales y Palmariales.

2.3. Polisacáridos de matriz

La matriz de pared celular está conformada casi exclusivamente por polisacáridos sulfatados, cuyo contacto con agua de mar otorga el aspecto mucilaginoso que puede apreciarse al tacto en muchas algas rojas. Las estructuras de galactanos sulfatados son las más expandidas en la naturaleza, marcando una diferencia con las pectinas de plantas superiores, que no son sulfatadas y están compuestas mayormente por ácido galacturónico.

Las funciones biológicas de estas estructuras de matriz formadoras de geles en el alga tienen que ver con la regulación y provisión de la protección mecánica de las células; además, la carga negativa de grupos sulfato estaría relacionada con el intercambio catiónico con el medio. Por último, la alta retención de agua por los geles retrasa la desecación y permite la supervivencia de algas de zonas intermareales, que quedan descubiertas de agua en períodos de marea baja (Estévez et al., 2003).

2.3.1. Galactanos sulfatados

Como ya se introdujo, los galactanos sulfatados son los polisacáridos más frecuentemente encontrados en la matriz de alga rojas; por lo mismo, los más conocidos químicamente y explotados industrialmente. Dichos galactanos poseen cierta regularidad: una unidad repetitiva formada por β-D-galactopiranososa enlazada por carbono 3 y α-galactopiranososa enlazada por carbono 4. Esta última pertenece a la serie D- en el caso del carragenano y a la serie L- en el caso del agarano. En ambas unidades repetitivas, la α-galactopiranososa puede presentarse en su forma de 3,6-anhidrogalactosa.

Los carragenanos son biosintetizados principalmente por especies del orden Gigartinales. De acuerdo al esquema de sulfatación de la unidad β , se agrupa a los carragenanos en cuatro familias principales:

- **Familia kappa (κ):** los residuos de β -D-galactopiranososa están **sulfatados en C-4**. Las variantes en la unidad de α -D-galactopiranososa dan lugar a cuatro estructuras idealizadas, identificadas a su vez con letras griegas (Fig. 12):

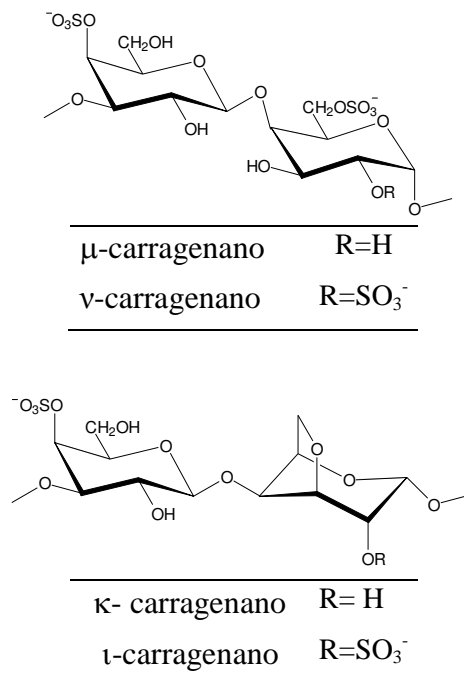
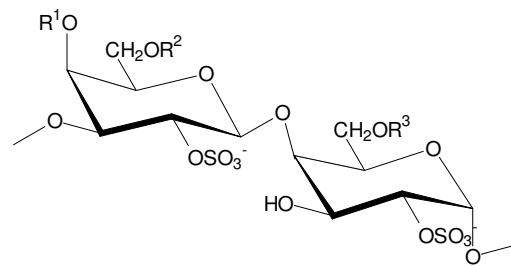
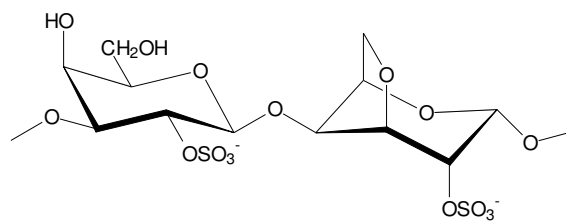


Figura 12. Estructuras idealizadas de carragenanos de la familia κ (kappa), todas con sulfato en C-4 en el residuo β -D-galactopiranososa: μ -carragenano, ν -carragenano y sus derivados ciclados κ carragenano y ι -carragenano.

- **Familia lambda (λ):** las unidades de β -D-galactopiranososa están **sulfatadas en C-2**. Por las variaciones de la unidad de α -D-galactopiranososa, se distinguen también cuatro estructuras idealizadas (Fig. 13):



Estructura	R ¹	R ²	R ³
λ-carragenano	H	H	SO ₃ ⁻
ξ-carragenano	H	H	H
π-carragenano	Piruvato		H



θ-carragenano

Figura 13. Estructuras idealizadas de carragenanos de la familia λ (lambda), todas con sulfato en C-2 en el residuo β-D-galactopiranosas: θ-carragenano es el derivado ciclizado de λ-carragenano.

Se encuentran clasificadas además las familias **beta (β)** y **omega (ω)**, mucho menos abundantes en la naturaleza. En la primera, la unidad de β-D-galactopiranosas no está sulfatada, y en la segunda, está sulfatada en C-6.

Los carragenanos naturales pueden ser de una única estructura repetitiva, o más frecuentemente en una misma molécula híbridos de dos estructuras idealizadas. Además, pueden presentar variaciones durante el ciclo de vida. En efecto, se evidenció en muchos casos una alternancia entre estructuras de la familia κ en talos cistocárpicos (gametofito femenino más carposporofito) y de la familia λ en talos tetrasporofíticos

para una misma especie (Mc Candless et al., 1982, 1983). Los carragenanos explotados comercialmente son κ -, ι - y λ -. Los primeros dos dan geles mientras que el λ -carragenano se usa como viscosante.

En cuanto a los agaranos, éstos no presentan una clasificación en familias. Sus variaciones estructurales son más amplias y provienen de la presencia de 3,6-anhidro- α -L-galactosa y de diferentes grados de sustitución con sulfato, metoxilo y/o piruvilo, o bien cadenas laterales de 4-O-metil- α -L-galactosa, L-galactosa ó β -D-xilosa. Las alternativas mencionadas generan cadenas con distintos grados de capacidad gelificante (Falshaw et al., 1998); las especies agarófitas más importantes y utilizadas industrialmente pertenecen a los órdenes Gelidiales y Gracilariales.

Dos estructuras típicas son el agarano presente en el género *Porphyra*, que se conoce como “porfirano” y el caso extremo de la agarosa, en la cual todas las unidades α -L-están en su forma 3,6-anhidra (Fig. 14).

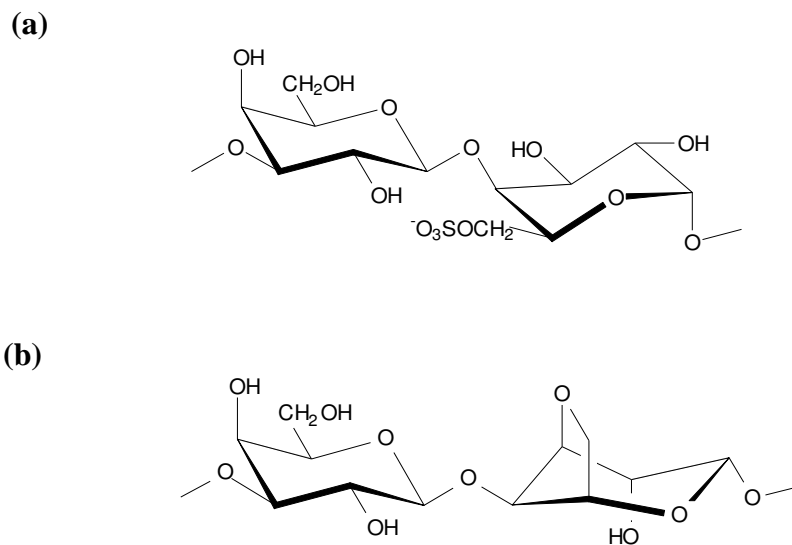


Figura 14. Dos estructuras de ágares (a) “porfirano”: 3-β-D-galactosa-(1→4)-α-L-galactosa 6-sulfato (1→ (b) estructura idealizada de la agarosa: 3-β-D-galactosa-(1→4)-3,6-anhidro-α-L-galactosa (1→.

Si bien la ocurrencia de ambos tipos de galactanos divide a las algas rojas en “agarófitas” y “carragenófitas”, se sugirieron casos con díadas D-D y D-L en la misma molécula, abriendo una nueva clasificación como “galactanos DL-híbridos” (Stortz y Cerezo, 2000). Aun así, este concepto está en permanente revisión dada la incerteza de

no saber si se está analizando un tipo de polisacárido o bien una mezcla que combina galactanos de tipo agarano y de tipo carragenano (Ciancia y Cerezo, 2010).

Sin embargo, sí se han logrado diferenciar para especie carragenófitas la presencia de bajas cantidades de L-galactosa, como por ejemplo en *Gigartina skottsbergii* (Ciancia et al., 1993), o en *Kappaphycus alvarezii* (Estévez et al., 2004).

2.3.2. Otros polisacáridos de matriz: mananos y xilomananos sulfatados, xilanos.

Fuera de los galactanos, otras pocas estructuras se informaron a partir de matriz de algas rojas: mananos y xilomananos sulfatados, y xilanos neutros.

Mananos sulfatados como componentes mayoritarios de matriz se informaron por primera vez en 1973, luego del hallazgo inesperado de manosa como producto principal de hidrólisis, en lugar de galactosa, en *Nemalion vermiculare* (Usov et al., 1973). Las estructuras de sus mananos y xilomananos sulfatados fueron analizadas en detalle, dado lo inusual y novedoso de las mismas. Se describen a continuación (ítem 2.4) las estructuras obtenidas, no sólo para *N. vermiculare* sino también para otras especies del orden que se analizaron posteriormente. En efecto, la presencia de mananos y xilomananos sulfatados, junto con un bajo contenido de galactosa, pareciera ser la constante y característica distintiva de Nemaliales.

Además, se informó la presencia de xilanos neutros con “uniones mixtas” β -D-(1 \rightarrow 3) y β -D-(1 \rightarrow 4) como componentes de matriz de algunos grupos de alga rojas. Estos xilanos poseen menor rigidez que las cadenas totalmente β -(1 \rightarrow 4) ó totalmente β -(1 \rightarrow 3) de la pared fibrilar. Se encontró que las cadenas con uniones mixtas son más flexibles y solubles en agua cuanto más uniones β -(1 \rightarrow 3) contengan, habiéndose hallado entre 17-38% de las mismas en xilanos de distintos aislamientos. Este tipo de xilanos no se consideran material esquelético de pared y se describieron exclusivamente para especies de los órdenes (a) **Palmariales**: *Palmaria palmata* (como *Rhodymenia palmata*, Bjorndal et al., 1965), *P. stenogona* (Usov et al., 1978), *P. decipiens* (como *Leptosarca simplex*, Adams et al., 1988), *Halosaccion glandiforme* (Kovač et al., 1980), (b) **Achrochaetiales**: *Audouinella floridulum* (como *Rodochorton floridulum*, Turvey y Williams, 1970) y (c) **Nemaliales**, varias especies cuyo detalle se presenta a continuación.

2.4. Polisacáridos de matriz en especies del orden Nemiales

Se estudió hasta el momento la composición de pared celular de doce especies de Nemiales (Tabla 1). La metodología general para obtener los componentes de matriz consistió en extracciones acuosas en agua caliente y adición de alcohol para precipitar los polisacáridos.

Tabla 1. Especies del orden Nemiales cuya estructura química de polisacáridos de pared se informó en literatura.

Familia	Especies
Liagoraceae ¹	✓ <i>Nemalion vermiculare</i>
	✓ <i>Liagora valida</i>
Scinaiaceae	✓ <i>Nothogenia fastigiata</i>
	✓ <i>Nothogenia erinacea</i>
	✓ <i>Scinaia hatei</i>
	✓ <i>Scinaia halliae</i>
Galaxauraceae	✓ <i>Galaxaura rugosa</i>
	✓ <i>Galaxaura marginata</i>
	✓ <i>Galaxaura obtusata</i>
	✓ <i>Tricleocarpa cylindrica</i>
	✓ <i>Tricleocarpa fragilis</i>

¹ Usov y colaboradores (1988) informaron además la estructura de polisacáridos de la especie indeterminada *Liagora* sp. de la cual no se volvió a puntualizar su nombre completo.

2.4.1. Xilanos neutros

Se aislaron xilanos neutros por extracción con agua caliente de todas las especies enumeradas (salvo *S. hatei*, en la que no se analizaron). De las determinaciones estructurales se concluyó en todos los casos que se trataba de xilanos lineales de uniones mixtas β -D-(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 4).

Las características generales de estos xilanos son su bajo peso molecular promedio - entre 2000 y 5000 Da y su mayor proporción de uniones (1→4) por sobre las (1→3); (Turvey y Williams, 1970; Nunn et al., 1973; Viana et al., 2011). De hecho, se informaron relaciones molares de (1→4):(1→3) de 4:1 a 6:1 para la mayoría de las especies, infiriéndose las mismas por metilación, RMN o por degradación de Smith. Por estas últimas dos técnicas, se concluyó además para el xilano de *N. fastigiata* que las uniones (1→3) se encontraban dispersas en la cadena más que agrupadas en bloques (Cerezo, 1972; Matulewicz et al., 1992). Más tarde, se confirmó dicha distribución en el xilano de *N. erinacea* por medio de xilanasas específicas (Nerinckx et al., 2004).

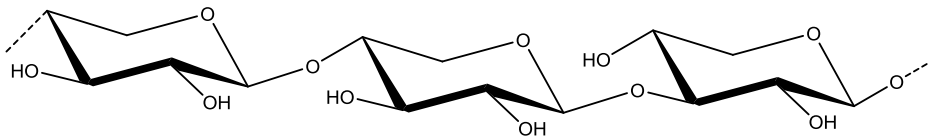


Figura 15. Xilanos neutros con uniones mixtas β -D-(1→3; 1→4), solubles en agua, forman parte de la matriz de algas Nemaliales, Palmariales y Achrochaetales.

Los xilanos de *N. fastigiata* se estudiaron por espectrometría de masa MALDI-TOF, informándose un peso molecular promedio similar al obtenido por otras técnicas, de entre 2500 y 4000 Da (Fukuyama et al., 2005).

Como se detalló más arriba, también en especies de Palmariales y Achrochaetales, otros órdenes de la familia Nemaliophyceae, se aisló el mismo tipo de xilanos mixtos; cabe destacar que los tres órdenes son muy cercanos filogenéticamente dentro de la familia, tal como se aprecia en el árbol presentado en el Cap. 1.

2.4.2. Xilomananos y mananos sulfatados

Los compuestos sulfatados de la matriz de pared celular se extraen con agua caliente junto con los xilanos neutros mencionados en 2.4.1; ambos grupos de polisacáridos pueden separarse luego por diferencia de cargas.

Usov y colaboradores determinaron la estructura de los mananos sulfatados de *N. vermiculare* como (1→3)- α -D-manopiranosas con sustituyentes sulfato en C-4 ó C-6 cada tres monosacáridos. En los correspondientes xilomananos, el esqueleto de manosa

presentaba ramificaciones de β -D-xilopiranosas en C-2 (Usov et al., 1975a, 1975b, 1975c).

En el caso de las dos especies de *Liagora* (una indeterminada, *Liagora* sp.) se determinó idéntica estructura de (1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosas sulfatadas en C-4 ó C-6, informándose para *L. valida* además 3-O-metil- β -D-xilosa y cadenas cortas de β -D-xilopiranosas enlazadas 1 \rightarrow 4 como otros posibles sustituyentes en C-2 (Usov et al., 1988; Usov et al., 1991).

Dentro de la familia Scinaiaceae, en *N. fastigiata* se describieron también estructuras de (1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosas con eventual ramificación por xilosa en C-2, pero con un patrón de sulfatación en C-2 y C-6 (Fig. 16, Matulewicz y Cerezo, 1987b). En cuanto a *S. hatei* se describió el mismo esqueleto de manano con sulfatación únicamente en C-4, y una ramificación xilosa por cada cuatro manosas en C-2, C-4 ó C-6 (Mandal et al., 2008).

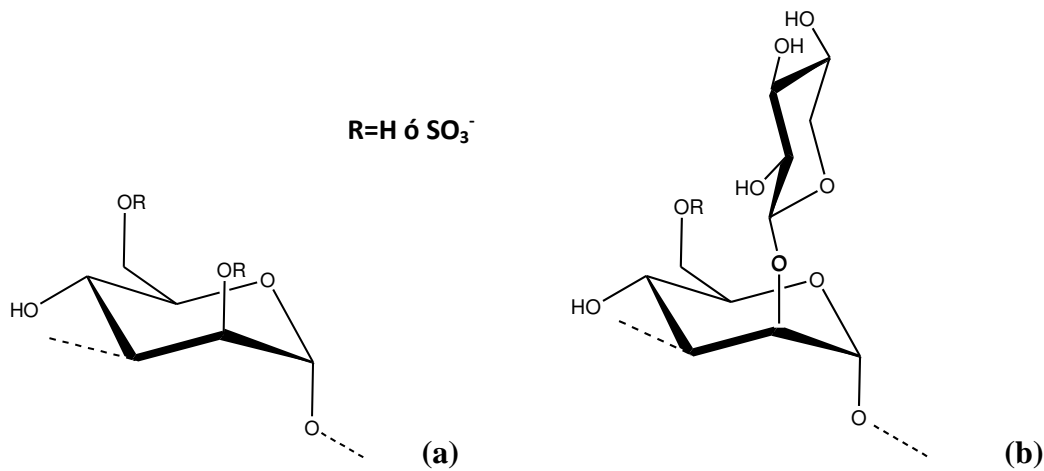


Figura 16. Estructura general de mananos (a) y xilomananos (b) de la Nematial *Nothogenia fastigiata*: (1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosas sulfatadas en C-2 y/ó C-6; β -D-xilopiranosas enlazadas por C-2.

En cuanto a la familia Galaxauraceae, los mananos sulfatados de *G. marginata* y *T. fragilis* fueron determinados en la Tesis Doctoral de A. G. Viana (2005, U. do Parana, Curitiba, Brasil) como cadenas de (1 \rightarrow 3)- α -D-manopiranosas con sulfatación en C-2 ó C-4, y de haber ramificaciones xilosa éstas se encontraban en C-4.

La única especie en la que se detectaron mananos alejados de la estructura general es *Galaxaura rugosa* (como *G. squalida*; Usov et al., 1981); con uniones 1 \rightarrow 3 pero de tipo

β . Como sustituyentes, se determinaron sulfato o β -D-xilopiranosas, y en menor proporción L-galactopiranosas, en C-4.

Dentro de las estructuras sulfatadas, en el caso de *N. fastigiata* se analizó también el bajo contenido de galactosa, concluyéndose que se trataba de polisacáridos separados de los mananos: xilogalactanos de tipo agarano, en los cuales la unidad α -L-galactosa podía estar no sustituida o bien sulfatada en C-6 y con ramificaciones de xilosa o galactosa en C-3, o bien sulfatadas en C-3. La unidad de β -D-galactosa, en tanto, podía presentar sulfatación en C-4.

Fuera de Nemaliales, se caracterizaron mananos sulfatados en dos especies de Ceramiales, un orden típicamente de algas agarófitas. En las especies *Chondrophycus papillosus* y *Chondrophycus flagelliferus* se describió un esqueleto de (1 \rightarrow 4)- β -D-manopiranosas sulfatadas en C-2, sustituidas en C-6 con ramificaciones simples de β -D-manopiranosas 2-sulfato o β -D-xilopiranosas (Cardoso et al., 2007).

2.5. Determinación de la estructura química de polisacáridos

Al igual que para otros biopolímeros, el estudio de polisacáridos abarca la estructura primaria de la cadena, y también las estructuras relativas a configuraciones espaciales. De las últimas, se acepta generalmente que éstos adoptan una conformación al azar en solución, “random coil”.

En cuanto a la estructura primaria, su determinación en polisacáridos implica no sólo conocer los monosacáridos presentes, sino también el tamaño de los anillos - piranósico o furanósico -, el tipo de unión entre los mismos - carbono implicado y configuración anomérica, α o β -, y por último los sustituyentes unidos a la cadena, pudiendo haber distintos grupos químicos y estar unidos a -OH de distintos carbonos. Además, los polisacáridos pueden ser lineales o ramificados, adicionando complejidad a su estructura primaria.

Asimismo, las fracciones “puras” de polisacáridos responden a un criterio particular, de ninguna manera aplicable a proteínas o ácidos nucleicos. De hecho, para muchos parámetros se impone describir estructuras promedio, puesto que no todas las cadenas son iguales entre sí. En la biosíntesis de polisacáridos, las variaciones estructurales provienen de la acción de un conjunto de enzimas actuantes más que de un patrón

genético fijo del cual se pueda obtener siempre un mismo producto. Lo esperable para una muestra homogénea de polisacárido es que los parámetros respondan a una distribución gaussiana de los mismos, mostrándose como representantes de una misma población, con distribuciones continuas de peso molecular, nivel de ramificación, grado de sulfatación, etc. Utilizando columnas de exclusión por tamaño puede determinarse la homogeneidad de una muestra a nivel de peso molecular.

Además de determinaciones analíticas que permiten evaluar los contenidos (% m/m) de hidratos de carbono, grupos sulfato, ácidos urónicos y proteínas, las metodologías principales para conocer la estructura primaria de polisacáridos de algas son:

- Cromatografía gaseosa/espectrometría de masa: permiten determinar la abundancia e identidad de los monosacáridos obtenidos por hidrólisis.
- Metilación y desulfatación-metilación: permiten conocer los carbonos implicados en unión glicosídica y los sustituidos con sulfato, además del tamaño del anillo y la linealidad/ramificación de la muestra. En especies en que abunden los monosacáridos naturalmente metilados (ej. en agaranos) se realiza adicionalmente etilación, con el mismo objetivo.
- Resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C y ^1H : además de corroborar toda la información de las primeras dos técnicas, informa sobre la configuración anomérica de las uniones. Las asignaciones de literatura utilizadas como referencia en este trabajo se presentan en el Anexo I al final del Capítulo.
- Espectroscopía Infrarroja (IR): técnica adicional que permite confirmar la posición de los grupos sulfato, aunque no en todos los casos porque puede haber superposición de las bandas de absorción.

Como ya se introdujo, la principal aplicación industrial de polisacáridos de algas rojas es, junto con los alginatos de algas pardas, su extensivo uso como espesantes, viscosantes y/o gelificantes. También el ágar tiene aplicaciones en microbiología - ágar bacteriológico -.

Por otra parte, mucho se estudió sobre los beneficios de las algas comestibles. Dentro de ellos, sus polisacáridos representan una fuente de fibra dietaria diferente en composición, estructura y propiedades físico-químicas de aquella provista por plantas superiores (Urbano et al., 2002). En Occidente, en España *N. helminthoides* es considerada un alga comestible, que se vende liofilizada lista para agregar a preparaciones y figura en la carta de algunos prestigiosos restaurantes (chef de cocina molecular El Bulli, com. pers., 2011).

En el plano de la investigación, se conocen los efectos anticoagulantes, antivirales, antiinflamatorios, antioxidantes, inmunoestimulantes de polisacáridos de algas, no sólo rojas sino también pardas y verdes (Wijesekara et al., 2010). En la Introducción de la Sección II se detallan aspectos de la acción antiviral y sobre el sistema inmune, propiedades que se estudiaron en esta Tesis con fracciones de *N. helminthoides*.

Anexo I

Desplazamientos químicos utilizados como referencias para las asignaciones de RMN ^{13}C detalladas en Resultados.

Tabla A: Asignación del espectro de RMN ^{13}C del metil 3-O-metil- α -D-manopiranosido y sus tres isómeros sulfatados. Se indica entre paréntesis el efecto de la sulfatación, que se obtuvo restando los desplazamientos del metil 3-O-metil- α -D-manopiranosido (Me α -D-Man) a los desplazamientos de los sulfatados (Usov et al., 1975c).

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
Me α -D-Man	101,8	70,9	71,7	67,8	73,4	61,9
Me α -D-Man3Me	101,7	66,1	81,0	66,6	73,4	61,8
Me α -D-Man3Me2S	99,5	73,1	79,3	66,4	73,4	61,7
	(-2,2)	(+7,0)	(-1,7)	(-0,2)	(0,0)	(-0,1)
Me α -D-Man3Me4S	101,3	68,2	79,7	74,8	72,1	61,6
	(-0,4)	(+2,1)	(-1,3)	(+8,2)	(-1,3)	(-0,2)
Me α -D-Man3Me6S	101,7	66,3	80,8	66,7	71,4	68,1
	(0,0)	(+0,2)	(-0,2)	(+0,1)	(-2,0)	(+6,3)

Tabla B: Asignaciones del espectro de RMN ^{13}C de un xilomanano de *Nothogenia fastigiata*, en D_2O a $80\text{ }^\circ\text{C}$ (Kolender, 2003).

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Man	102,7	70,5	78,9	67,1	74,3	61,8
α -D-Man 6S	102,9-103,1	70,5	78,8	66,9	72,4	68,5
α -D-Man 2S	100,1-100,6	77,4	77,4	66,8	74,0	61,8
α -D-Man 2Xil	100,8	78,6	79,3	67,5	74,5	61,6
α -D-Man 2Xil 6S	101,4	78,8	78,8	67,9	72,2	67,9
β -D-Xil	103,8	73,7	76,6	70,2	66,0	---

Tabla C: Desplazamientos químicos asignados a xilanos mixtos β -D-(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 4) de *Leptosarca simplex* en espectro de RMN ^{13}C en D_2O , a $55\text{ }^\circ\text{C}$ (Adams et al., 1988).

β -D-xilp	Desplazamientos químicos (ppm)						
	C-1		C-2		C-3	C-4	C-5
	(1 \rightarrow 3)	(1 \rightarrow 4)	(1 \rightarrow 3)	(1 \rightarrow 4)			
enlazada por 3	103,8	102,3	73,0		84,3	68,3	65,4
enlazada por 4	103,8	102,3	73,9	73,3	74,3	77,1	63,6

Tabla D: Desplazamientos químicos asignados a β -D-(1 \rightarrow 4)-xilano de *N. fastigiata* en espectro de RMN ^{13}C , en 1,0 M NaOH: D_2O (2:1), a temperatura ambiente (Matulewicz y Cerezo, 1987a).

β -D-xilp	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5
enlazada por 4	102,9	73,9	75,4	76,8	64,2

**Capítulo 3: CARACTERIZACION QUIMICA DE
POLISACARIDOS DE NEMALION HELMINTHOIDES**

Abreviaturas utilizadas:

CG: cromatografía gaseosa

DCC: dicitclohexilcarbodiimida

DMSO: dimetilsufóxido

HPSEC: High performance size exclusion chromatograph

RMN: Resonancia magnética nuclear

TCA: ácido tricloroacético

TFA: ácido trifluoroacético

Abreviaturas de monosacáridos

Ara: D-arabinosa

Fuc: L-fucosa

Gal: D-galactosa

Glc: D-glucosa

Man: D-manosa

Xil: D-xilosa

Man 2S: manosa-2-sulfato

Man 4S 6S: manosa-4,6-disulfato

Man 2X: manosa-2-xilosa

Man 2X 6S: manosa-2-xilosa-6-sulfato

Abreviaturas de monosacáridos metilados

2-Me Man: 2-O-metilmanosa

2,4-Me₂ Man: 2,4-di-O-metilmanosa

2,4,6-Me₃ Man: 2,4,6-tri-O-metilmanosa

EXTRACCIONES Y AISLAMIENTO DE POLISACARIDOS

El estudio de polisacáridos de pared celular de *Nemalion helminthoides* se inició junto con este trabajo de Tesis. Las metodologías utilizadas, así como la orientación en la búsqueda de resultados, se basaron en el sólido conocimiento existente acerca de estructuras de polisacáridos de algas rojas. Además, se consideró especialmente la literatura sobre polisacáridos de aquéllas del orden Nemaliales, todas detalladas en la Introducción, y de las cuales una, *Nothogenia fastigiata*, había sido estudiada en nuestro laboratorio.

3.1. Obtención de extractos acuosos

Se disponía inicialmente de una muestra liofilizada de una colecta de alga de las costas de Miramar, provincia de Buenos Aires, en diciembre de 1994. A partir de 55,8 g de alga molida se realizó la primera serie de extracciones con agua a 90°C. Una vez separado el sobrenadante de cada extracción, éste se sometió a diálisis a fin de separar sales y otros componentes de bajo peso molecular. El material se liofilizó, dando lugar a los extractos “productos de diálisis” llamados sucesivamente PD-1, PD-2 y PD-3, y cuyos rendimientos y composición se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento y composición de tres extractos acuosos seguidos de diálisis y liofilización a partir del alga roja *Nemalion helminthoides* (colecta 1994).

Extracto	Rendimiento ¹ (%)	Hidratos de Carbono (%)	Sulfato (% NaSO ₃)	Proteínas (%)	Peso Molecular (Da)
PD-1	20,3	57,8 ± 7,2	20,9 ± 3,2	5,9 ± 2,1	17.600
PD-2	2,2	50,9 ± 2,4	14,3 ± 0,3	13,0 ± 3,2	9.240
PD-3	0,6	42,2 ± 1,6	10,9 ± 0,8	23,6 ± 0,8	6.000

¹Expresado como % respecto del peso seco de alga.

Cuando se analizó cada uno de los extractos, se halló que estaban compuestos mayormente por hidratos de carbono y en menor proporción por grupos sulfato y

proteínas. La presencia de grupos sulfato se analizó, y era esperable, dado el tipo de polisacáridos que conforman la pared celular de algas rojas.

El extracto mayoritario, PD-1, fue analizado también en su contenido de cationes inorgánicos, contraiones de los grupos sulfato. El análisis se efectuó en el Laboratorio de Análisis de Trazas (INQUIMAE, FCEN, UBA) y arrojó una presencia mayoritaria de cationes Ca^{2+} (0,0625 mol/100 g extracto de PD-1), seguido de Na^+ y Mg^{2+} (ambos 0,035 mol/100 g extracto), y en menor proporción cationes K^+ (0,00384 mol/100 g extracto). Cuando se convirtió la sumatoria de moles en equivalentes catiónicos, se encontró que equivalían a 0,233, dato que se correspondió adecuadamente con los equivalentes aniónicos calculados a partir del contenido de sulfato (0,202).

A modo comparativo se repitió en pequeña escala - partiendo de 5,00 g de alga- este sistema de aislamiento a partir de material nuevo recolectado en 2006 en Mar del Plata, Buenos Aires. Se realizaron sólo los dos primeros extractos (PD-1bis; PD-2bis), que arrojaron rendimientos muy similares a aquéllos originados de la colecta anterior (Tabla 2). En cuanto a su composición, ésta también fue muy similar, mostrando un contenido de hidratos de carbono y de sulfato algo mayor en el primer extracto, respecto de PD-1.

Tabla 2. Rendimiento y composición de dos extractos acuosos seguidos de diálisis y liofilización a partir del alga roja *N. helminthoides* (colecta 2006).

Extracto	Rendimiento ¹ (%)	Hidratos de Carbono (%)	Sulfato (% NaSO_3)	Proteína (%)	Peso Molecular (Da)
PD-1bis	21,0	69,8 ± 2,1	22,5 ± 1,1	7,6 ± 1,3	17.500
PD-2bis	2,6	49,3 ± 1,8	17,5 ± 1,6	10,2 ± 1,9	10.100

¹ Expresado como % respecto del peso seco de alga.

Con material de la recolección 2006, se ensayó un segundo método de aislamiento, que no utiliza diálisis sino precipitación con isopropanol para aislar extractos ricos en polisacáridos. El objetivo principal fue compararlo en rendimiento con el aislamiento por diálisis, además de comparar los productos obtenidos. Para este segundo método se partió de 145 g de alga seca molida. Se repitieron las tres extracciones acuosas a 90°C y, luego de centrifugar, a cada sobrenadante se le agregó 4 volúmenes de isopropanol.

Se obtuvieron dos extractos - llamados PP, “productos de precipitación”: PP-1 (40,0 g) y PP-2 (7,39 g). Se realizó también un tercer extracto, que dio una masa

extremadamente baja – sólo 12 mg - , razón por la cual no se incorporó a los análisis aunque sí se le determinó el contenido de monosacáridos (ver luego Tabla 4).

Tabla 3. Rendimiento y composición de dos extractos acuosos seguidos de precipitación con isopropanol a partir del alga roja *N. helminthoides*.

Extracto	Rendimiento ¹ (%)	Hidratos de Carbono (%)	Sulfato (% NaSO ₃)	Proteína (%)	Peso Molecular (Da)
PP-1	28,3	57,4 ± 3,2	28,2 ± 2,1	8,4 ± 1,3	16.300
PP-2	5,1	63,8 ± 4,5	18,9 ± 1,2	6,7 ± 0,9	11.300

¹Expresado como % respecto del peso seco de alga.

Como se observa en la Tabla 3, el método que utiliza precipitación con isopropanol mostró en sus productos rendimientos algo mayores a los aislados por diálisis. Este mayor rendimiento se observó entre los dos primeros extractos, ya que no se logró separar un tercer producto.

En cuanto a la masa recuperada con el método de mayor rendimiento, las masas sumadas de PP-1 y PP-2 representan 33,4% de la masa seca original de alga. Considerando que dicha masa se compone mayoritariamente de hidratos de carbono y grupos sulfato, ese porcentaje representaría a polisacáridos de matriz amorfa de pared. En extracciones acuosas similares se obtuvo un 32,4% de rendimiento para *Nothogenia fastigiata* (como *Chaetangium fastigiatum*; Cerezo et al. 1971), y se informó que alrededor del 30 % de *Nemalion vermiculare* seca corresponde a sus mananos sulfatados (Usov et al., 1973).

A diferencia de los demás extractos, PP-1 y PP-2 no fueron totalmente solubles en agua en soluciones al 1%. En efecto, por disolución y posterior centrifugación (10 min a 9000 xg), se obtuvo un residuo de 2-3% en masa.

Es de destacar que PP-1 se obtuvo una segunda vez, también a partir del material de 2006, cuando se necesitó mayor masa para análisis: en ese caso se partió de 140 g de alga y se obtuvieron 40,3 g (28,8 %) de PP-1; dicho rendimiento indicó la reproducibilidad del procedimiento.

3.1.1. Análisis de monosacáridos componentes de los extractos

Se hidrolizó cada uno de los extractos - PD, PDbis y PP - y se analizó su composición en monosacáridos, previa derivatización a sus acetatos de alditoles. La corrida en cromatografía gaseosa se realizó en todos los casos contra un standard que contenía ramnosa (Ram), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xil), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glc) también derivatizados a los acetatos de alditoles, para comparar los tiempos de retención. Luego, la identidad de los monosacáridos se confirmó por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (espectros en Anexo II).

La Tabla 4 muestra los porcentajes molares hallados, y entre paréntesis se menciona los rendimientos, ya expuestos en Tablas 1 y 2, a fin de facilitar la lectura de los datos.

Tabla 4. Composición en monosacáridos (% molar) de los productos de diálisis (PD-PDbis) y de los productos de precipitación (PP) aislados a partir de extracciones acuosas a *N. helminthoides*.

Composición en monosacáridos (% molar)							
Producto (rendimiento %)	Man	Xil	Gal	Glc	Ram	Fuc	Ara
PD-1(20,0)	87	7	4	1	tr ¹	tr	tr
PD-2 (2,2)	51	21	16	5	2	1	4
PD-3 (0,6)	53	20	22	4	tr	tr	tr
PP-1(28,3)	88	5	3	3	tr	--	1
PP-2 (5,1)	64	24	7	3	tr	tr	2
PP-3	53	40	7	tr	tr	--	--
PD-1bis (21,0)	87	9	2	1	tr	tr	tr
PD-2bis (2,6)	53	29	16	--	2	--	tr

¹ Porcentajes menores al 1% se consideraron trazas (tr).

De las composiciones se infirió la presencia mayoritaria de manosa en todos los extractos, y xilosa en segundo lugar (salvo en PD-3, que contiene porcentajes similares de xilosa y galactosa). Estos primeros datos dieron lugar a entrever la presencia de

mananos, xilanos y/o xilomananos como polisacáridos principales de la pared celular de *N. helminthoides*, al igual que se había descrito para otras Nematociales, y tal como se enumerara ampliamente en la Introducción.

Comparando los métodos de aislamiento, en la Tabla 4 se observa que las composiciones de PD-1 y PP-1 son muy similares. En cuanto a PD-2 y PP-2, por ambos métodos se observa que en una segunda extracción aumenta la relación xilosa:manosa, así como la proporción de xilosa respecto del total de monosacáridos. Por diálisis, además, se recupera mayor porcentaje de galactosa en este segundo extracto y también en PD-3, no teniendo su contraparte en los extractos PP. Los datos sugirieron, entonces, que una alta proporción del contenido de galactosa se perdería en las precipitaciones con isopropanol; asimismo, daría lugar a suponer la presencia de galactanos en estructuras independientes de mananos y/o xilomananos, como ya ha sido informado para *N. fastigiata* con el xilogalactano (Haines et al., 1990; Matulewicz et al., 1994). Con todo, fue mínimo el contenido de galactosa detectado respecto de la masa original de alga, otra característica diferencial de este orden de algas rojas.

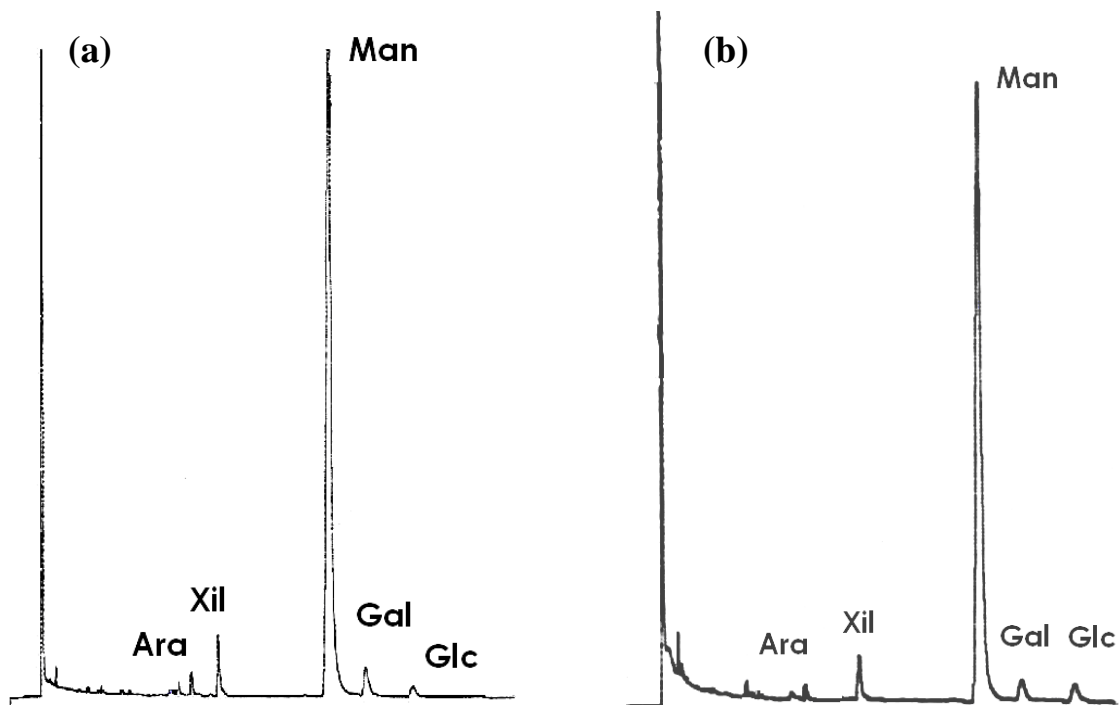


Figura 1. Cromatografías gaseosas de PD-1 (a) y PP-1 (b) luego de hidrólisis y derivatización de los monosacáridos a acetatos de alditoles.

La Fig. 1 muestra los cromatogramas de PD-1 y PP-1, en los cuales se aprecia el alto porcentaje de manosa respecto del total de monosacáridos, así como la similitud de ambos aislamientos.

La Fig. 2 muestra los cromatogramas similares de PD-2 y PP-2; en ambos se puede apreciar el mayor porcentaje de xilosa, la principal diferencia con los primeros extractos.

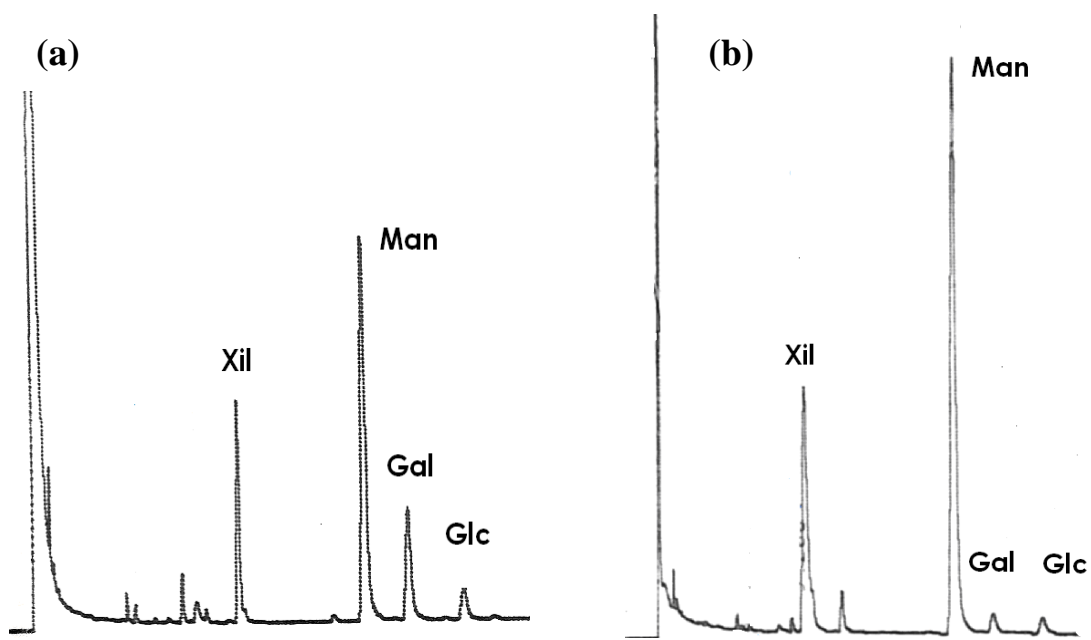


Figura 2. Cromatografías gaseosas de PD-2 (a) y PP-2 (b) luego de hidrólisis y derivatización de los monosacáridos a acetatos de alditoles.

De la etapa de aislamiento y caracterización de extractos crudos, se pudo concluir que ambas metodologías llevaban a la obtención de productos muy similares, con excepción del contenido de galactosa, que se perdería en la precipitación con isopropanol. Los productos resultantes estaban constituidos mayoritariamente por hidratos de carbono, y en segundo lugar grupos sulfato y proteínas. En todos, se confirmó la presencia mayoritaria de manosa, sugiriendo una biosíntesis principal de mananos sulfatados como polisacáridos matriciales de *N. helminthoides*.

3.1.1. Tinción con azul de toluidina

Se fijaron muestras del material algal de partida y de los residuos de las extracciones, y se incluyeron en resina Spurr. Luego de obtener cortes para microscopía, se trataron los portaobjetos con el colorante para polisacáridos ácidos “azul de toluidina” trabajando a pH=1,50.

La Fig. 3 (a) muestra dos fotos de un talo (no apical) antes de las extracciones. Como se observa, la tinción para polisacáridos sulfatados se encontraba concentrada en las paredes y era de un grosor e intensidad parejos.

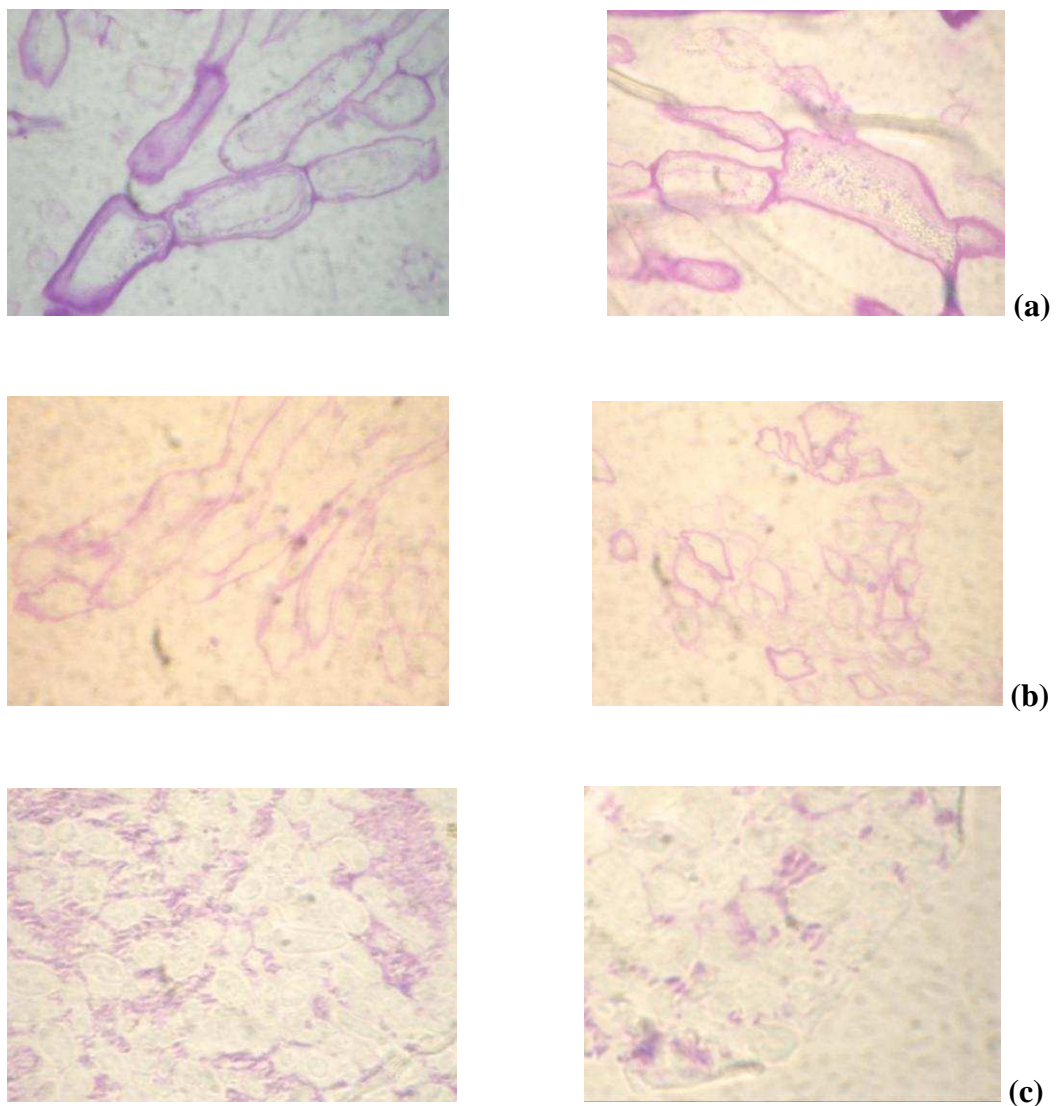


Figura 3. Tinción con azul de toluidina (pH=1,50) de (a) un talo no apical de *N. helminthoides*, (b) el residuo luego de una extracción acuosa, (c) el residuo luego de tres extracciones acuosas (1000x).

En **(b)** se observa lo obtenido para el residuo de la primera extracción; todavía se observan polisacáridos sulfatados en las paredes celulares, aunque la tinción es más débil, y la capa de la pared más fina que antes de la extracción.

Por último, en el residuo final de las tres extracciones **(c)**, las paredes celulares se observaron sin coloración, a la vez que una tinción acumulada fuera de las células, evidenciando el efecto de las extracciones y la permanencia de parte del producto en el luego de las tres extracciones.

Dicho residuo final se analizó en composición de hidratos de carbono. La hidrólisis se realizó con una metodología para hidrólisis de material insoluble (Morrison, 1988). Se halló como componente principal glucosa (49 % molar), seguido de galactosa (37 % molar), xilosa (10 % molar) y manosa (4% molar). La glucosa era esperable por hidrólisis de celulosa, componente de la pared fibrilar también en este grupo de algas; la galactosa, en tanto, podría provenir de estructuras sulfatadas, positivas para la tinción con azul de toluidina, que hubieran quedado retenidas en el residuo.

FRACCIONAMIENTO DEL PRIMER EXTRACTO

Al igual que la mayoría de las extracciones de algas en agua caliente, el primer extracto crudo de *N. helminthoides* fue el de mayor rendimiento. La estructura de sus polisacáridos era, por lo tanto, la más representativa de los existentes en la pared del alga.

Con el objetivo de estudiar la estructura química de los polisacáridos componentes, se planteó realizar un fraccionamiento para analizar separadamente la estructura cada fracción. Aun así, los objetivos del fraccionamiento fueron en realidad dos:

- optimizar el análisis estructural, disponiendo de fracciones y no de mezclas complejas
- obtener fracciones caracterizadas para determinaciones biológicas, que permitieran mejores aproximaciones estructura/actividad.

Las metodologías que se utilizaron para el fraccionamiento se basaron en diferencia de cargas - polisacáridos neutros y de diferentes grados de sulfatación - por un lado, y en diferencia de pesos moleculares, por el otro.

Se comenzó planteando un fraccionamiento de PD-1 por columna de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-25 (Cl⁻). De la elución con agua seguida de soluciones de NaCl 0,50, 1,00, 2,00, 3,00 y 4,00 M sólo se obtuvieron tubos positivos para fenol-sulfúrico en fracciones colectadas con NaCl 3,00 y 4,00 M. Sumando las masas liofilizadas de lo eluido con ambas soluciones, se lograban recuperar sólo el 30 % de la masa inicial. Esto evidenciaba que, aún con la mayor fuerza iónica, polisacáridos quedaban retenidos en la columna, probablemente debido a su alta densidad de cargas negativas.

Cuando se trató a PD-1 por columna de exclusión por tamaño (Sephacrose CL-4B), no fue posible lograr un fraccionamiento, aun colectando sólo 50 gotas por tubo. Se probó eluciones con agua, luego con NaCl 0,50 M y por último con NaCl 1,00 M, obteniéndose resultados similares, que no indicaban una clara separación en fracciones (se muestra en Fig. 4 el diagrama de elución obtenido con NaCl 1,00 M). Por último, tampoco se obtuvieron mejores resultados cuando se repitió la columna luego de un pre-

tratamiento de la muestra con EDTA 15 mM para quelar cationes divalentes y desarmar posibles agregados de polisacáridos.

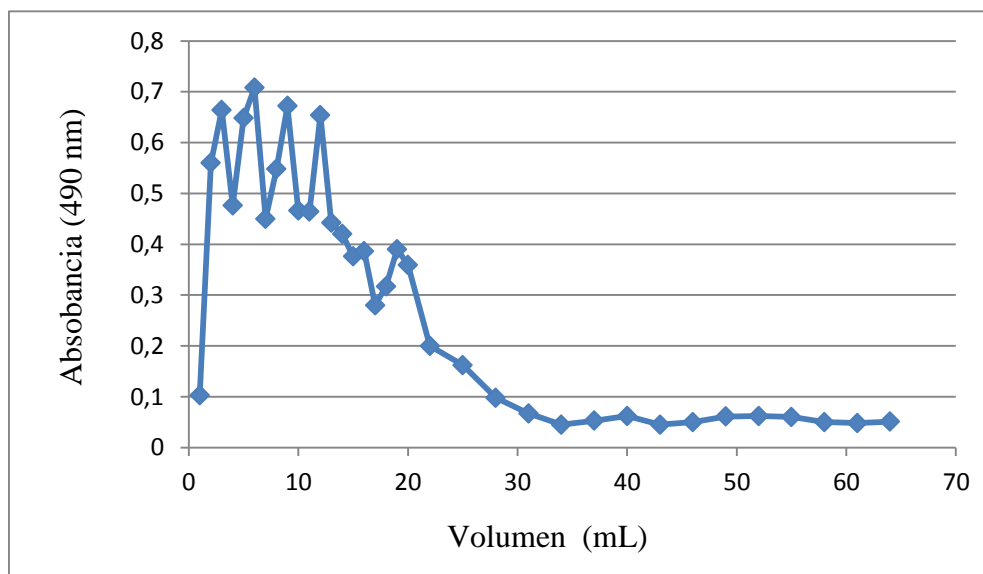


Figura 4. Elución con NaCl 1,00 M de columna de Sepharose CL-4B (25 mg PD-1/0,75 mL NaCl 0,50 M).

Si bien existen reportes de polisacáridos sulfatados fraccionados por esta metodología (Matsuhira et al., 1992), la misma no mostró ser adecuada para el sistema en estudio. Por ello, se procedió a ensayar el fraccionamiento que se detalla a continuación, basado en otra técnica ampliamente utilizada para polisacáridos de algas rojas (Usov et al., 1981; Caro et al., 1991) y de algas en general.

3.2. Obtención de fracciones de mananos y xilomananos sulfatados

Seis fracciones de polisacáridos sulfatados y un insoluble se obtuvieron por tratamiento de una solución de PP-1 con el detergente catiónico bromuro de hexadeciltrimetilamonio (Cetrimida) y tratamiento del precipitado con soluciones de distinta fuerza iónica.

Se eligió partir de 20,0 g del extracto PP-1, de masa más abundante que PD-1. Se precipitaron los polisacáridos cargados negativamente por agregado de una solución 10 % m/v del detergente, seguida de la resuspensión secuencial del precipitado en soluciones de molaridad creciente de NaCl (0,50 M a 4,00 M). Se aislaron las fracciones

solubles N1-N6 y el precipitado final remanente, N7, insoluble en NaCl 4,00 M. La Tabla 5 muestra la caracterización general de los siete aislamientos.

Tabla 5. Rendimiento y composición de siete aislamientos de polisacáridos sulfatados a partir de un primer extracto acuoso de *Nemalion helminthoides*.

Fracción	NaCl (M)	Rendimiento ¹ (%)	Sulfato (% NaSO ₃)	Proteína (%)	Peso Molecular (Da)
N1	0,50	(1,90) ² 1,10	8,9 ± 1,1	7,30 ± 1,5	3.300
N2	1,00	0,70	15,3 ± 1,5	3,50 ± 0,5	8.600
N3	1,50	0,80	18,2 ± 1,1	1,40 ± 0,2	13.600
N4	2,00	0,50	22,1 ± 0,8	1,75 ± 0,05	11.700
N5	3,00	(35,0) ² 21,0	22,7 ± 0,8	1,50 ± 0,7	42.800
N6	4,00	13,8	23,4 ± 0,9	2,00 ± 0,5	43.800
N7³	Insol. 4,00	20,0	13,1 ± 0,4	14,8	n.d.

¹ Respecto de masa original de PP-1 (20 g)

² Entre paréntesis se indica el rendimiento original, antes del segundo tratamiento con NaCl.

³ N7 fue insoluble en NaCl 4,00 M y es el precipitado final del fraccionamiento. Sus determinaciones de sulfato y proteína fueron realizados por métodos alternativos, para muestras insolubles.

N1 y N5 tuvieron originalmente un rendimiento mayor respecto de la masa de PP-1 (expresado entre paréntesis en la Tabla 5) pero resultaron de baja solubilidad en agua, sugiriendo que probablemente no se hubiera eliminado por completo el catión de cetrimida. Por lo tanto, se realizó un paso adicional repitiendo la disolución en NaCl y la extracción con 1-pentanol, con un rendimiento de aproximadamente 60 % en este paso. Se aislaron entonces fracciones solubles, con las que se trabajó para los análisis posteriores.

Como se observa en la Tabla 5, las fracciones resuspendidas en soluciones de mayor fuerza iónica -N5 y N6- fueron las más abundantes. Según los datos expuestos, en los primeros cuatro pasos del fraccionamiento el contenido de sulfato creciente habría sido el factor de disolución diferencial. Desde la fracción N4, el peso molecular sería el factor de separación principal; la tendencia entre N5 y N6 no fue evidente, siendo dos fracciones extremadamente similares en toda su composición. El contenido de proteínas resultó muy bajo para las fracciones N3 a N6, quedando la mayor parte de las mismas en N1 y en N7.

Cuando se analizó la composición en monosacáridos de cada una de las fracciones obtenidas (Tabla 6), se obtuvo que aquéllas de mayor rendimiento eran prácticamente puras en manosa, de forma consistente con la composición del extracto PP-1 del cual se aislaron. Las fracciones minoritarias presentaron porcentajes más altos de otros monosacáridos, tales como xilosa, galactosa o glucosa. Entre paréntesis se menciona los rendimientos finales, ya expuestos en Tabla 5, a fin de facilitar la lectura de los datos.

Tabla 6. Composición en monosacáridos (% molar) de las fracciones obtenidas a partir de un primer extracto acuoso de *Nemalion helminthoides*.

Fracción	Composición en monosacáridos (% molar)						
	Man	Xil	Gal	Glc	Ram	Fuc	Ara
N1 ¹ (1,10%)	27	22	33	9	2	4	3
N2 (0,70%)	36	25	32	3	2	2	--
N3 (0,80%)	64	24	8	2	--	2	tr
N4 (0,50%)	74	17	4	tr ²	2	1	2
N5 (21,0%)	100	tr	--	--	--	--	--
N6 (13,8%)	98	1	tr	tr	--	--	1
N7 (20,0%)	93	4	1	1	--	tr	1

¹N1 también contiene trazas de 3-O-metilxilosa y 3-O-metilgalactosa.

² Porcentajes menores a 1% fueron considerados trazas (tr).

Entonces, de un primer extracto de *N. helminthoides*, se obtuvieron seis fracciones solubles (N1 a N6) y un precipitado insoluble en NaCl 4,00 M (N7). De estas siete fracciones de polisacáridos, tres podrían definirse como “mananos” (N5, N6, N7), otras dos como “xilomananos” por su prevalencia de manosa pero apreciable contenido de xilosa (N3, N4) y, por último, dos fracciones más heterogéneas en cuanto a monosacáridos, con un considerable contenido de galactosa (N1, N2).

El sobrenadante de la precipitación con Cetrimida se liofilizó y se encontró que representaba un 25 % de la masa original de extracto; los rendimientos finales de las fracciones, en tanto, sumaban 58 % (Tabla 5), recuperándose en total 83 % de PP-1 con el fraccionamiento efectuado. De la composición en monosacáridos del sobrenadante se halló mayormente manosa y un 20 % de xilosa. Si bien la xilosa provendría de xilanos neutros (ver pág. 63), la abundancia de manosa podrían provenir de estructuras sulfatadas de bajo peso molecular, que por ello no precipitaron con Cetrimida.

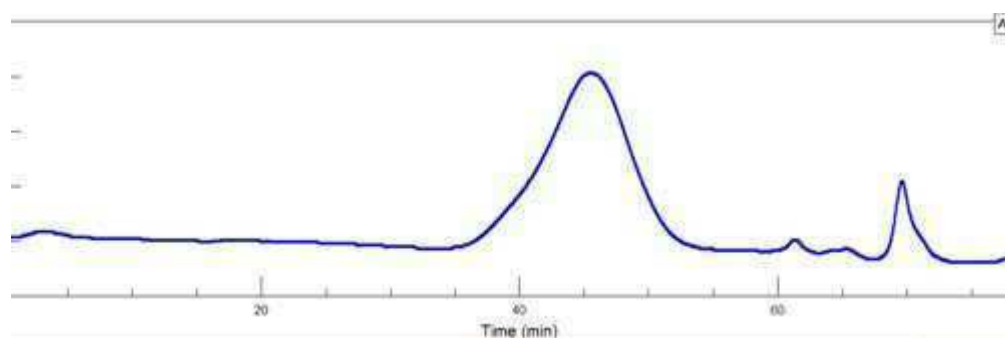
Del análisis de monosacáridos en las fracciones y los correspondientes rendimientos, se pudo concluir la gran prevalencia de mananos sulfatados en los polisacáridos solubles en agua de *N. helminthoides*.

3.2.1. Estudios de homogeneidad

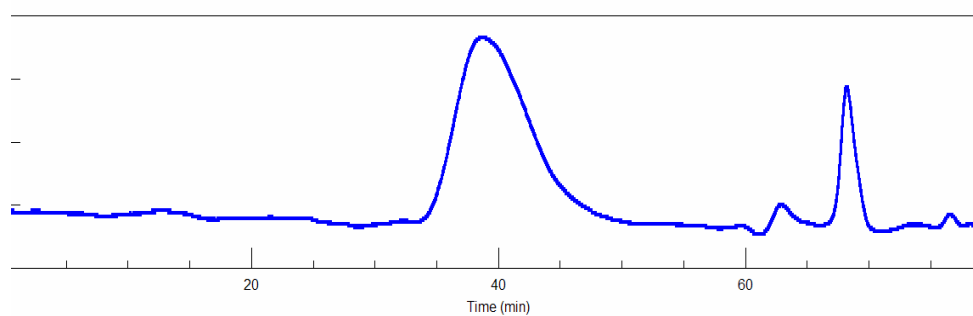
Se analizaron las fracciones N3-N6 por permeación de geles. Se obtuvo en todos los casos una distribución gaussiana de pesos moleculares, indicando una población homogénea de polisacáridos. La Fig. 5 muestra los perfiles obtenidos para N4, N5 y N6 (el pico a 70 min corresponde a sales del solvente).

Así como se había hecho para PD-1, se analizó el contenido de cationes inorgánicos, contraiones de los grupos sulfato, de las seis fracciones solubles. Todas, salvo N6, contenían Ca^{2+} como catión más abundante de entre los analizados, seguido de Mg^{2+} , Na^+ y por último K^+ . En el caso de N6, Na^+ fue el más abundante, seguido por Ca^{2+} con valores muy similares. Las altas molaridades de NaCl utilizadas hasta el aislamiento de N6 podrían haber generado un intercambio de cationes respecto de los presentes originalmente.

N4



N5



N6

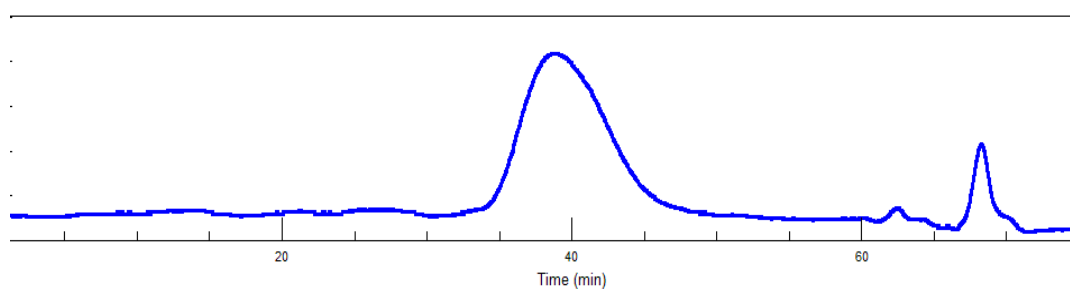


Figura 5. Cromatografías de permeación en gels (HPSEC-RID) de las fracciones N4, N5 y N6. El pico a 70 min corresponde a sales del solvente.



Figura 6. Aspectos fresco y liofilizado de talos gametofíticos de *Nemalion helminthoides*.



Figura 7. Aspecto del liofilizado correspondiente a la fracción N6, un manano sulfatado aislado de la pared celular de *Nemalion helminthoides*.

Cuando se necesitó obtener mayor masa de las fracciones N3 y N4 para las determinaciones de actividad biológica, el procedimiento se realizó una vez más a partir de otros 20 g de PP-1. Los rendimientos fueron similares, de 1,10 % y 0,70 %, respectivamente. El análisis en composición y pesos moleculares arrojó resultados similares (Tabla 7).

Tabla 7. Peso molecular y composición de los nuevos aislamientos de N3 y N4.

Fracción	(% NaSO ₃)	Proteína (%)	PM (Da)	Man	Xil	Gal	Glc
N3repetida	20,0	1,60	13.200	56	22	9	8
N4repetida	21,6	1,30	11.900	75	15	4	3

¹ N3 contiene también 2 % de Ram, 3 % de Fuc y trazas de Ara.

¹ N4 contiene también 2 % Fuc, 1 % de Ara y trazas de Ram.

Estas nuevas fracciones se utilizaron para todos los ensayos de inmunomodulación presentados en el Cap. 9. Se muestra el perfil de homogeneidad obtenido para N4 (Fig. 8), que fue muy similar al obtenido del primer fraccionamiento.

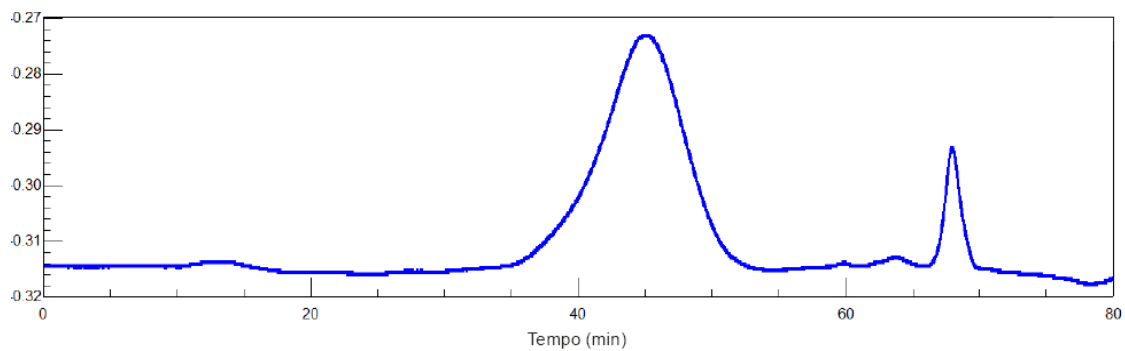


Figura 8. Cromatografía de permeación en geles (HPSEC-RID) de una nueva fracción N4. El pico a 70 min corresponde a sales del solvente.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE POLISACARIDOS DEL PRIMER EXTRACTO DE NEMALION HELMINTHOIDES

3.3. Análisis de fracciones mayoritarias.

Se analizaron en primera instancia las fracciones más abundantes (N5, N6 y N7), teniendo cuenta de que sus estructuras eran las más representativas de la pared celular del alga. Se trataba de mananos, como se expuso, cuya estructura – tipo de unión, configuración anomérica, posición de los grupos sulfato – se estudió en esta etapa por metilación, desulfatación-metilación y resonancia magnética nuclear (RMN).

3.3.1. Análisis por metilación y desulfatación-metilación

Se obtuvieron derivados metilados de composición constante luego de dos (N5, N7) o tres (N6) pasos de metilación, a partir de las sales de trietilamonio de las fracciones y por el método que utiliza NaOH-CH₃I y con un paso inicial con NaOH - (CH₃O)₂SO₂ para N6, dado que de otra forma se obtenía considerable submetilación.

Las fracciones metiladas se hidrolizaron, derivatizaron y analizaron por cromatografía gaseosa; los porcentajes molares obtenidos se presentan en la Tabla 8. La identidad de las unidades se confirmó por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (espectros en Anexo II).

Tabla 8. Composición en monosacáridos metilados de las fracciones N5, N6 y N7, y de sus respectivos derivados desulfatados.

Monosacárido	N5	N5DS	N6	N6DS	N7	N7DS
2,3,4-Me ₃ Xil ^a	-	2	2	2	1	tr ^a
2,3,4,6-Me ₄ Man ^b	2	2	2	3	-	tr
2,4,6-Me ₃ Man ^c	36	74	33	81	34	65
4,6-Me ₂ Man ^d	-	2	tr	2	tr	4
2,6-Me ₂ Man	22	11	19	7	22	16
2,4-Me ₂ Man	33	5	35	4	34	7
2-Me Man	3	2	3	-	2	4
4-Me Man	1	-	1	-	-	-
Man	3	2	3	1	7	4

^a 2,3,4-tri-O-metilxilosa^b 2,3,4,6-tetra-O-metilmanosa^c 2,4,6-tri-O-metilmanosa^d 4,6-di-O-metilmanosa, etc.

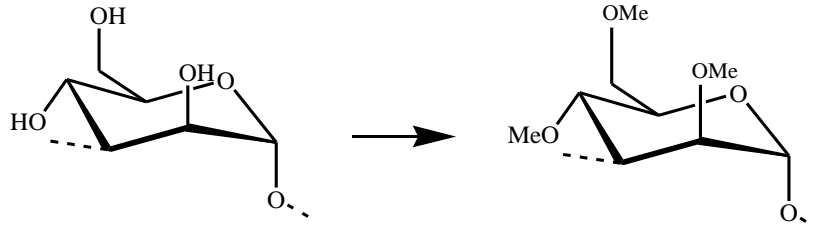
Como se observa en la Tabla 8, los patrones de metilación de los mananos N5, N6 y N7 fueron similares. En las tres fracciones, las unidades más abundantes fueron 2,4,6-tri-O-metilmanosa y 2,4-di-O-metilmanosa en porcentajes casi idénticos; en tercer lugar, también para las tres fracciones, se obtuvo un porcentaje similar y considerable de 2,6-di-O-metilmanosa.

La existencia del único trimetilado (2,4,6-Me₃Man) estaba sugiriendo al C-3 como implicado en la unión glicosídica, denotando una unión 1→3 entre manosas en todos los polisacáridos presentes. Asimismo, la metilación en posiciones 2, 4 y 6 indicó que se trataba de unidades piranósicas de manosa (Manp).

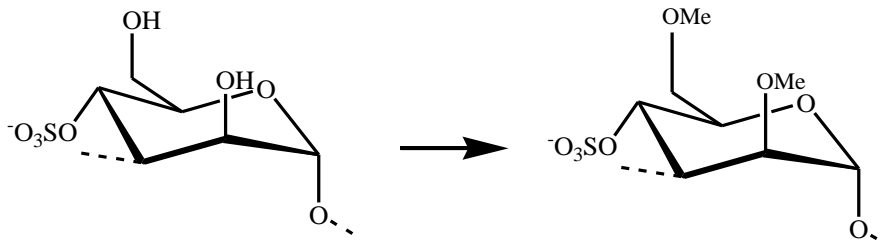
Las unidades dimetiladas, en tanto, estarían indicando que los ésteres sulfato se encuentran en C-6 (contenido considerable de 2,4-Me₂Man) y en C-4 (presencia de 2,6-Me₂Man). De los porcentajes respectivos se dedujo que las unidades de manosa sulfatadas en C-6 (Man 6S) serían más abundantes que las sulfatadas en C-4 (Man 4S),

así como sería mínima la proporción de disulfatadas en N5, N6 y N7 (en todas, bajo % de 2-O-metil-manosa).

(a)



(b)



(c)

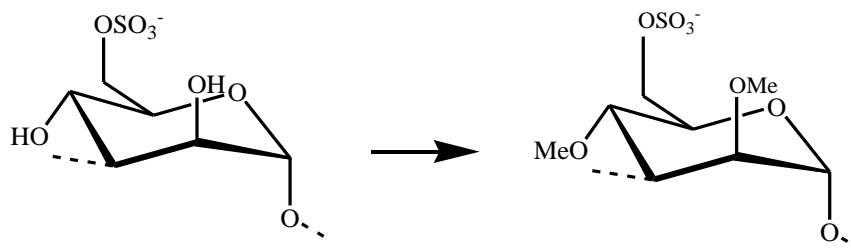


Figura 9. Residuos manosa de *N. helminthoides* antes y después de su metilación. (a) Manp sin sustituyentes; (b) Manp con sulfato en C-4; (c) Manp con sulfato en C-6. La mismas dan lugar a las tres unidades mayoritarias originadas por metilación de N5-N7: 2,4,6-Me₃Man (a); 2,6-Me₂Man (b) y 2,4-Me₂Man (c).

Dado que los grupos sulfato se hidrolizan durante la hidrólisis ácida, la posterior reducción y acetilación dan lugar al tipo de estructuras dimetiladas y sin sulfato detectables por cromatografía gaseosa.

Las unidades tetrametiladas 2,3,4,6-Me₄Man representan unidades de manosa terminales, pudiendo tratarse de puntas de cadena o bien de ramificaciones simples. El bajo porcentaje de estas unidades en las tres fracciones indicó fuertemente que se trataba en todos los casos de polisacáridos lineales.

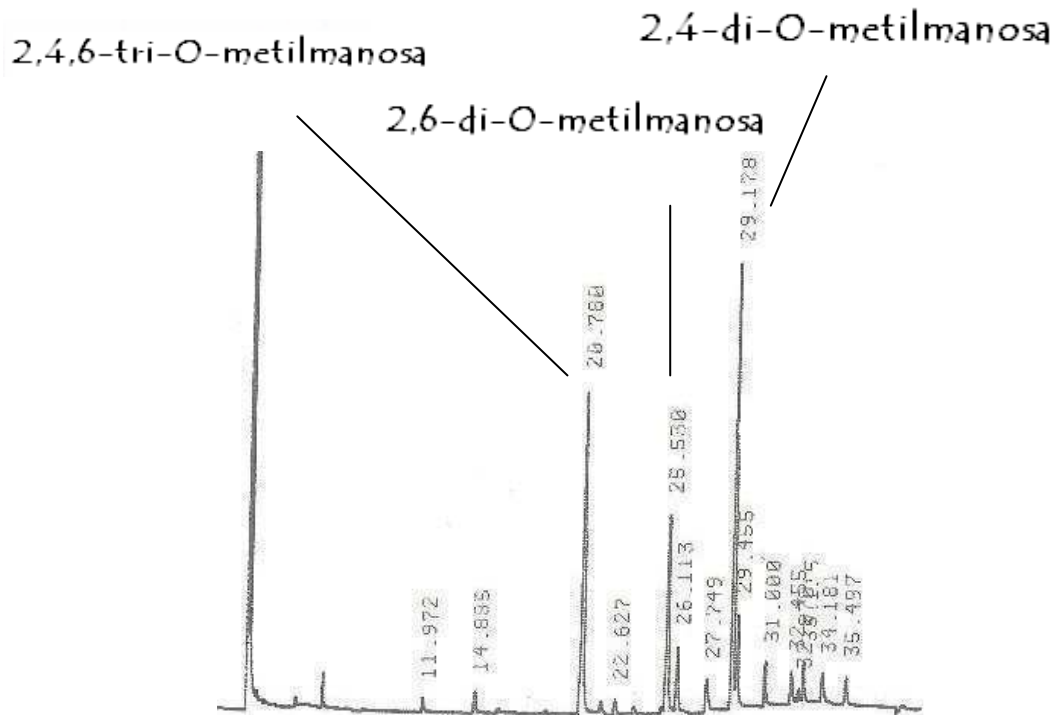


Figura 10. Cromatografía gaseosa de la fracción N6 metilada, hidrolizada y derivatizada a acetatos de alditoles.

Por último, el bajo contenido de xilosa en las fracciones se detectó en la metilación como 2,3,4-Me₃Xil, sugiriendo que estarían como ramificaciones del esqueleto de manosa y no insertados en la cadena.

Se analizaron las correspondientes fracciones desulfatadas (N5DS, N6DS, N7DS) con el fin de corroborar la posición de los grupos sulfato (Tabla 8). Las reacciones de desulfatación se efectuaron en un medio que hidrolizaba los ésteres de sulfato, pero no las uniones glicosídicas. Se lograron fracciones con un contenido final de sulfato 4-5 %.

De la composición en monosacáridos surgió que en las tres fracciones desulfatadas aumentó considerablemente el porcentaje de 2,4,6-Me₃Man, en detrimento de 2,4-Me₂Man y 2,6-Me₂Man. Este patrón de metilación fue acorde con la estructura

propuesta de uniones 1→3 con sulfatos en C-6 ó C-4. Se muestra en la Fig. 11 el cromatograma obtenido para N6DS.

La sustitución con sulfatos en C-4 ó en C-6, sin embargo, no es total en los polímeros. Un alto porcentaje de unidades manosa sin sulfatar se detectaron por metilación (% de 2,4,6-tri-O-metilmanosa en N5, N6 y N7).

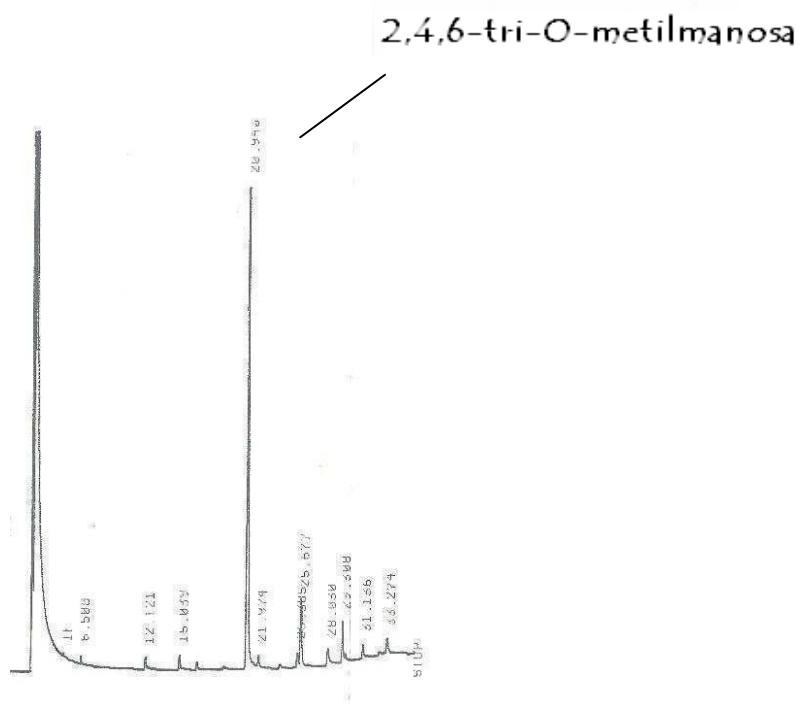


Figura 11. Hidrólisis y derivatización a alditoles acetilados de la fracción N6 desulfatada y metilada.

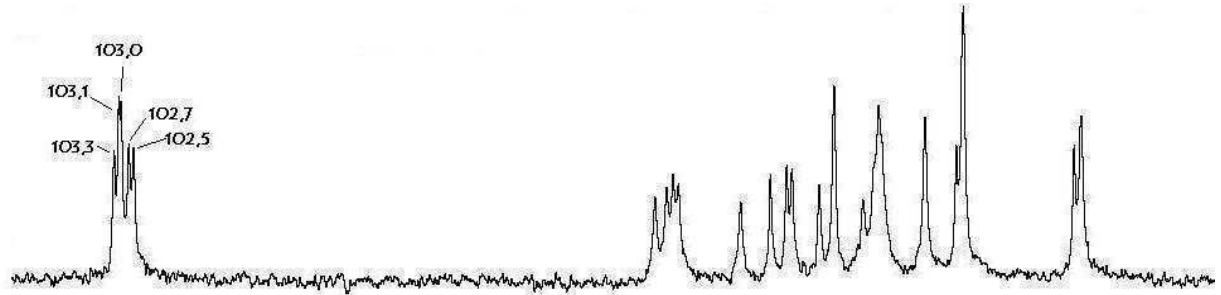
3.3.2. RMN

El análisis por RMN permitió conocer la configuración anomérica (α ó β) de las unidades de manosa. Además permitió corroborar el tipo de unión entre monosacáridos y sus sustituyentes.

Los espectros de RMN ^{13}C de N5 y N6 (Fig. 12) se registraron a 70 °C, en agua deuterada. Intentos previos de realizarlos a temperatura ambiente fueron infructuosos, dada la alta viscosidad y/o baja solubilidad de las muestras para las soluciones concentradas que se requieren en estos análisis (entre 20 y 30 mg/ mL); por ello, sólo se

obtuvieron señales claras cuando se trabajó a alta temperatura. El espectro de N7 también se registró a 70 °C con DMSO como solvente, por tratarse de una muestra insoluble en agua (Fig. 13).

N5



N6

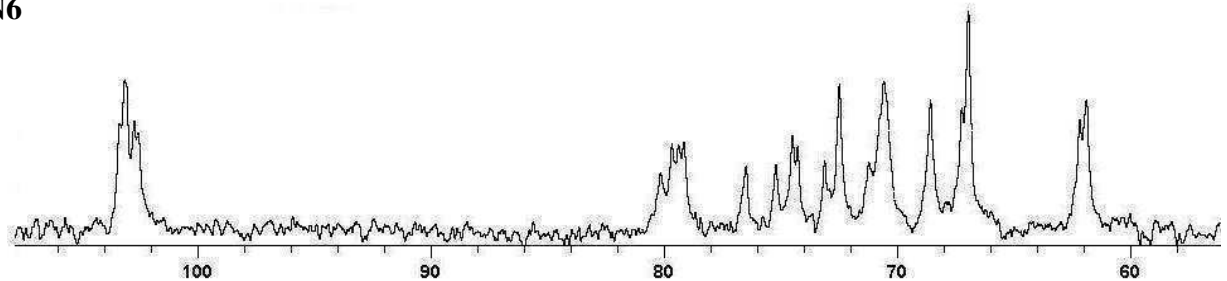


Figura 12. Espectros de RMN ^{13}C de los mananos sulfatados N5 y N6.

Los espectros RMN ^{13}C de las fracciones principales resultaron muy similares (Figs. 12 y 13), consistentemente con los resultados de composición y metilación. En el espectro de N7 se observaron además las señales del contraión de Cetrimida en la región de 10-30 ppm (recortada en la figura). Además, todas sus señales sufrieron un desplazamiento a campos más bajos originado por el cambio de solvente, DMSO en lugar del agua.

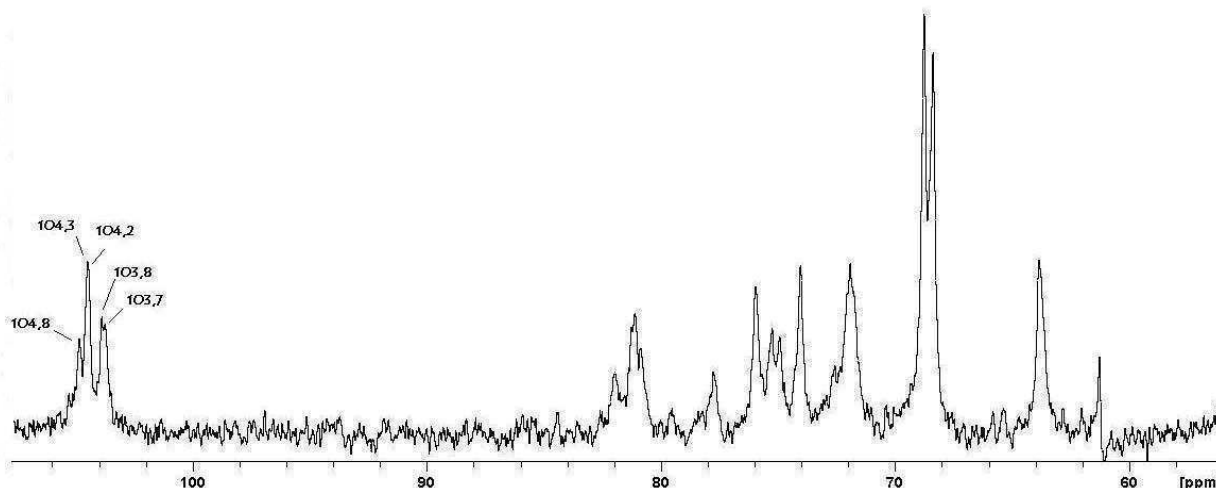


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C del precipitado N7, prácticamente puro en manosa

La Tabla 9 muestra la asignación de señales para N6, que resultó válida para las tres fracciones en estudio, tal como se desprende de la similitud de los espectros. La asignación se realizó a partir de los (1→3)- α -D-mananos de *N. fastigiata* (Matulewicz y Cerezo, 1987b) y de los reportes sobre metilmanósidos con énfasis en los desplazamientos químicos provocados por la posición de sulfatación (Usov et al., 1975c), ambas Tablas detalladas en el Anexo I.

En cuanto a las señales de manosa, se encontró más de una señal para cada carbono, provenientes de las diferentes unidades del monosacárido ya evidenciadas por metilación: manosa sin sulfato (Man), con sulfato en C-4 (Man 4S) ó en C-6 (Man 6S).

Tabla 9. Asignación de señales de espectro ^{13}C RMN del (1→3) manano N6 nativo y desulfatado (N6DS).

Unidad ¹	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
N6						
α -D-Man	103,1-103,0	70,6	79,4	67,0	74,5	61,9
α -D-Man 6S	103,3	70,7	79,1	67,2	72,5	68,6
α -D-Man 4S	102,7-102,5	73,1	76,5	75,2	74,3	62,2
N6 desulfatada						
α -D-Man	103,0	70,5	79,8	67,1	74,6	61,9

¹ α -D-Man: α -D-manosa; α -D-Man 6S: α -D-manosa 6-sulfato; α -D-Man 4S: α -D-manosa 4-sulfato.

Las señales en la zona anomérica indicaron que se trataba de α -manosas, dado que anómeros β se esperarían a 99-100 ppm. También, en consonancia con los resultados de metilación, las señales evidenciaron uniones 1 \rightarrow 3 entre monosacáridos.

La existencia de residuos diferentes de manosa dentro del polímero conllevaría la presencia de distintas díadas en proporciones aleatorias e impredecibles (M: manosa):



Las distintas díadas pueden provocar, por efecto de cambios de entorno, variaciones en los desplazamientos químicos para carbonos de una misma unidad.

En la zona anomérica, en efecto, las dos señales a 103,0 y a 103,1 ppm se atribuyeron a α -D-Man enlazadas por la posición 3 a α -D-Man 6S ó a α -D-Man 4S, respectivamente. Con un criterio similar, las señales a 102,7 y a 102,5 corresponderían a unidades de α -D-Man 4S unidas ya sea a α -D-Man ó a α -D-Man 6S.

Tal como se expone en la Tabla 9, las señales a 79,4 y 79,1 ppm se asignaron al C-3 de unidades α -D-Man y α -D-Man 6S, de acuerdo con lo propuesto por los compuestos modelo. En esta región del espectro, quedaron sin asignar dos señales a 80,1 and 79,6 ppm; éstas podrían deberse al C-3 de las dos díadas de α -D-Man 4S antes mencionadas. Con el mismo razonamiento, la señal a 71,2 ppm podría atribuirse al C-2 de unidades de α -D-Man (ó α -D-Man 6S) unidas a residuos sulfatados en C-4.

Cuando se registró el espectro de la fracción N6 desulfatada (Fig. 14) se encontraron efectivamente sólo las seis señales correspondientes a los carbonos de manosas sin sustituyentes; no habiendo en este polímero desulfatado posibilidad de diferentes díadas. Los desplazamientos químicos también se presentan en la Tabla 9 y son prácticamente las mismas que las encontradas en el espectro de N6 para \rightarrow 3)- α -D-Man.

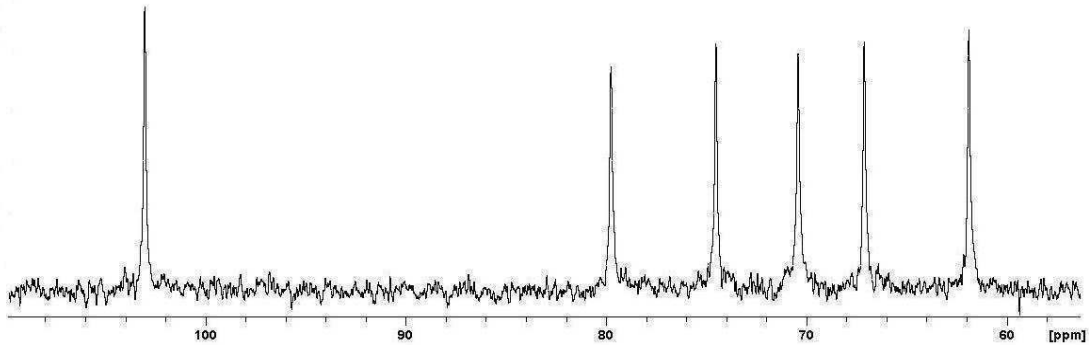


Figura 14. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción N6 desulfatada

N5- N7 presentaban entonces una estructura común, tratándose de (1→3)- α -D-mananos sulfatados en C-4 ó C-6, con un promedio de un sustituyente sulfato por cada ~ 4 unidades de manosa - inferido por metilación y por el contenido de sulfato - y un mínimo de unidades disulfatadas (2-4%). Los análisis estructurales indicaron también que se trataba de polisacáridos lineales. Se puede concluir que la descrita (Fig. 15) es la estructura más abundante en la matriz de pared de *N. helminthoides*.

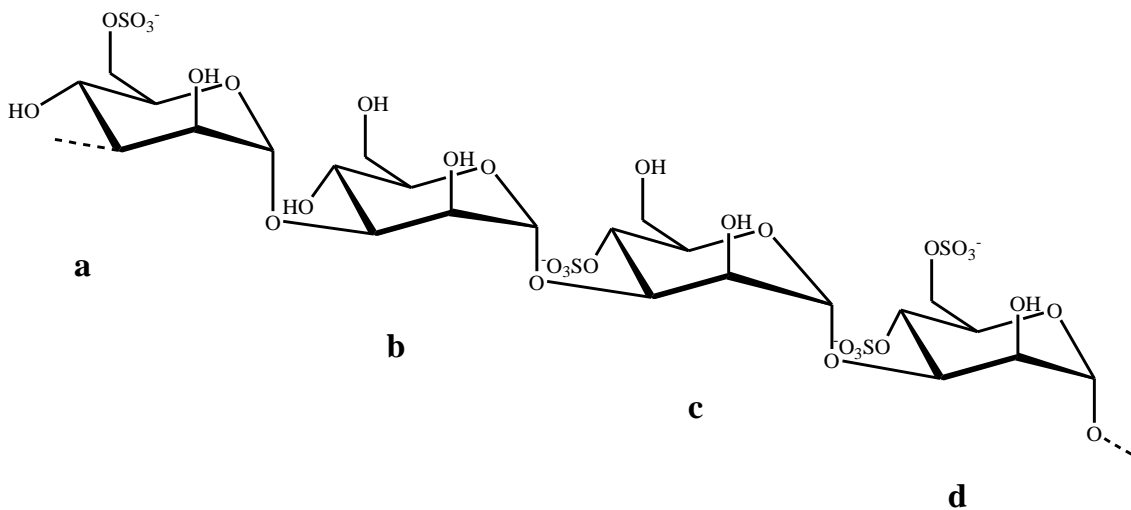


Figura 15. Segmento de (1→3)- α -D-manano con las cuatro unidades presentes en las fracciones mayoritarias de *N. helminthoides*: (a) Man 6S, (b) Man, (c) Man 4S, y la mucho menos abundante (d) Man 4S 6S.

Las dos fracciones solubles - N5 y N6 – poseían un peso molecular promedio similar de 43-44 kDa, por lo que su grado de polimerización se estimó en aproximadamente 200. Se determinó la rotación óptica de estas dos fracciones mayoritarias, obteniéndose valores diferentes, $[\alpha]_D = + 80,5^\circ$ (c 0,21, 0,1 M NaCl) para N5 y $[\alpha]_D = + 58,4^\circ$ (c 0,08, 0,1 M NaCl) para N6. Los valores positivos confirmaron los anómeros α previamente inferidos por RMN. La diferencia de rotación entre N5 y N6 podría explicar en parte por qué ambos mananos se fraccionan separadamente, pese a su composición, grado de sulfatación y peso molecular tan similares. Una distribución diferente de grupos sulfato entre ambos mananos podría provocar distintas conformaciones en solución y, por lo tanto, una diferente solubilidad en NaCl y un diferente poder rotatorio.

3.4. Análisis estructural de fracciones minoritarias: xilomananos sulfatados

Se continuó el estudio estructural analizando las fracciones de bajo rendimiento N3 (0,80 %) y N4 (0,50 %). De entre las fracciones minoritarias se concedió mayor énfasis a las mencionadas, que resultaron de interés en los estudios de actividad biológica presentados en la Sección II. Ambas fracciones contenían porcentajes considerables de xilosa en su composición, por lo que el objetivo principal consistió en determinar la posición de las unidades xilosa. El análisis se realizó por RMN ^{13}C y por metilación; también, se analizaron por ambos métodos sus productos de degradación de Smith.

3.4.1. Análisis por RMN

Los espectros de RMN ^{13}C de N3 y N4 se registraron a 70 °C. Se obtuvieron espectros muy similares, con las mismas señales detectadas para N5-N7 y señales adicionales propias de residuos β -D-xilopiranosilo, y de unidades de manosa y manosa 6-sulfato ramificadas en C-2 por xilosa. En N3, además, se detectaron señales débiles propias de agaranos.

La Fig. 16 presenta los espectros correspondientes, y la Tabla 10 la asignación de señales del de N4, que se llevó a cabo de acuerdo a lo informado para xilomananos de *N. fastigiata* (tabla en Anexo I).

En efecto, se observó en la región anomérica del espectro de N4 tres señales de baja intensidad a 100,8 ppm, 101,4 ppm y 104,2 ppm, adicionales a las señales de (1 \rightarrow 3) α -D-manosas con sulfatación en C-4 ó C-6, y señalizadas en la Fig. 16. La señal a 104,2 fue asignada a unidades de β -D-xilopiranosilo; el pico a 100,8, en tanto, fue asignado al C-1 de α -D-manosa con β -D-xilosa enlazada por C-2 (α -D-Man 2Xil) y la de 101,4 al C-1 de manosas sulfatadas en C-6 con xilosa en C-2 (α -D-Man 6S 2Xil).

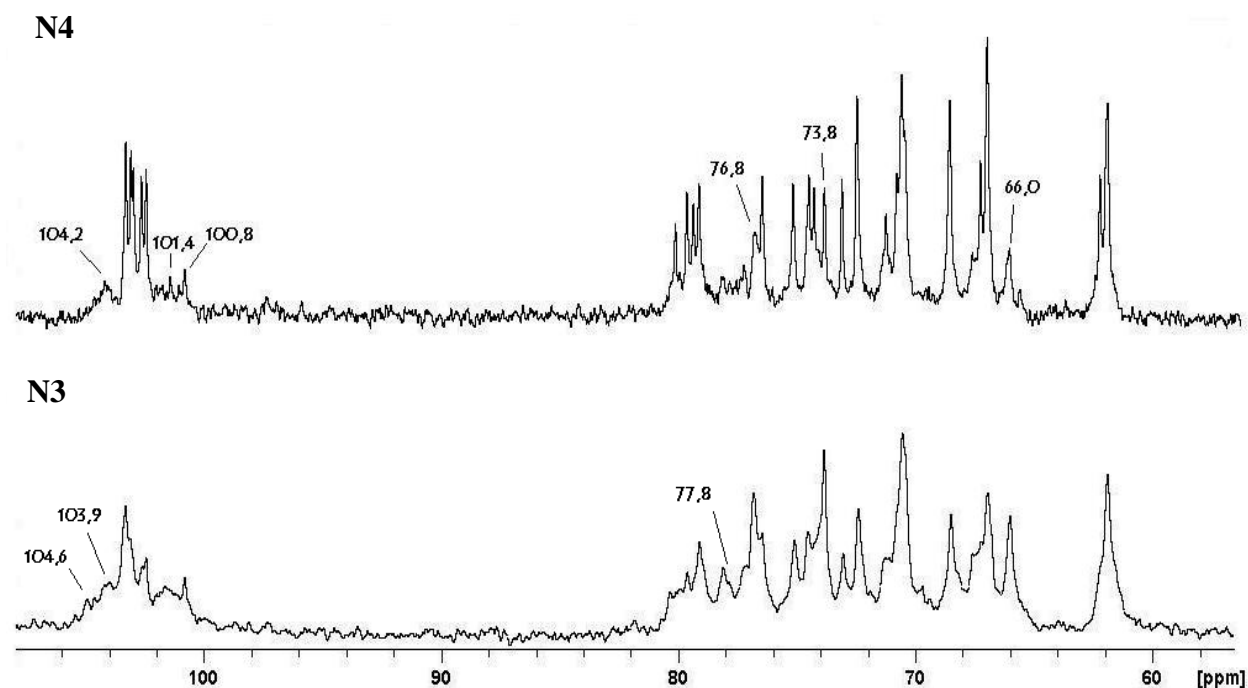


Figura 16. Espectros de RMN ^{13}C de las fracciones N4 y N3: (1 \rightarrow 3)- α -D-mananos sulfatados en C-4 ó C-6 y sustituidos con β -D-xilopiranosilo en C-2. En el espectro de N4 se indican las señales propias de las ramificaciones, mientras que en el de N3 se destacan las señales adicionales que sugirieron presencia de agaranos.

Tabla 10. Asignación de señales de espectro ^{13}C RMN del xilomanano N4.

Unidad ¹	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Man	103,0-103,1	70,6	79,4	67,0	74,5	61,9
α -D-Man 6S	103,3	70,8	79,1	67,2	72,4	68,5
α -D-Man 4S	102,7-102,5	73,1	76,5	75,1	74,3	62,2
α -D-Man 2Xil	100,8	78,9	79,6	67,6	74,5	61,9
α -D-Man 6S 2Xil	101,4	78,9	78,9	67,6	72,4	67,6
β -D-Xil	104,2	73,8	76,8	70,4	66,0	---

¹ α -D-Man 2Xil: α -D-manosa 2-xilosa; α -D-Man 6S-2Xil: α -D-manosa 6-sulfato 2-xilosa; β -D-Xil: β -D-xilosa

De las señales correspondientes al resto de los carbonos, fueron distintivas las señales a 66,0 ppm (C-5 de β -D-Xil), 73,8 ppm (C-2 de β -D-Xil) y 76,8 ppm (C-3 de β -D-Xil), también señalizadas en el espectro de N4 de la Fig. 16.

Dada la similitud de los espectros, la asignación de señales del espectro de N3 fue esencialmente la misma que la presentada en la Tabla 10. Sin embargo, dado su mayor contenido de xilosa, las correspondientes señales se apreciaron intensificadas; en particular se observó en la señal a 66,0 ppm y en las tres de la región anomérica.

El esquema general de los residuos ramificados propuestos tanto para N3 como para N4 se muestra en la Fig. 17:

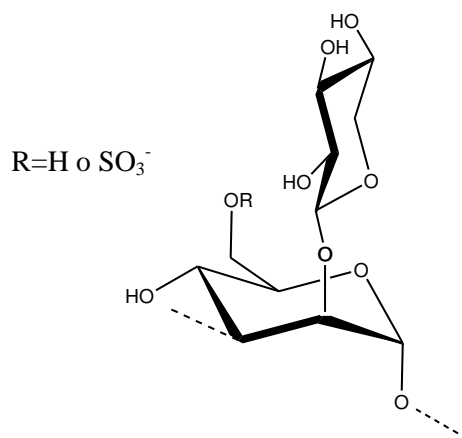


Figura 17. Las dos unidades de (1→3) α -D-Manp ramificadas en C-2 por β -D-Xilp presentes en los xilomananos N3 y N4, según la estructura propuesta.

Además, en el espectro de N3 se distinguieron señales adicionales que darían cuenta de una estructura de tipo agarano para el 8% molar de galactosa de la fracción. De hecho, la región anomérica es más compleja que la de N4, por la presencia de galactosas. La Tabla 11 a continuación muestra la asignación completa de la díada β -D-Gal→ α -L-Gal (ver Introducción), realizada de acuerdo a reportes previos de Lahaye et al.(1985) y Usov et al. (1997).

Tabla 11. Asignación de señales del agarano poco abundante presente en N3.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
3) β -D-Gal	103,9	71,0	80,7	68,8	75,6	61,4
4) α -L-Gal	100,9	69,3	69,7	79,3	72,2	61,2

Las señales fueron débiles: 103,9; 71,0; 80,7; 68,8 y 75,6 ppm (C-1 a C-5 de β -D-galactosa), 69,3 y 69,7 ppm (C-2 y C-3 de α -L-galactosa), acordes con la baja incidencia de galactosa en la estructura de N3, o bien las restantes se consideraron superpuestas en picos anchos de señales del xilomanano. Además de la díada básica sin sustituyentes, es probable que unidades β -D-Gal se encuentren sulfatadas o ramificadas con xilosa en C-6 (señal indicada en espectro a 104,6 ppm) y unidades α -L-Gal sulfatadas en C-2 (señal a 77,8 ppm).

3.4.2. Análisis por metilación

Los derivados metilados obtenidos de N3 y N4 se presentan en la Tabla 12, en paralelo con la metilación de sus productos de degradación de Smith (N3-Smith y N4-Smith). Se utilizó esta metodología, mediante la cual se fragmentan uniones covalentes entre carbonos con -OH vecinales, con el objetivo de eliminar las unidades xilosa sin afectar las unidades de manosa que, al estar implicadas en uniones 1 \rightarrow 3, no contienen tales -OH (Fig. 18); las ramificaciones simples de xilosa sugeridas por RMN sí tendrían zonas de fragmentación.

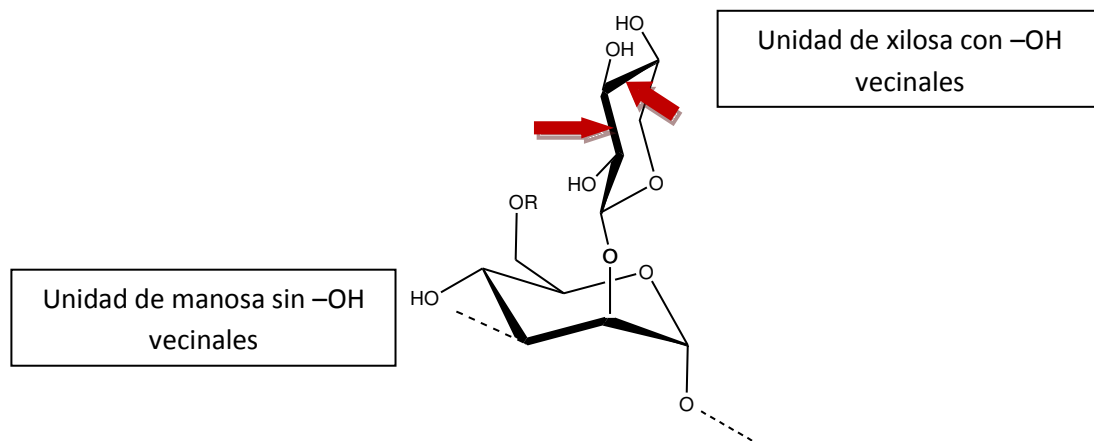


Figura 18. Partiendo de las estructuras ramificadas presentes en N3 y N4, se indican con flechas las uniones susceptibles a oxidación con periodato y degradación de Smith.

En efecto, luego del tratamiento y de la hidrólisis de los productos se detectaron por cromatografía gaseosa sólo trazas de xilosa tanto en N3-Smith como en N4-Smith. El impacto de esta técnica sobre la estructura completa del polisacárido se presenta y

discute en el Cap. 4; en esta sección se utiliza sólo como herramienta para analizar la posición de las unidades de xilosa.

Tabla 12. Composición en monosacáridos metilados de las fracciones N3 y N4, y de sus derivados sin xilosa, N3-Smith y N4-Smith.

Monosacárido	N3^a	N3-Smith^b	N4^c	N4-Smith^d
2,3,4-Me ₃ Xil	17	tr ^e	11	---
2,3,4,6-Me ₄ Man	1	2	2	2
2,4,6-Me ₃ Man	10	22	19	31
2,4,6-Me ₃ Gal	2	tr	--	tr
2,3,6-Me ₃ Gal	2	1	Tr	tr
4,6-Me ₂ Man	7	2	7	tr
2,6- Me ₂ Man	15	16	17	18
6-Me Man	2	tr	1	tr
2,4- Me ₂ Man	15	30	27	32
2-Me Man	5	4	3	3
4-Me Man	10	1	6	tr
Man	7	2	3	1
Gal	4	1	1	tr
Glc	3	2	3	2

^a N3 contiene también trazas de 2,6- y 2,3-Me₂ Gal, 2% de Xil, 2% de 2,3-Me₂ Xil y 2% de 2,4- Me₂ Xil

^b Sobre un total de 83%. Contiene también 3% de 2,6-Me₂ Gal, trazas de Xil, de 2,3- Me₂ Gal y 2,3,4,6-Me₄ Gal.

^c N4 contiene también trazas de 2,4- Me₂ Xil y 2,3,4,6- Me₄ Gal.

^d Sobre un total de 89%. Contiene también trazas de 2,3- Me₂ Xil y de 2,4- Me₂ Xil.

^e Porcentajes menores a 1% se consideran trazas (tr).

De acuerdo a los altos porcentajes de 2,3,4-tri-O-metilxilosa obtenidos a partir de N3 y N4 (Tabla 12), se verificó que las xilosas se encontraban mayoritariamente como ramificaciones simples, así como se confirmó su forma piranósica. La presencia de bajos contenidos de 2,3-di-O-metilxilosa y 2,4-di-O-metilxilosa sugirió además que cadenas cortas laterales podían constituir también las ramificaciones, en mínima proporción.

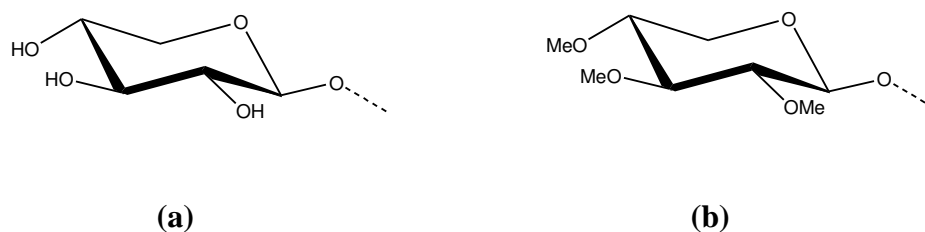


Figura 19. Estructura de ramificaciones simples de β -D-xilopiranososa antes (a) y después (b) de su metilación, dando como producto 2,3,4-tri-O-metilxilosa, unidad abundante en N3 y N4 metiladas.

La presencia de la unidad dimetilada 4,6-di-O-metilmanosa, tanto en N3 como en N4, indicó una sustitución en C-2, que no se había visto en la metilación de mananos, y fue consistente con lo observado por RMN para la posición de ramificación. La identidad de este monosacárido parcialmente metilado, así como de todos los presentados en la Tabla 12, se confirmaron por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (espectros se muestran en Anexo II).

Los productos de degradación de Smith metilados dieron cuenta una vez más de la remoción de xilosas y, tal como se aclara en la Tabla 12, se normalizó la comparación de manosas metiladas sobre un total que no fue del 100%, sino la diferencia con el % de xilosa de la fracción nativa metilada.

En ambos productos de Smith, se observó una importante disminución de las unidades de 4,6-di-O-metilmanosa y 4-O-metilmanosa, en paralelo con los aumentos de 2,4,6-tri-O-metilmanosa y de 2,4-di-O-metilmanosa. Tal patrón de metilación, con sustitución del carbono 2 recién luego de remover xilosas, sugirió nuevamente la posición de las ramificaciones en C-2. También, que de las tres unidades de manosa presentes - Man, Man 4S y Man 6S - los residuos ramificados serían Man y Man 6S, al igual que se había inferido por RMN. A diferencia de los nombrados, los % de 2,6-di-O-metilmanosa (Man 4S) permanecieron casi constantes luego del tratamiento de Smith, y también la 6-O-metilmanosa.

Por último, como con los mananos antes presentados, en N3 y N4 las unidades disulfatadas fueron poco abundantes (4-5% de 2-O-metilmanosa) y no ramificadas con xilosa, vista la constancia de sus porcentajes luego de la degradación de Smith.

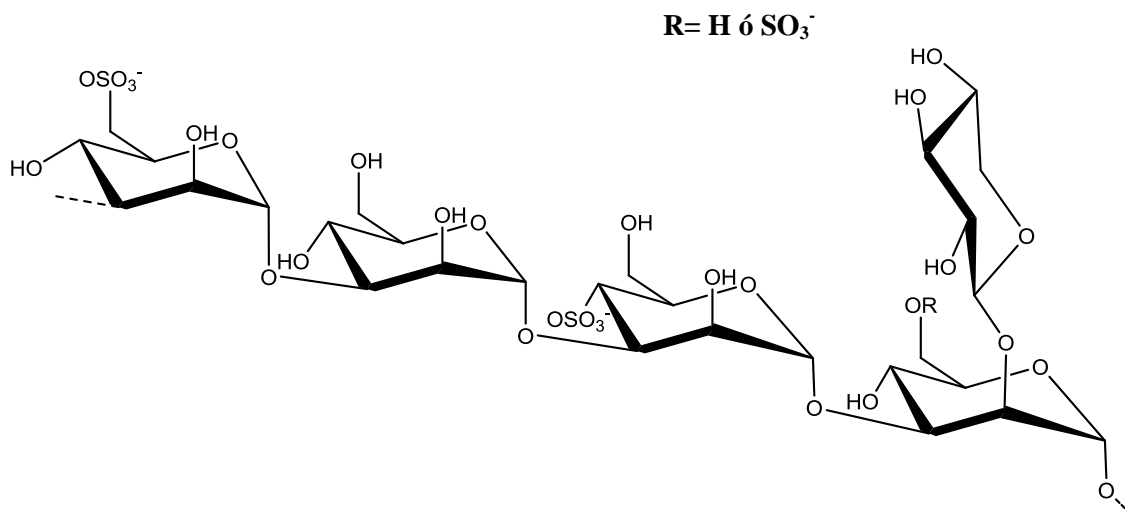


Figura 20. Ejemplo de un segmento de polisacárido acorde a la estructura propuesta para los xilomananos de *N. helminthoides*: un residuo xilosa por cada 4-5 manosas, enlazado por C-2 a unidades ManóMan 6S, y un grupo sulfato cada 3-4 monosacáridos.

Entonces, habiendo obtenido derivados sin xilosa, la técnica de metilación de las fracciones nativas y modificadas permitió complementar el análisis de RMN, evidenciando la posición las ramificaciones, así como el patrón de sulfatación en C-4 y/ó C-6, al igual que había sido determinado para las fracciones mayoritarias.

De los datos de metilación surgió además que las unidades de galactosa - más abundantes en N3 - estarían en estructuras con uniones (1→3) y (1→4) en proporciones similares (2 % de 2,4,6-tri-O-metilgalactosa y 2 % de 2,3,6-tri-O-metilgalactosa en N3). Estas uniones fueron consistentes con las señales de la díada β -D-Gal→ α -L-Gal sugerida por RMN. Además, el contenido de galactosa disminuyó parcialmente en N3-Smith, muy posiblemente por degradación de residuos unidos por C-4.

Las ramificaciones de xilosa en C-2 en *N. helminthoides* ubica a los xilomananos de esta especie dentro de la estructura más frecuentemente descrita para Nemiales, independientemente del patrón de sulfatación de las manosas. Siguiendo ese mismo esquema general, en el caso de *Liagora valida*, se informó una muy baja proporción de ramificaciones en C-6, como cadenas cortas de (1→4)- β -D-xilosa o bien 3-O-metil- β -D-xilosa.

En este estudio, las señales que podrían sustentar ramificaciones también en C-6 (C-5 desplazado a ca. de 72,5 ppm y C-6 de 69,1; Usov y Dobkina, 1991) fueron coincidentes con otras asignaciones; particularmente, las señales débiles a 69,3 y 69,7 ppm (C-2 y C-3 de unidades de α -L-galactosa), y el pico ancho a 72,4 ppm. De los datos de metilación (Tabla 12), la posibilidad de xilosilación en C-6 no podría descartarse: el % de 2,4,6-tri-O-metilmanosa de N3-Smith y N4-Smith se vio enriquecido respecto de las fracciones nativas en un porcentaje algo mayor a lo explicable por la reducción de 4,6-di-O-metilmanosa. En cualquier caso, sería en muy baja proporción la sustitución en C-6, no afectando la estructura general propuesta.

De acuerdo a los % molares de monosacáridos expuestos en la Tabla 6, la relación Man:Xil, puede considerarse de $\sim 4:1$ para N3, dando cuenta de una ramificación por cada ~ 4 unidades de manosa; en el caso de N4, dicha relación es más cercana a $\sim 5:1$.

3.5. Análisis por RMN ^{13}C de las fracciones minoritarias N1 y N2

Se registraron los espectros de RMN ^{13}C a 70 °C de las dos fracciones más ricas en galactosa, N1 y N2, también de bajo rendimiento. El estudio completo del galactano no formó parte de la presente Tesis; sumado a su bajo rendimiento, ni N1 ni N2 se mostraron activas contra virus (Cap.8).

Como se observa en la Fig. 21, se trata de espectros complejos cuyas regiones anoméricas ya indicaban una gran diferencia con los anteriores, con señales muy intensas a 103,9 (β -D-Gal enlazada por 3), 100,9 (α -L-Gal enlazada por 4), de las cuales se desprendió la presencia de una estructura de tipo agarano, que ya había sido evidenciada en el estudio de N3, y fue demostrada en *N. fastigiata* (ver Introducción).

Además, las señales correspondientes a Man (103,0 ppm), Man 4S (102,7 ppm) y Man 6S (103,3 ppm) se detectaron mucho más débiles que la correspondiente a Man 6S 2Xil (101,4 ppm), indicando que los contenidos similares de xilosa y manosa se encontrarían enlazadas en la unidad sulfatada.

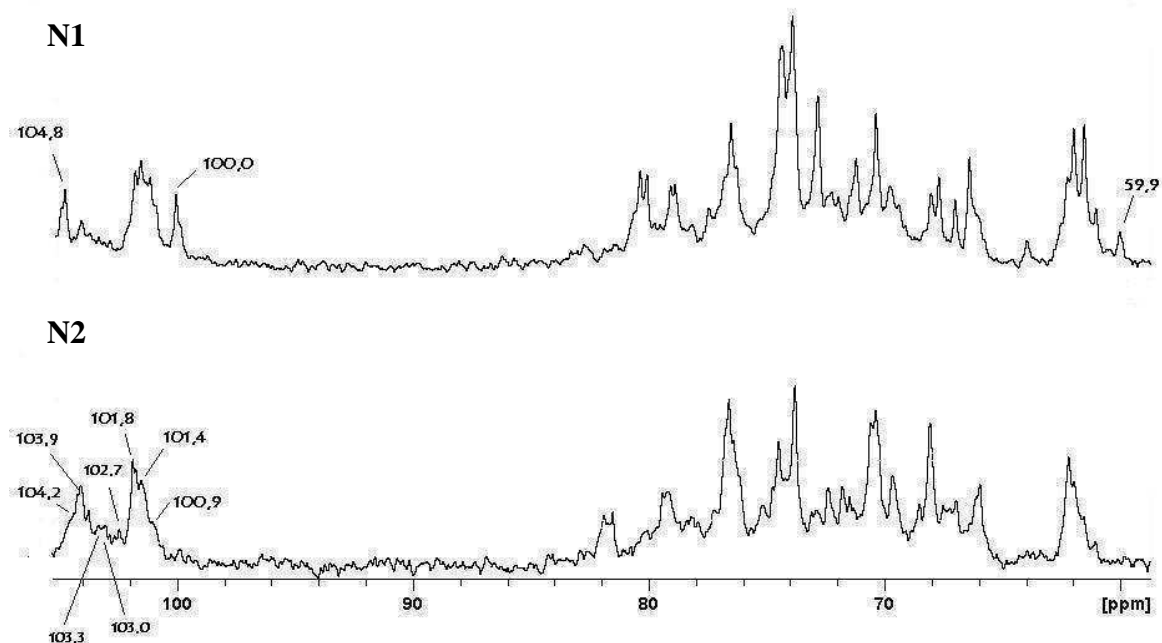


Figura 21. Espectros de RMN ^{13}C de las fracciones N1 y N2, compuestas de una mezcla de xilomananos y (xilo)galactanos.

Por último, en el espectro de N1 se detectó la señal a 59,9 ppm correspondiente al grupo metilo y consistente con su contenido (trazas) de 3-O-metilxilosa y 3-O-metilgalactosa y también señales a 100,0 y 104,8 ppm, que se adjudicaron a la presencia de almidón de Florídeas en la fracción, según asignaciones de Knutsen et al. (1987).

Como resumen general del análisis de las fracciones aisladas de PP-1, destaca la abundancia de mananos sulfatados que representa a dicho extracto, y por ende a los polisacáridos presentes en el alga. La Fig. 22 muestra el espectro de RMN ^{13}C del extracto completo de PP-1 (b) en comparación con el previamente analizado del manano sulfatado N5 (a), ambos a 70 °C. Los mismos denotan estructuras esencialmente similares, en consonancia con el alto contenido de manosa en el extracto y con los altos rendimientos de N5, N6 y N7.

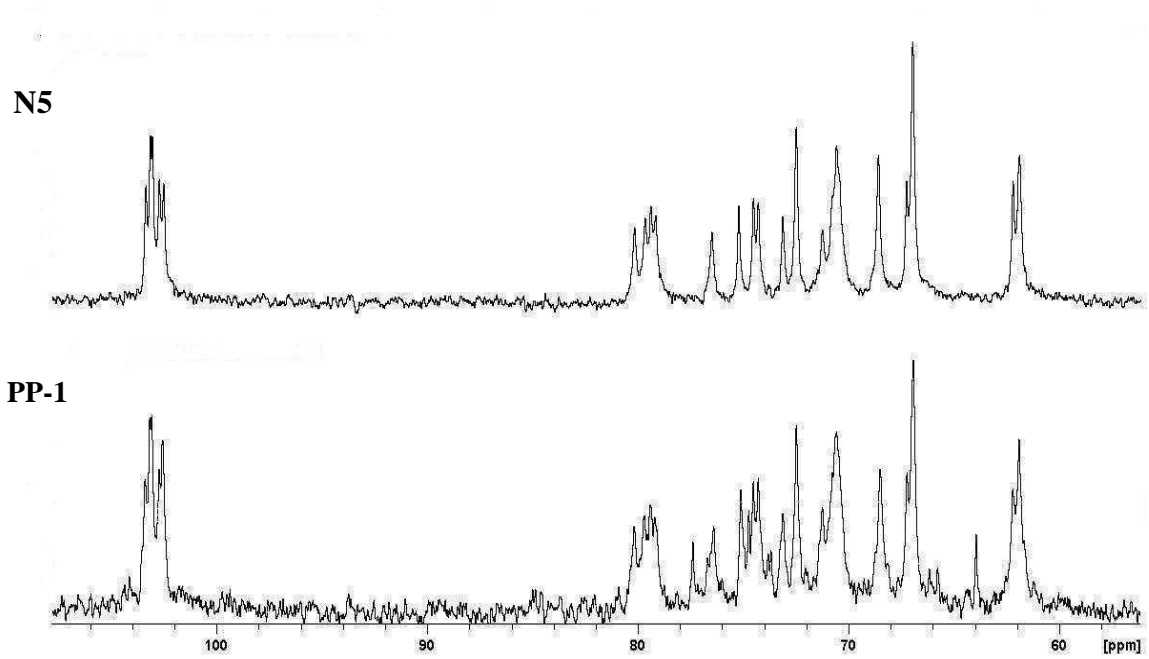


Figura 22. Espectros de RMN ^{13}C del manano N5 y del extracto completo de origen, PP-1.

Los xilomananos, como se expuso, fueron de mucho menor rendimiento, y el espectro de PP-1 completo confirmó la eficacia del fraccionamiento. En efecto, se distingue en la región anomérica la muy baja intensidad de las señales de xilomananos; también en el resto de los carbonos. Los picos considerables a 64,0 y 77,0 ppm en el espectro de PP-1 se adjudicaron a xilanos neutros del sobrenadante de Cetrimida, ya inferidos por el contenido de xilosa hallado en el mismo; el análisis estructural con las asignaciones de RMN de xilanos de *N. helminthoides* se expone a continuación.

XILANOS NEUTROS

Considerando la literatura sobre xilanos solubles en agua aislados de Nematodes, se analizó la presencia de los mismos en extractos acuosos de Nematodes helminthoides. En la Introducción (Capítulo 2) se detallaron las especies previamente estudiadas al respecto; en todos los casos se trataba de xilanos no sulfatados, del tipo “mixtos” dada la coexistencia de dos tipos de unión: β -D-(1 \rightarrow 3) y β -D-(1 \rightarrow 4), predominando siempre las segundas. La condición de “mixtos” de estos xilanos de matriz les otorga menos rigidez y por lo tanto una solubilidad diferente de los descritos en pared fibrilar, completamente β -D-(1 \rightarrow 4) o bien completamente β -D-(1 \rightarrow 3), no extraíbles con agua y sí con soluciones alcalinas fuertes.

Si bien del soluble en Cetrimida originado en el fraccionamiento de PP-1 se lograba observar un enriquecimiento en xilosa, se decidió analizar una segunda extracción. Tanto PD-2 como PP-2 contenían mayor proporción de xilosa respecto del total de monosacáridos en comparación con PP-1 ó PD-1. Se eligió el extracto PD-2, por su mejor solubilidad en agua.

3.6. Aislamiento y caracterización general

La metodología para aislar estos compuestos tuvo en cuenta su neutralidad respecto de los polisacáridos sulfatados. Para ello se realizó, al igual que con PP-1, una precipitación con Cetrimida 10% m/v, y esta vez se continuó trabajando con el sobrenadante de la misma (“PD-2 sobrenadante”). El material precipitado se resuspendió en NaCl 4,00 M y la masa recuperada igualmente se analizó en composición como “PD-2 precipitado” (Tablas 13 y 14).

El segundo paso de aislamiento de xilanos consistió en purificar “PD-2 sobrenadante” por columna de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-25 (Cl⁻), a fin de retener en la columna todo compuesto cargado negativamente que hubiera quedado en la mezcla. La Fig. 23 muestra las absorbancias para hidratos de carbono de los tubos provenientes de la elución con agua; es decir, no retenidos a la columna. Ambos gráficos provienen del mismo paso, realizado dos veces de forma independiente desde el inicio, observándose una alta reproducibilidad del procedimiento.

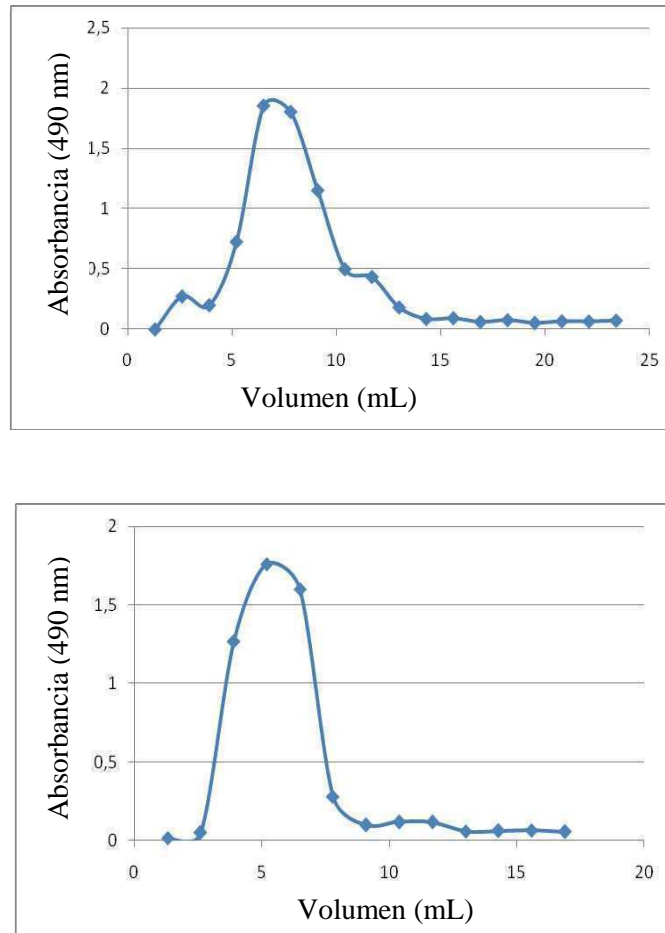


Figura 23. Presencia de hidratos de carbono en tubos eluidos con agua de columna de intercambio aniónico DEAE Sephadex A-25 a partir “PD-2 neutra”.

Los tubos que dieron positivo el ensayo de fenol-sulfúrico se juntaron para dar lugar a la fracción “xilano neutro”, así llamada luego de su análisis del contenido de sulfato y de monosacáridos, tal como se presenta en las Tablas 13 y 14. Los datos allí mostrados corresponden al segundo aislamiento de xilano. La fracción “retenido columna” es el eluido con NaCl 4,00 M posterior a la elución con agua. Si bien no era objeto de análisis ni lo fue ulteriormente, dicho material se analizó en composición de monosacáridos (Tabla 14), de la cual destacaron los contenidos en galactosa y glucosa.

Tabla 13. Composición de fracciones separadas por cargas a partir de PD-2, cuyos datos se repiten a modo comparativo.

Fracción	Rend. (%)	Sulfato (%)	Proteína (%)
PD-2		14,3	13,0
PD-2 precipitado	27,6 ¹	13,8	3,0
PD-2 sobrenadante	13,5 ¹	10,2	19,7
Xilano neutro	50,0²	1,1	2,7
Retenido columna	40,0 ²	8,9	13,7

¹Respecto de masa de PD-2 utilizada en el fraccionamiento con Cetrimida.

²Respecto de masa de “PD-2 sobrenadante” utilizada en columna de intercambio aniónico

El contenido de sulfato de “xilano neutro” fue confirmado también por cromatografía iónica con detector conductimétrico, arrojando los valores de 1,1% y 1,0 % para ambas réplicas, de manera similar a lo obtenido por el método turbidimétrico, reconfirmando la neutralidad del xilano.

Tabla 14. Composición en monosacáridos de fracciones aisladas a partir del extracto PD-2, cuyos datos se repiten a modo comparativo.

Fracción	Composición en monosacáridos (% molar)					
	Man	Gal	Xil	Glc	Ram	Ara
PD-2	51	16	21	5	2	4
PD-2 precipitado	82	8	7	3	-	-
PD-2 sobrenadante	6	6	76	7	2	3
Xilano neutro	1	4	91	4	-	-
Retenido columna	5	36	28	18	6	7

El peso molecular promedio de la fracción “xilano neutro” se confirmó por dosaje de extremos reductores, dando un valor promedio de 6200 Da. Por el mismo método, para otras especies se informaron valores de entre 2200 y 4000 kDa (Viana et al., 2011), y para xilanos de *Nothogenia fastigiata* por UV-MALDI-TOF se asignaron pesos moleculares de entre 3000 y 4000 Da (Fukuyama et al., 2005).

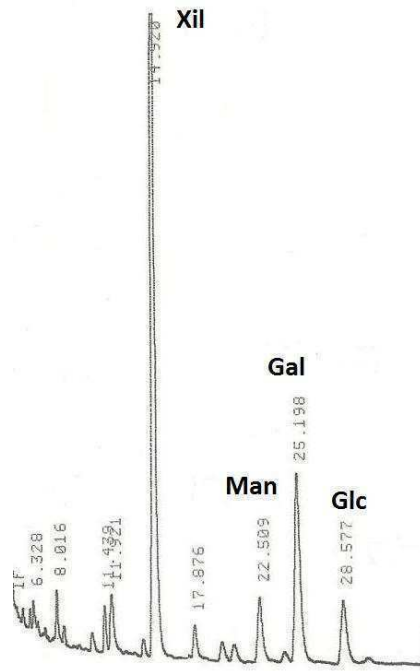


Figura 24. Cromatografía gaseosa luego de hidrólisis y derivatización de “PD-2 sobrenadante”, fracción enriquecida en xilosa respecto del extracto de origen, PD-2.

3.6.1. Análisis estructural: xilanos mixtos β -D-(1 \rightarrow 3;1 \rightarrow 4).

La fracción “xilano neutro” obtenida como se describió en 3.6 se analizó por metilación y RMN ^{13}C para determinar su estructura.

La permetilación de la fracción se logró en un paso con NaOH-ICH₃ en DMSO. Cuando se analizaron los monosacáridos componentes, se encontró un 86% molar de 2,3-di-O-metilxilosa, 11% de 2,4- di-O-metilxilosa, 3% de 2,3,4-tri- O-metilxilosa y 1% de 2-O-metilxilosa. Esta composición de la fracción metilada revelaba una alta proporción de uniones (1 \rightarrow 4) entre xilosas (Fig. 25) .

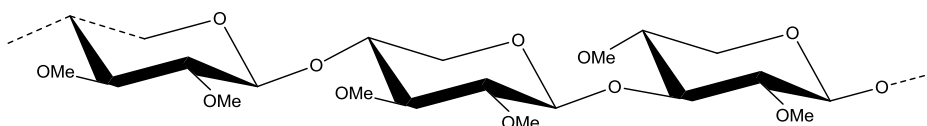


Figura 25. Segmento de β -D-xilano metilado que daría origen a las unidades 2,3-di-O-metilxilosa -más abundantes- y 2,4- di-O-metilxilosa, halladas en el estudio de N. helmintoides.

Además, la metilación informó acerca de la linealidad del xilano ya que, de haber ramificaciones, éstas estaban en mínima proporción - la xilosa trimetilada corresponde a puntas de cadena o a eventuales ramificaciones-. En efecto, las unidades monometiladas (sólo 1%) podrían corresponder a aquéllas con ramificación, o bien a submetilación; no se detectó xilosa sin metilar.

La Fig. 26 muestra el espectro de RMN ¹³C, registrado en agua deuterada a temperatura ambiente. La Tabla 15 detalla la asignación de señales, que se realizó según trabajos previos de xilooligosacáridos modelo (Kováč et al., 1980), y de xilanos del alga roja *Palmaria Leptosarca simplex* (Adams et al., 1988), cuya tabla se incluye en el Anexo I.

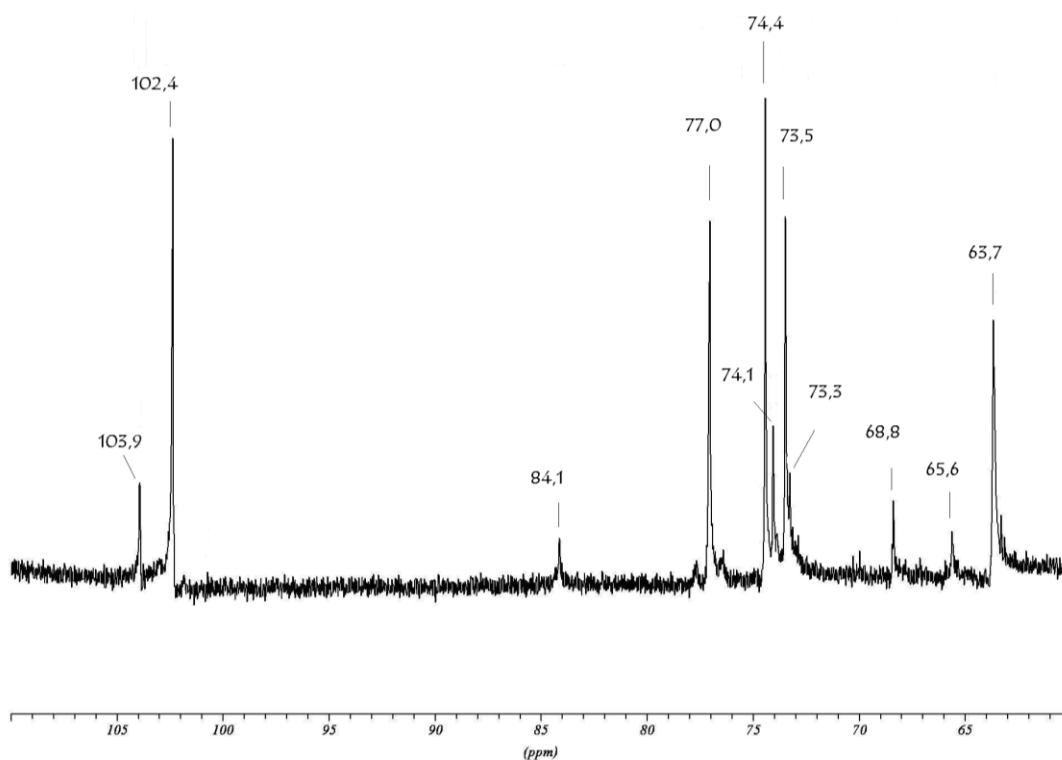


Figura 26. Espectro RMN ¹³C de un β-D-(1→3;1→4) xilano neutro purificado a partir del segundo extracto acuoso de *N. helminthoides*.

Tabla 15. Desplazamientos químicos asignados a unidades del espectro del xilano mixto.

β-D-Xilp	Desplazamientos químicos (ppm)						
	C-1		C-2		C-3	C-4	C-5
	(1→3)	(1→4)	(1→3)	(1→4)			
Enlazada por 3	103,9	102,4	73,3		84,1	68,4	65,6
Enlazada por 4	103,9	102,4	74,1	73,5	74,4	77,0	63,7

En primer lugar, las señales anoméricas a 103,9 y a 102,4 ppm confirmaban la presencia de anómeros β ; las α -D-xilosas se esperarían a alrededor de 99-100 ppm. A su vez, la baja intensidad de señales a 103,9 ppm, 84,1 ppm, 73,3 ppm, 68,4 ppm y 65,6 ppm fue consistente con la menor incidencia de uniones (1 \rightarrow 3) inferida por metilación.

El análisis por metilación dio por resultado una relación molar de aproximadamente 8:1 de uniones (1 \rightarrow 4) sobre (1 \rightarrow 3) en este caso. Dicha relación de uniones es algo mayor que las informadas para otras especies, también por metilación, que fueron de aproximadamente 5:1 para *Galaxaura marginata*, *Galaxaura obtusata*, *Tricleocarpa cylindrica*, *Tricleocarpa fragilis*, *Scinaia hallie* (Viana et al., 2011) e inclusive para *Nemalion vermiculare* (Usov et al., 1973).

Entonces, como polisacáridos solubles en agua de *N. helminthoides*, además de mananos y xilomananos sulfatados, se aislaron xilanos neutros de tipo “mixtos” β -D-(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 4). Los xilanos fueron separables de los polisacáridos sulfatados, quedando en el sobrenadante luego de una precipitación con detergente catiónico, y con mucho menor rendimiento que los primeros, representando ~ 1,10 % de la masa original de alga. Si bien en el caso de *N. helminthoides* la proporción de estos xilanos es mayor en el segundo extracto, estos polisacáridos también se logran extraer en un primer paso. En efecto, de primeros extractos acuosos se reportaron, con rendimientos de entre 0,20 y 1,00 %, para las Nemaliales *G. marginata*, *T. cylindrica*, *T. fragilis* y *S. halliae* (Viana et al., 2011). En *N. helminthoides*, la presencia de xilanos fue sugerida en el análisis de monosacáridos del sobrenadante de PP-1 arriba mencionado, y también en el espectro de RMN del extracto completo (Fig. 22).

La Fig. 27 muestra el espectro de RMN¹³C de PP-2 comparado con el ya presentado de PP-1 (Fig. 22) ambos a 70 °C. En efecto, se verifica que señales asignadas a los xilanos mixtos están presentes en PP-1 y a su vez que se encuentran intensificadas en el espectro de PP-2; se indican con flecha las señales a 103,9 ppm, 102,4 ppm, 74,4 ppm, 77,0 ppm, 63,7 ppm, 65,6 ppm.

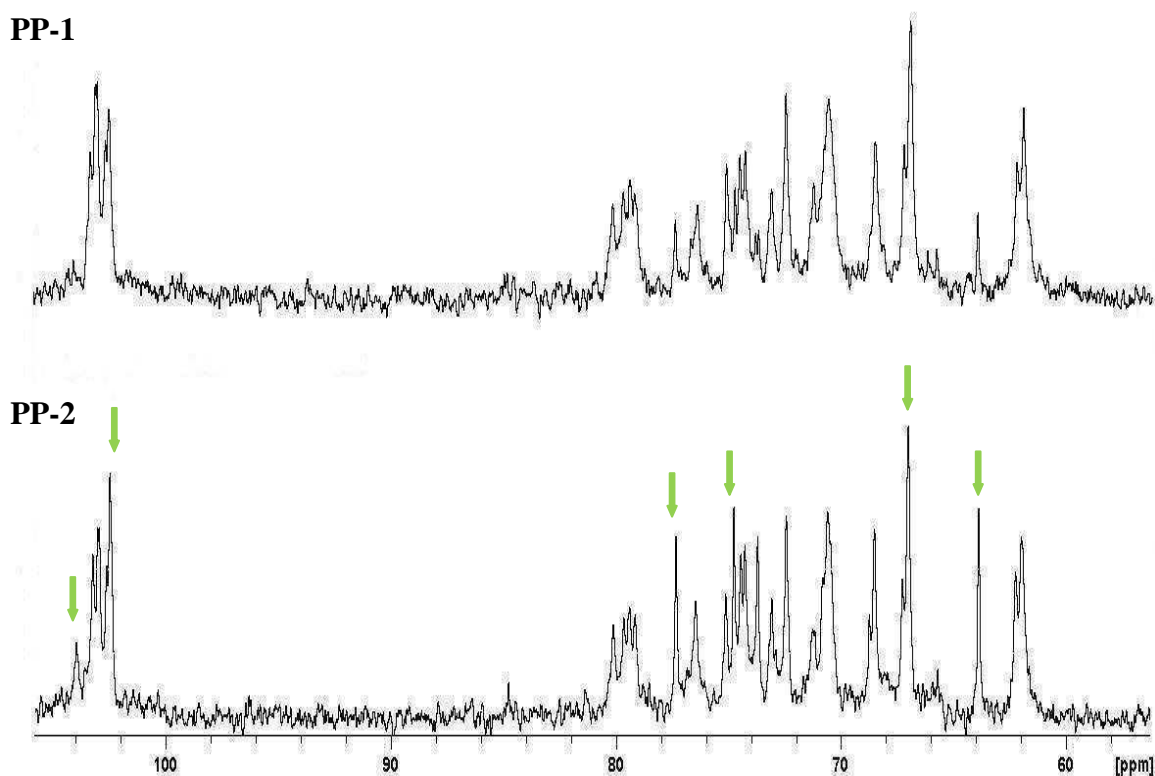


Figura 27. Espectros de RMN ^{13}C de PP-1 y PP-2; dos extractos acuosos de *N. helminthoides*. Las flechas verdes indican señales correspondientes a xilanos mixtos.

3.7. Extracción alcalinas a residuo final: aislamiento de xilanos $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)}$

Se realizaron tres extracciones sucesivas con NaOH 8,0% al residuo final de las tres extracciones acuosas, con el objetivo de analizar polisacáridos insolubles en agua.

Partiendo de 5,0 g de residuo se logró extraer un 22,4% en masa entre los tres extractos alcalinos: 520 mg en el primero (E1), 400 mg en el segundo (E2) y 199 mg en el último (E3).

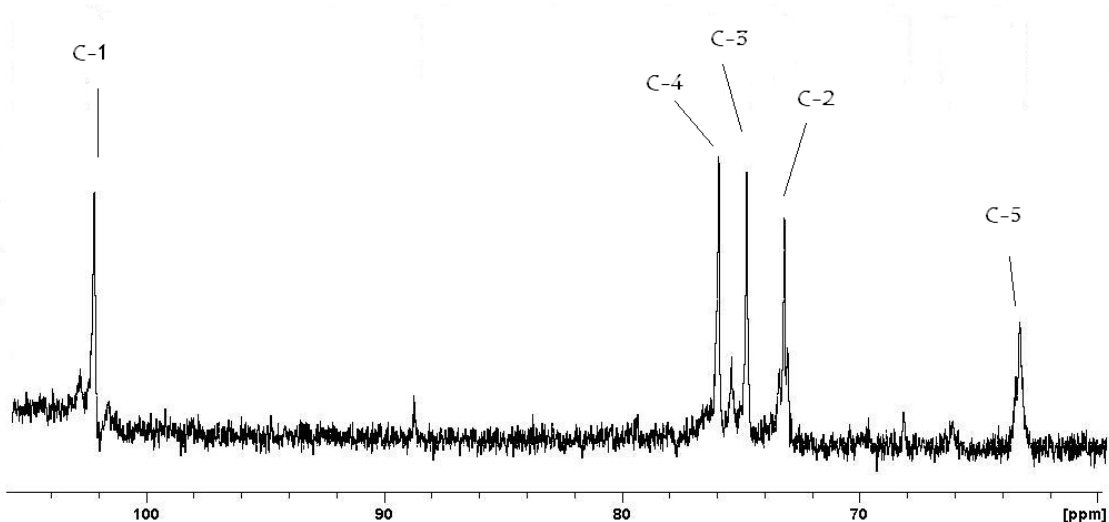
Cuando se analizó la composición en monosacáridos de los extractos (Tabla 16), se halló que todos estaban compuestos mayoritariamente por xilosa.

Tabla 16. Composición en monosacáridos de tres extractos alcalinos a partir de un residuo de extracciones acuosas a *N. helminthoides*.

Fracción	Composición en monosacáridos (% molar)						
	Man	Xil	Gal	Glc	Ram	Fuc	Ara
E1	16	75	5	2	--	tr	2
E2	19	61	5	10	tr	2	3
E3	10	76	3	10	--	1	--

Si bien el análisis de monosacáridos del precipitado había dado un contenido principal de glucosa, con NaOH 8,0% no se extrajo celulosa, cuyo solvente de extracción es generalmente con N-óxido de N-metilmorfolina (Aspinall, 1982). Se estimó un elevado porcentaje de proteína, entre 30 y 40 % para los tres extractos, a partir del contenido de N estimado por absorción atómica.

Se realizó un espectro de RMN ^{13}C a E1, en NaOH 1,0 M, a temperatura ambiente (Fig. 28). En este caso las señales fueron asignadas según Matulewicz y Cerezo (1987a) y dieron cuenta de un xilano puramente $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{4)}$: **C-1**, 102,2; **C-2**, 73,2; **C-3**, 74,7; **C-4**, 75,9 y **C-5**, 63,2. Las señales de baja intensidad no asignadas probablemente se deban a unidades de manosa (16 % molar). Se descartó la incidencia de uniones $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{3)}$, cuya señal diagnóstica de C-3 se encontraría entre 82 y 85 ppm (Kovač y Hirsch, 1980)

**Figura 28.** Espectro de RMN ^{13}C correspondiente a un $(1\rightarrow4)\beta\text{-D}$ -xilano, aislado de la pared celular de *N. helminthoides* por extracción alcalina.

La estructura rígida asignada fue acorde con su insolubilidad en agua, y confirmó que se trataba de un componente de la pared fibrilar. Cuando se registró el espectro de RMN ^{13}C a E2, se obtuvo un patrón muy similar (Fig. 29). Nuevamente se advirtieron con mayor intensidad las cinco señales del xilano de estructura rígida. Este espectro se efectuó a 50 °C, por lo que se encontraron corrimientos de los desplazamientos hacia campos más bajos, con mayor énfasis las señales de C-1 y C-4.

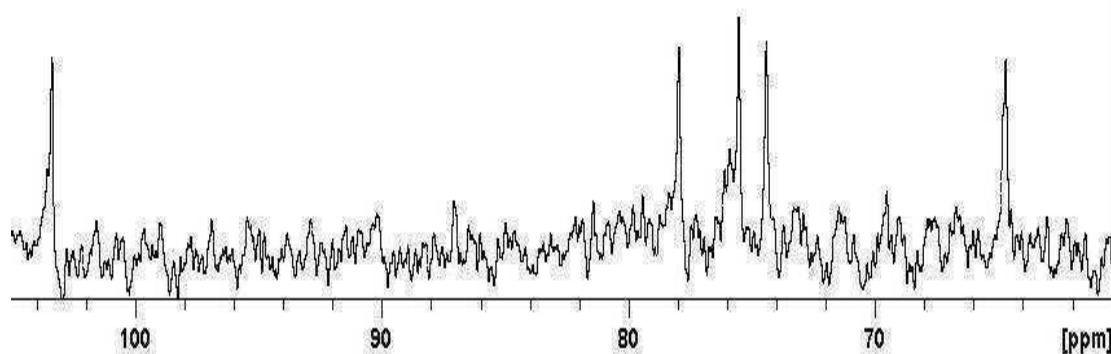


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C correspondiente a un (1→4)β-D-xilano, aislado de la pared celular de *N. helminthoides* luego de dos extracciones alcalinas.

Por lo tanto, por extracción con soluciones alcalinas se lograron caracterizar xilanos de uniones β-D-(1→4) de la pared de *N. helminthoides*. Estos componentes fibrilares son poco comunes en algas rojas, y también fueron caracterizados en otras Nemaliales - ver Introducción -.

Cabe destacar que estructuras con el mismo esqueleto son muy abundantes en hemicelulosa de plantas superiores; sin embargo, se encuentran dentro de heteropolisacáridos altamente ramificados, quedando los “xilanos verdaderos” como productos propios de algunos grupos de algas, particularmente Palmariales y Nemaliales (Ebringerová et al., 2005).

**Capítulo 9: ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE
FRACCIONES DE NEMALION HELMINTHOIDES**

MODIFICACIONES QUIMICAS

Las modificaciones que se llevaron a cabo sobre mananos y xilomananos tuvieron como objetivo principal avanzar en la relación estructura-actividad antiviral de estos polisacáridos. Como se presentará en la Sección II, los mananos (fracciones N5 y N6) de *Nemalion helminthoides* no se mostraron activos contra virus herpes ni dengue, y sí lo hicieron las fracciones de xilomananos.

De este modo, se planteó en primer lugar una sobresulfatación de mananos, naturalmente sulfatados en C-4 ó C-6. Mediante la misma se pretendía aumentar el contenido de sulfato y generar derivados sustituidos también en C-2, considerando su prevalencia en estructuras antivirales muy activas (ver Capítulo 6).

La segunda etapa de modificaciones químicas consistió en eliminar las ramificaciones de xilosa de los xilomananos N3 y N4, utilizando una técnica que no afectara el esqueleto de manosas.

Todos los derivados químicamente modificados fueron evaluados en cuanto a su actividad antiviral y comparados con las fracciones de origen (Capítulo 8), respondiendo al objetivo de las modificaciones. A continuación se presentan los aspectos químicos de las técnicas empleadas y el análisis estructural realizado a las fracciones modificadas.

4.1. Sulfatación de mananos

Partiendo de las sales de piridinio del manano N6, se obtuvieron productos con mayor grado de sulfatación utilizando SO_3 -piridina como agente sulfatante, en DMSO.

Según un método reportado para carragenanos y glucanos (Takano et al., 1996), pero que resultó infructuoso para este manano, se había intentado en primer término la reacción con H_2SO_4 como agente sulfatante y DCC como agente de condensación, en DMF.

La sulfatación con el complejo SO_3 -piridina, en tanto, resultó exitosa para N6, ya que del 23,4 % de sulfato inicial se obtuvo un derivado con 44,1% luego de dos horas de incubación con los reactivos, a 60 °C. Se ensayó otro tiempo de reacción para evaluar

posibles cambios en el grado de sustitución. Se efectuó entonces la reacción en paralelo durante dos y tres horas (Tabla 17), en las mismas condiciones que la primera vez.

Tabla 17. Porcentajes de sulfatación obtenidos con SO₃-piridina al cabo de 2h y 3h de reacción, a partir del manano N6.

Fracción	N6 original	2 h de sulfatación	3 h de sulfatación
% de NaSO ₃	23,4	43,1	51,9

Se observó por un lado la reproducibilidad de la técnica, obteniéndose un porcentaje de sulfatación muy similar al cabo de dos horas. Luego de tres horas, en tanto, la reacción continuó, ya que se generó un derivado con mayor sulfatación. A los dos derivados se los llamó “N6S-2h” y N6S-3h” respectivamente, y fueron utilizados para el análisis estructural y las determinaciones de actividad biológica.

Cuando se precisó mayor masa de N6S-2h para determinaciones biológicas, se efectuó la reacción por tercera vez. En esta oportunidad se obtuvo un producto con 48,0 % de sulfato, un porcentaje dentro del orden pero algo mayor al de las dos réplicas anteriores. En paralelo, también durante dos horas, se sulfató el manano N5, estructuralmente muy similar a N6, generando un derivado con 48,5 % de sulfato.

4.1.1. Análisis estructural de los productos de sulfatación

4.1.1.1. RMN

Las fracciones N6S-2h y N6S-3h se analizaron por RMN ¹³C. La asignación completa de señales de N6S-2h se compendia en la Tabla 18, y se realizó de acuerdo a los metil 3-O-metil- α -D-manopiranosidos sulfatados (Usov et al., 1975), los mananos de *Nothogenia fastigiata* (Allerhand y Berman, 1984; Kolender, 2003) - ambas Tablas mostradas en Anexo I - y la asignación previamente presentada para N6.

Se detectaron en el espectro de N6S-2h (Fig. 29) señales indicadoras de sulfatación en C-2; además, la intensidad de señales sugirió que la sulfatación había ocurrido principalmente en C-2 y C-6. En efecto, en la región anomérica se apreciaron señales de gran intensidad a ~ 100 ppm y ~ 101ppm, no detectadas en N6, y coincidentes con

asignaciones de unidades sulfatadas en C-2: α -D-Man 2,4,6-trisulfato y α -D-Man 2,6-sulfato, respectivamente.

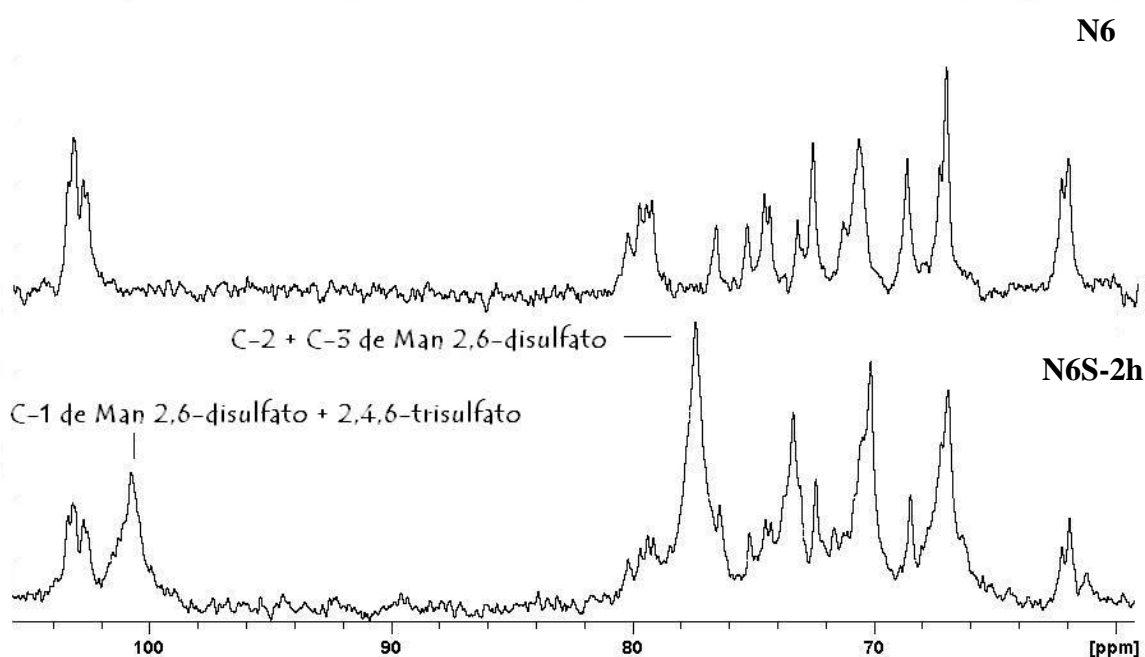


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C del producto de sulfatación N6S-2h en comparación con el manano de origen; se indican las señales más significativas generadas por sulfatación en C-2.

De la región no anomérica, se destacaron como distintivas las señales a 77,5 y 77,2 ppm (C-2 y C-3 de α -D-Man 2,6-disulfato). La intensidad de las señales sugirió que la sulfatación en C-2 era, aunque no exclusiva, muy abundante en el derivado obtenido; particularidad que se analizó exhaustivamente por metilación (ver abajo).

Tabla 18. Asignación de señales de espectro ^{13}C RMN del manano sobresulfatado N6S-2h.

Unidad	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6
α -D-Man	102,9-102,8	70,3	79,1	66,7	74,3	61,6
α -D-Man 6S	103,2	70,5	78,9	67,0	72,2	68,3
α -D-Man 4S	102,5-102,3	72,8	76,5	74,9	74,0	61,9
α -D-Man 4S 6S	102,5-102,3	73,1	76,3	75,0	72,0	67,2
α -D-Man 2S 6S	101,1	77,5	77,2	66,8	72,2	68,2
α -D-Man 2S 4S 6S	100,3-100,1	79,9	74,6	74,9	72,0	67,1

Así como fue expuesto para el espectro de N6, las señales a 80,1 y 79,6 ppm no se incluyeron en la Tabla 18, y probablemente se expliquen por los C-3 de las díadas formadas por unidades de Man (y Man 6S) unidas a Man 4S.

El espectro obtenido para N6S-3h fue muy similar, teniendo la misma asignación de señales de la Tabla 18. Se evidenció un aún mayor grado de sulfatación en C-2 en este derivado, vista la intensificación de las señales anoméricas y de la señal ancha a de 77,2-77,5 ppm, y la disminución de las señales a ~ 61 ppm, propias de C-6 de Man o Man 4S. La Fig. 30 muestra el espectro de N6S-3h.

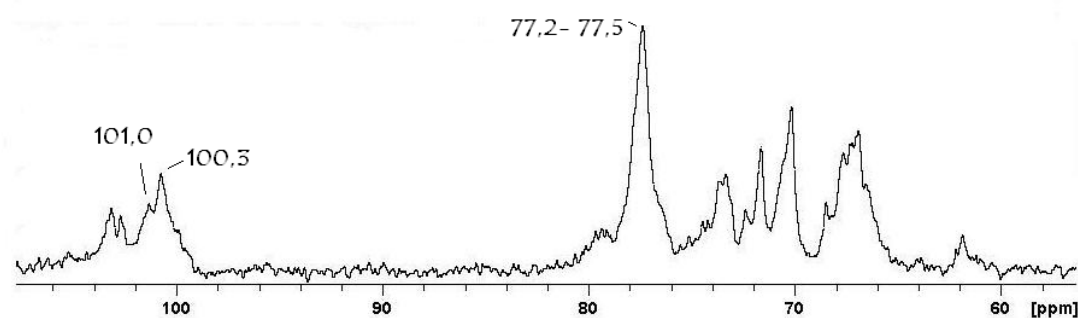


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C de N6S-3h; se indican las señales distintivas por sulfatación en C-2.

4.1.1.2. Metilación de N6S-2h y N6S-3h

Se lograron derivados permetilados de N6S-2h y N6S-3h en uno y dos pasos de metilación, respectivamente. En la Tabla 19 se presentan los porcentajes molares de las unidades metiladas, cuya identidad se confirmó por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (ver Anexo II). Se incorporó a la Tabla los porcentajes previamente presentados para N6 (Tabla 8), a modo comparativo.

Para N6S-2h, los datos de metilación indicaron que la unidad nueva más abundante era α -D-manosa 2,6-disulfato, evidenciado por el 20 % de 4-O-metilmanosa presente. En la fracción N6S-3h, en tanto, un 43 % de manosa indicaba que la unidad generada más abundante era la trisulfatada, consistentemente con el mayor grado de sulfatación determinado.

Tabla 19. Composición en monosacáridos de los productos de sulfatación N6S-2h y N6S-3h metilados; se agrega para comparación lo presentado antes para N6.

Unidades	N6 nativa	N6S-2h	N6S-3h
2,3,4,6-Me ₄ Man	2	tr	tr
2,4,6-Me ₃ Man	33	14	6
4,6-Me ₂ Man	tr	4	2
2,6-Me ₂ Man	19	6	4
2,4-Me ₂ Man	35	35	10
2-Me Man	3	8	5
4-Me Man	1	20	30
Man	3	13	43

Comparando los tres perfiles de metilación de la Tabla 19, fue muy significativa la disminución de las unidades de manosa sin sulfatar - evidenciadas por el % de 2,4,6-tri-O-metilmanosa - desde un 33% en la fracción nativa a un 14% en N6S-2h y hasta un 6% en N6S-3h. En paralelo y como contraparte, se observó el incremento de unidades trisulfatadas: el porcentaje de manosa sin metilar varió de 3% en N6 a 13% y 43% al cabo de dos y tres horas de reacción, respectivamente.

El importante incremento de 4-O-metilmanosa en las primeras dos horas de reacción, en detrimento de 2,4,6-tri-O-metilmanosa, indicó que en ese período estarían igualmente favorecidas las sustituciones en C-2 y C-6. En el mismo sentido, el moderado aumento (10%) de Man con una reducción similar (13%) de 2,6-di-O-metilmanosa en N6S-2h sugirió que las unidades trisulfatadas derivarían principalmente de sulfatación en C-2 y C-6 de los residuos naturalmente sulfatados en C-4.

Las manosas trisulfatadas, sin embargo, aumentaron considerablemente entre las dos y tres horas de reacción (43% de manosa en N6S-3h). Estas unidades derivarían principalmente de sulfataciones en C-2 y C-4 de los residuos Man 6S de la fracción nativa (35 % de 2,4-di-O-metilmanosa en N6 y sólo 10 % en N6S-3h). Entonces, de las diferencias encontradas entre los perfiles a dos y tres horas, se pudo inferir que la sulfatación en C-4 también ocurría, pero en última prioridad.

Cuando se metiló una réplica de sulfatación a dos horas, se obtuvo un perfil muy similar (Tabla 20), confirmando el tipo de sustitución generada por el tratamiento, con última prioridad para C-4. Aun así, a diferencia del primer derivado, en este caso los datos sugirieron mayor sustitución en C-2 para las unidades nativas Man 6S (% de 4-Me Man), además de en C-2 y C-6 para las unidades no sulfatadas (también aumento de % de 4-Me Man).

Tabla 20. Composición en monosacáridos de N6S-2h metilado, réplica; se compara con lo presentado para N6.

Unidades	N6 nativa	N6S-2h réplica
2,3,4,6-Me ₄ Man	2	Tr
2,4,6-Me ₃ Man	33	19
4,6-Me ₂ Man	tr	6
2,6-Me ₂ Man	19	5
2,4-Me ₂ Man	35	22
2-Me Man	3	5
4-Me Man	1	27
Man	3	16

4.1.2. Sulfatación de N5

Se sulfató la fracción N5 (22,7 % sulfato nativo), en las mismas condiciones, durante dos horas. Se obtuvo un producto con 48 % de sulfato, que se metiló y se analizó por RMN ¹³C, sugiriendo parámetros muy similares a lo analizado para el anterior manano. En la Fig. 31 se muestra el espectro de N5S en comparación con el de N5 original.

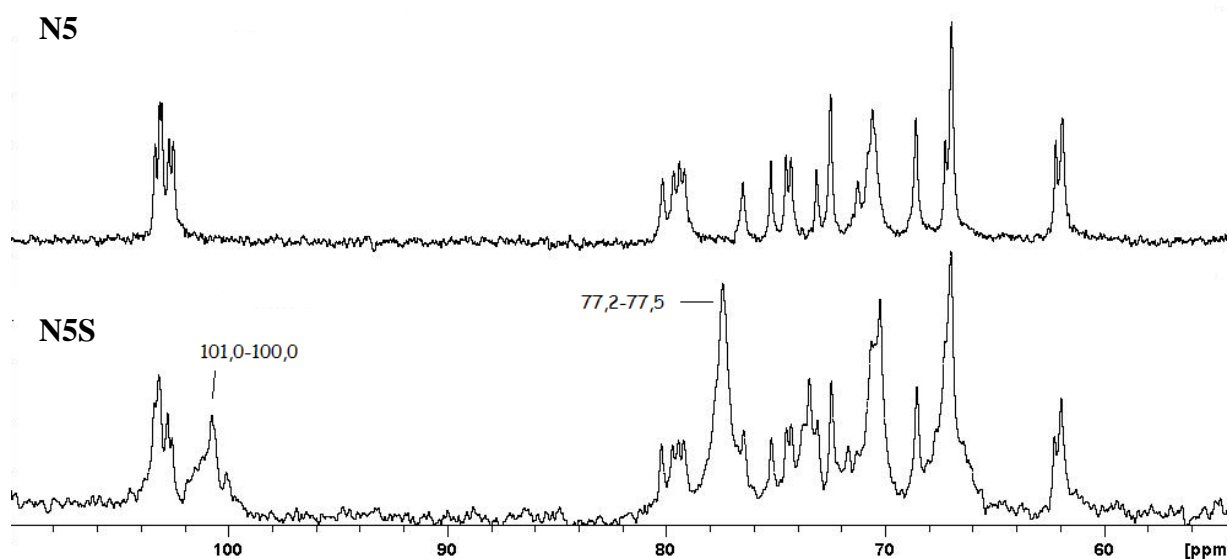


Figura 31. Espectro de RMN ^{13}C del producto de sulfatación de N5, por reacción 2 h con SO_3 -piridina, a $60\text{ }^\circ\text{C}$, y comparación con la fracción original.

De la metilación (Tabla 21), pudo evidenciarse una distribución algo diferente a la de N6S-2h; aun así, nuevamente la sulfatación fue mayoritaria en C-2 y C-6, lo cual ya estaba sugerido por RMN.

Tabla 21. Composición en monosacáridos de N5 sulfatado metilado; se compara con lo presentado para N5.

Unidades	N5 nativa	N5S
2,3,4,6-Me ₄ Man	2	tr
2,4,6-Me ₃ Man	36	12
4,6-Me ₂ Man	-	2
2,6-Me ₂ Man	22	8
6-Me Man	-	6
2,4-Me ₂ Man	33	19
2-Me Man	3	6
4-Me Man	1	18
Man	3	29

El contenido de Man 4S (22% a 8% de 2,6-di-O-metilmanosa) disminuyó en gran parte por generación de manosas trisulfatadas, y otro tanto de Man 2S 4S y Man 4S 6S (aumento de 6-O-metilmanosa y 2-O-metilmanosa). Además, descendió el contenido de Man 6S (33% a 19% de 2,4-di-O-metilmanosa) y se detectó 18% de unidades sulfatadas en C-2 y C-6 (% de 4-O-metilmanosa).

A modo de conclusión, se obtuvieron mananos con alto grado de sulfatación y con un importante porcentaje de sustitución en C-2, inexistente en las fracciones nativas. Asimismo, se comprobó que en estos mananos las posiciones C-2 y C-6 se sulfatan preferencialmente con la técnica utilizada, siendo las evidencias de metilación concordantes con lo detectado por RMN.

La sulfatación favorecida en hidroxilos primarios (en C-6) y en hidroxilos axiales (C-2 en D-manosa; C-4 en D-galactosa; C-2 en 3,6-anhidro-D-galactosa) también fue corroborada en sulfataciones de λ - y κ -carragenanos; para ι -carragenano, sin embargo, las posiciones favorecidas fueron C-6 y el C-2 de la unidad β , esta última ecuatorial (Damonte et al., 2004).

Con la misma técnica utilizada en este trabajo, Alban et al. (2002) habían reportado la prioridad $C6 > C2 > C3 > C4$ para (1 \rightarrow 4, 1 \rightarrow 6)- α -D-glucanos (pululanos), estando favorecido nuevamente el -OH primario, y estando todos los demás ecuatoriales en el caso de la glucosa.

Cabe destacar que se evidenció degradación del compuesto N6S-3h estando en solución y también liofilizado. Se verificó por HPSEC la degradación del peso molecular y en paralelo la pérdida de la actividad antiviral. Esto no ocurrió con N6S-2h, por lo que se siguió trabajando con dicha fracción en las determinaciones de actividad biológica. La diferencia observada pudo adjudicarse a un deficiente intercambio de Py^+ por Na^+ , a causa de la conformación de la estructura prácticamente persulfatada de N6S-3h, y siendo muy inestables las sales de Py^+ .

4.2. Eliminación de ramificaciones a xilomananos

4.2.1 Controles con fracciones modelo

Como se mencionara en el análisis estructural de N3 y N4 del Capítulo 3, se aplicó a los xilomananos la técnica de degradación de Smith (oxidación con periodato, reducción e hidrólisis suave) para eliminar las ramificaciones.

Dado que evaluar la actividad antiviral de las fracciones modificadas era el principal objetivo, se buscaba por la técnica no provocar otras rupturas o cambios en las moléculas. Por ello, se efectuaron controles previos con dos fracciones conocidas y con un xilomanano de estructura conocida extraído de *N. fastigiata* (su obtención se detalla en Anexo III, pág.159).

- Fracción N2: para verificar la degradación de xilosas.
- Manano N5: para controlar la estabilidad de los ésteres sulfato.

- Xilomanano F3 (16% Xil, 79% Man, 5% Gal): para verificar degradación de xilosas y conservación del esqueleto de manosa, determinando además la homogeneidad de la fracción obtenida y comparando su tiempo de retención en HPSEC con la original.

Si bien otro objetivo importante era determinar el peso molecular de los productos resultantes, la reducción con NaBH_4 efectuada durante la técnica no permitió hacerlo por dosaje de extremos reductores. Por lo mismo, a las fracciones de interés N3-Smith y N4-Smith se les controlaría el peso molecular por comparación de tiempos de retención y homogeneidad en HPSEC.

Por degradación de Smith a F3, se obtuvo una fracción con sólo trazas de xilosa, 83% de manosa y 9% de galactosa. La misma se detectó como homogénea por cromatografía de exclusión por tamaño (Fig. 32, nuevamente el pico a casi 70 min corresponde al solvente), sugiriendo que el esqueleto de manosas no estaría afectado.

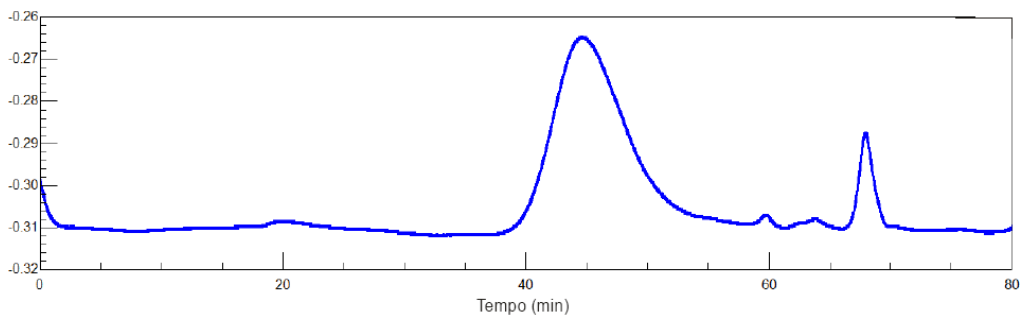


Figura 32. Cromatografía de permeación en geles (HPSEC-RID) de la fracción F3-Smith. El pico a 70 min corresponde a sales del solvente.

En el caso de N2, del 25% de xilosa original se obtuvo un derivado con sólo 2% del monosacárido, quedando manosa y galactosa (relación molar 1,7:1) como componentes mayoritarios en “N2-Smith”, en una proporción diferente respecto de N2 (relación molar 1,1:1), evidenciando una degradación parcial de galactosas, seguramente las (1→4) no sustituidas.

En cuanto a “N5-Smith”, se dosó un contenido de sulfato del 22,5%, valor que no difería del de N5 previo al tratamiento, corroborando la integridad del manano sulfatado.

4.2.2. Obtención de N3-Smith y N4-Smith

Cuando se generaron N3-Smith y N4-Smith, se obtuvieron dos derivados con trazas de xilosa y composición mayoritaria de manosa; se analizó también el contenido de sulfato de las fracciones resultantes (Tabla 22).

Tabla 22. Caracterización de las fracciones modificadas por degradación de Smith a partir de los xilomananos N3 y N4; se agrega comparación con las fracciones originales.

Fracción	% Man	% Xil	% Gal	% Glc	% SO ₃ Na
N3	64	24	8	2	19,4
N3-Smith	95	tr	3	2	20,0
N4	74	17	4	tr	22,9
N4-Smith	95	tr	3	2	19,4

Tal como se indica en la Tabla 22, el contenido de sulfato permaneció en valores similares luego de la degradación de Smith. Además, en ambas fracciones disminuyó el bajo contenido de galactosa a porcentajes aún menores; probablemente por ruptura de unidades (1→4) no sustituidas.

La homogeneidad de las fracciones así como la relación con los pesos moleculares de las fracciones de origen se comparó por HPSEC. En la Fig. 33 se muestra el cromatograma de N4-Smith (los picos pequeños a 60 y 65 minutos se adjudicaron a galactanos de bajo peso molecular) y se compara abajo con el ya presentado de N4. Se observaron similares tiempos de retención aunque, como era esperable, algo mayor para la fracción sin xilosas.

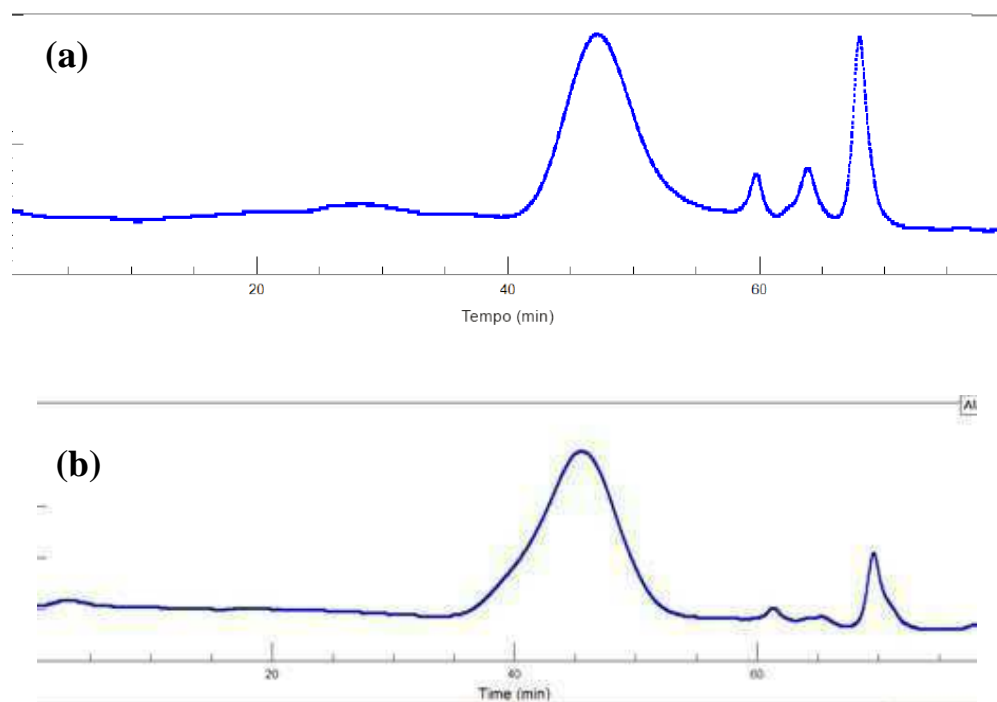


Figura 33. Cromatografía de permeación en geles (HPSEC-RID) de la fracción N4-Smith (a) y comparación con la fracción de origen N4 (b). El pico a 70 min corresponde a sales del solvente.

También se realizaron los espectros de RMN ^{13}C . Tanto en N3-Smith como en N4-Smith, consistentemente con lo hallado por cromatografía gaseosa, no se detectaron las señales anoméricas a 100,8; 101,4 y 104,2 ppm, tampoco las de 76,8 y 66,0 ppm de residuos xilosa ni la de 67,6 ppm asignada a las manosas ramificadas en la Tabla 10 (pág.54). De hecho, se obtuvieron espectros muy similares a los de mananos lineales. La Fig. 34 muestra el espectro de N3-Smith, que fue idéntico al no mostrado de N4-Smith.

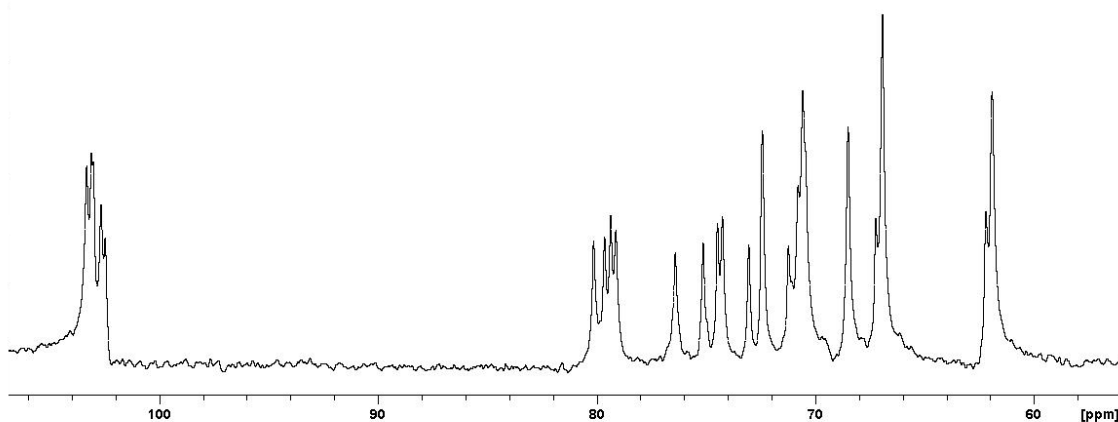


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C de la fracción N3-Smith, un manano obtenido por degradación de Smith a partir del xilomanano N3.

Entonces, se lograron fracciones sin xilosa pero conservando el esqueleto de manosa y sus unidades sulfatadas; por cromatografía de exclusión por tamaño se verificó que las fracciones obtenidas eran homogéneas y con un leve descenso del peso molecular explicable por la remoción de xilosas (según lo calculado por la abundancia molar de Xil, N3-Smith tendría un peso molecular de 10,6 kDa y N4-Smith de 10 kDa).

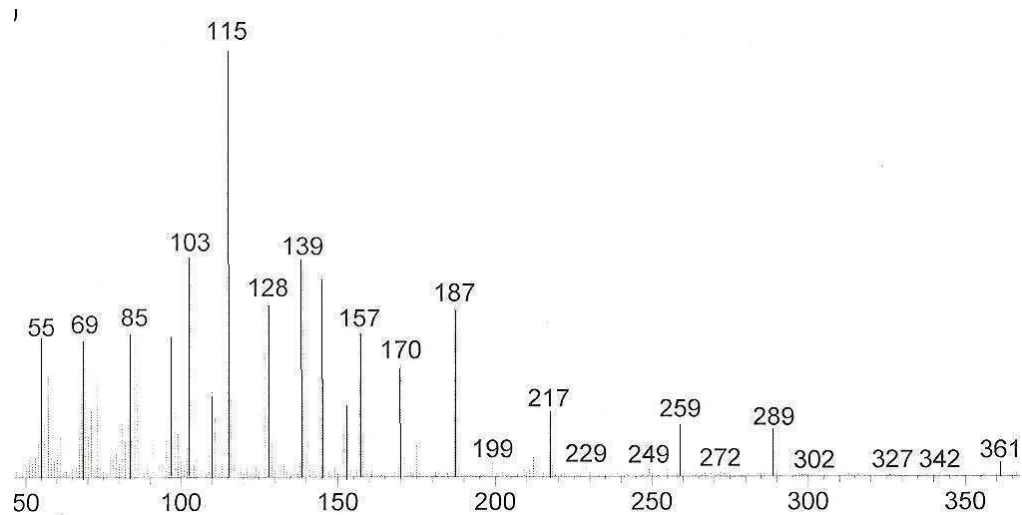
Cabe destacar que, a diferencia de las fracciones de origen, estas modificadas tuvieron una baja solubilidad en agua a temperatura ambiente, debiéndose trabajar con soluciones de concentración máxima de 1 mg/mL. A 50 ó 70 °C, las temperaturas usadas para RMN, la solubilidad mejoró notablemente.

Por otra parte, N4-Smith presentó una tendencia a la insolubilización estando en solución, una característica que ya se había reportado para otros polisacáridos similares,

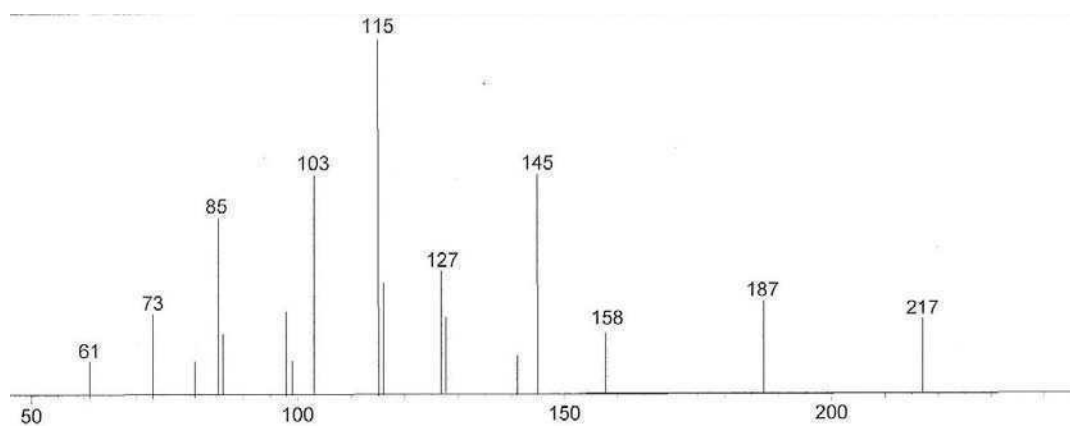
que sufren varios pasos de congelamiento y liofilización (Matulewicz y Cerezo, 1987b; Usov, 2011). De todas formas, se prepararon sin inconvenientes las soluciones para determinaciones de actividad antiviral presentadas en el Cap. 8.

Anexo II

A) Principales espectros de masa registrados a unidades obtenidas por hidrólisis y derivatización a acetatos de alditoles de los extractos crudos y las fracciones.

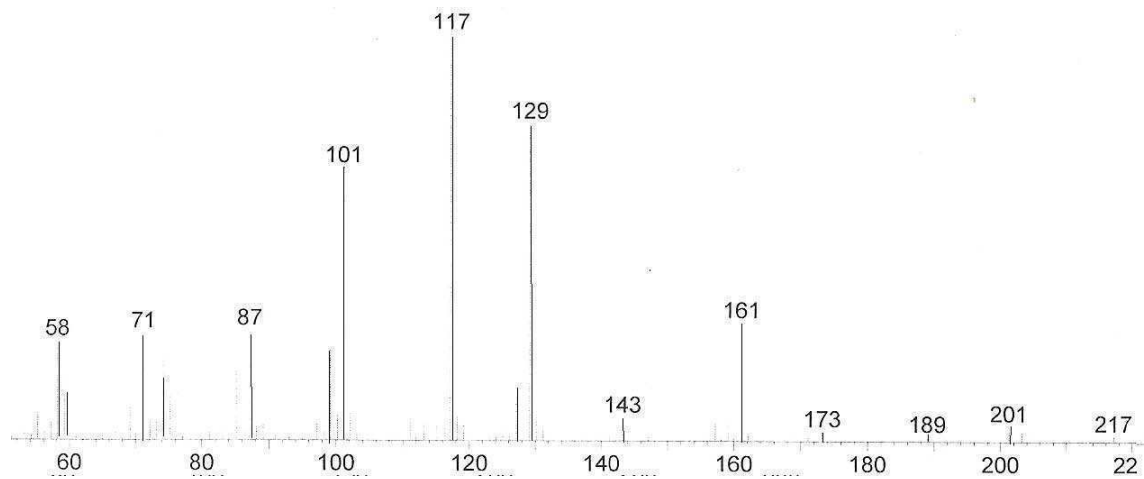


Espectro de masa de hexitolhexaacetato

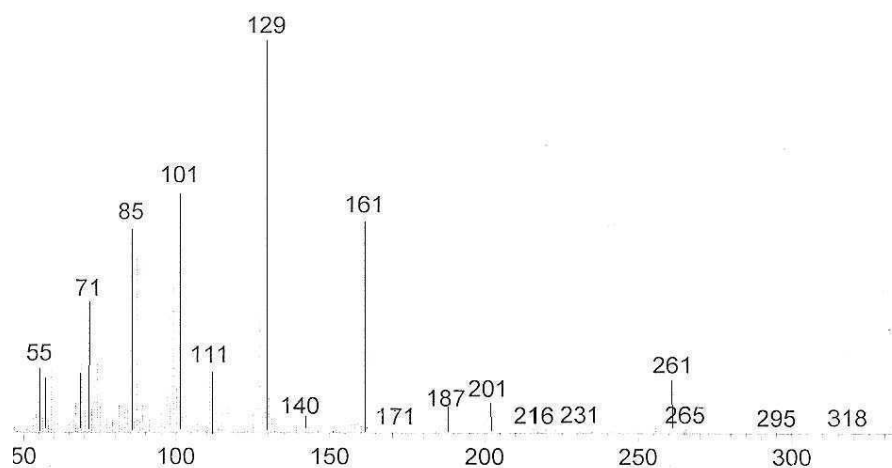


Espectro de masa de pentitolpentaacetato

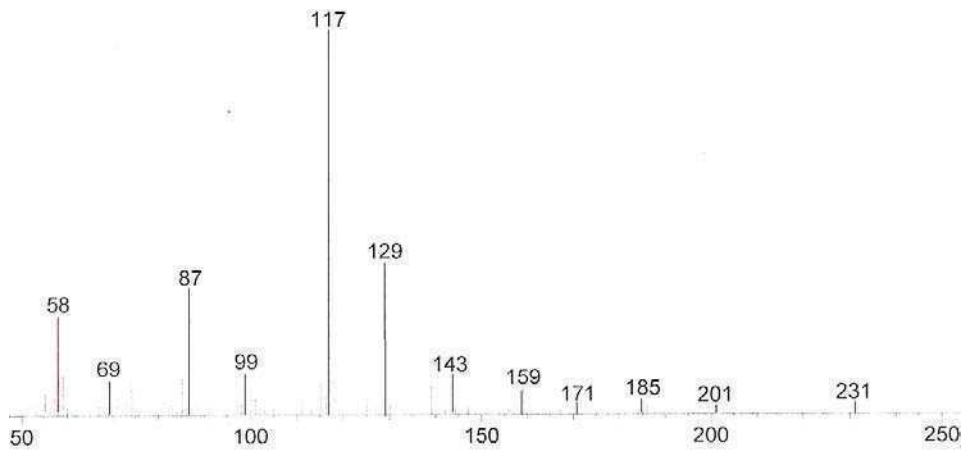
B) Principales espectros de masa registrados a unidades obtenidas por hidrólisis y derivatización a acetatos de alditoles de las fracciones metiladas.



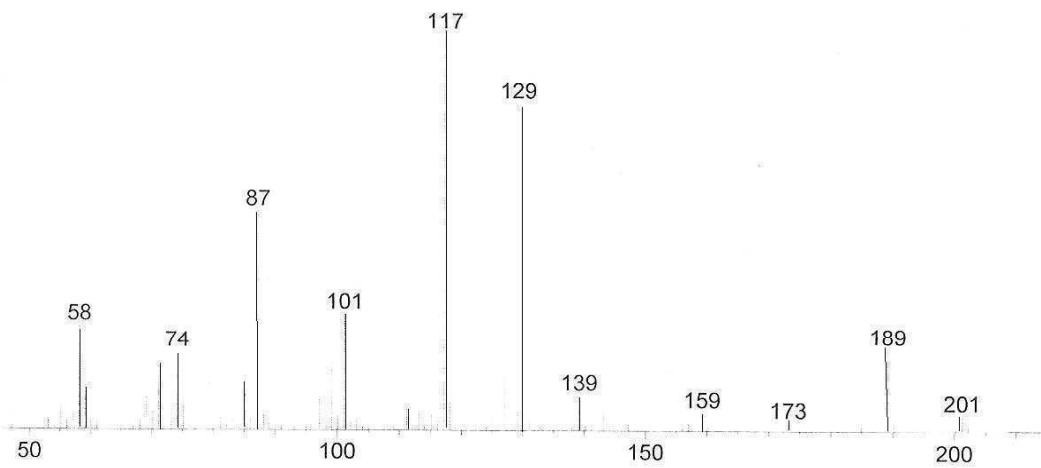
Espectro de masa de 1,3,5-tri-O-acetil-2,4,6-tri-O-metilhexitol
(derivado de 2,4,6-tri-O-metilmanosa)



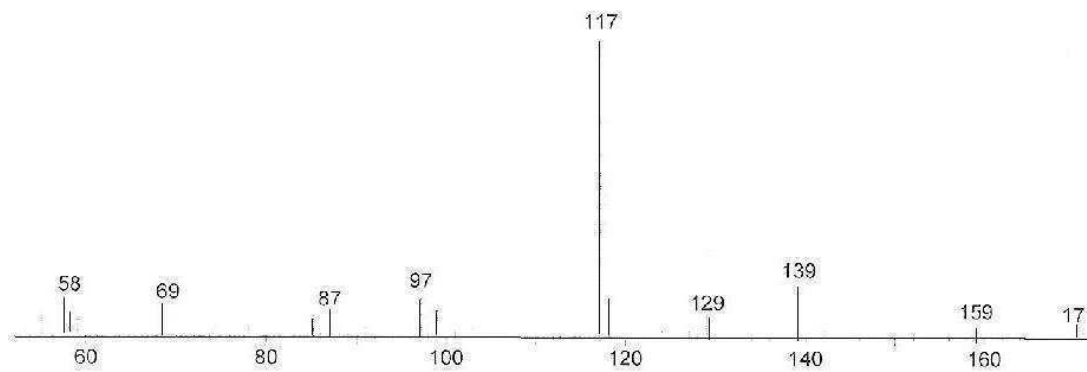
Espectro de masa de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-4,6-di-O-metilhexitol
(derivado de 4,6-di-O-metilmanosa)



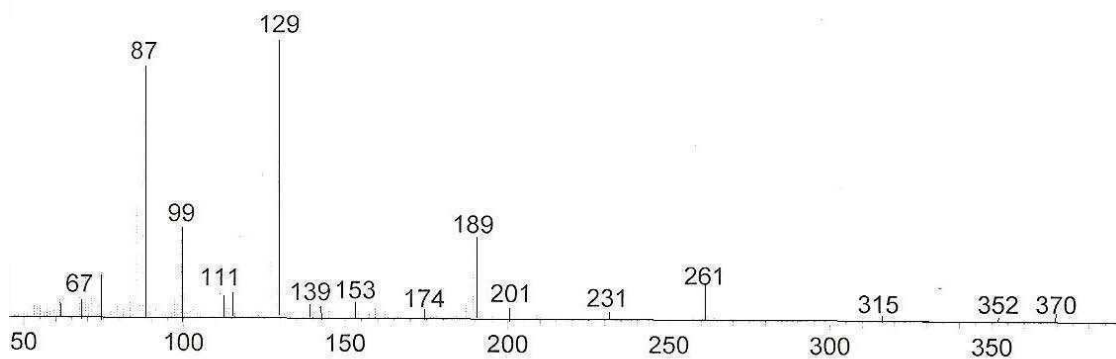
Espectro de masa de 1,3,4,5-tetra-O-acetil-2,6-di-O-metilhexitol
(derivado de 2,6-di-O-metilmanosa)



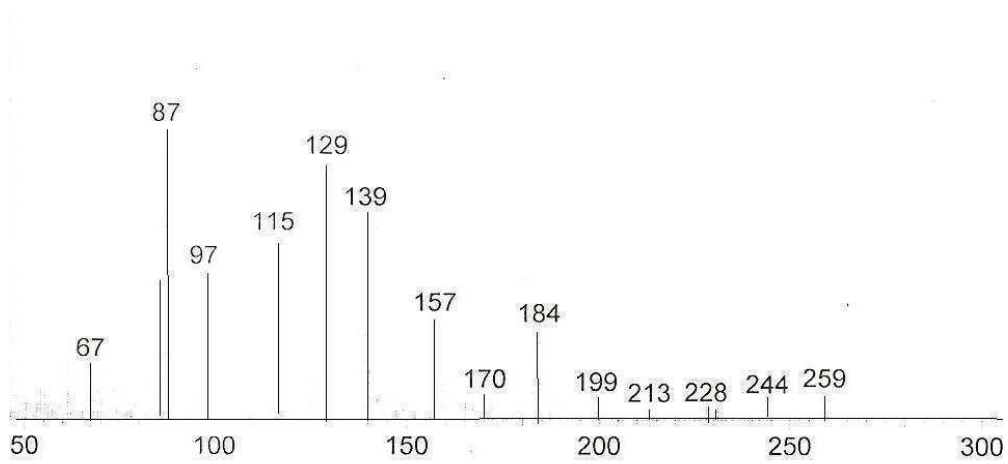
Espectro de masa de 1,3,5,6-tetra-O-acetil-2,4-di-O-metilhexitol
(derivado de 2,4-di-O-metilmanosa)



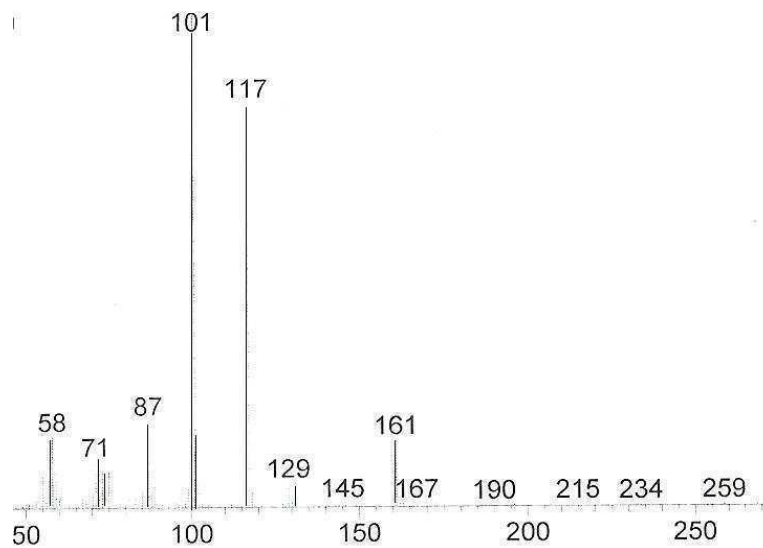
Espectro de masa de 1,3,4,5,6-penta-O-acetil-2-O-metilhexitol
(derivado de 2-O-metilmanosa)



Espectro de masa de 1,2,3,5,6-penta-O-acetil-4-O-metilhexitol
(derivado de 4-O-metilmanosa)



Espectro de masa de 1,2,3,4,5-penta-O-acetil-6-O-metilhexitol
(derivado de 6-O-metilmanosa)



Espectro de masa de 1,2-di-O-acetil-2,3,4-tri-O-metilpentitol
(derivado de 2,3,4-tri-O-metilxilosa)

Capítulo 5: METODOS EXPERIMENTALES Sección I

Consideraciones Generales:

- Las diálisis se efectuaron a temperatura ambiente con tubos de celulosa (Spectra/Por), utilizando en todos los casos corte de peso molecular (MWCO) 3.500, salvo en los extractos crudos (MWCO 6.000-8.000), durante un período de dos días contra agua corriente seguido de un día contra agua destilada, que se cambió cada 4-8 horas.
- Las centrifugaciones se realizaron en centrífuga Sigma 4K15C con rotores 12256 ó 12166 dependiendo del volumen de trabajo.
- Para las evaporaciones, se utilizó un evaporador rotatorio Büchi R205 a presión reducida con bomba de vacío Büchi V-700 y temperatura inferior a 45 °C, salvo en el caso de productos metilados en que fue inferior a 30°C.
- Las muestras se liofilizaron en equipo Virtis Freezemobile 3 a presiones inferiores a 200 mTorr y temperatura del condensador cercana a -45°C. Los productos secos se mantuvieron en desecador a presión reducida, sobre cloruro de calcio.
- Para las determinaciones colorimétricas, se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) o bien en espectrofotómetro JenWay 6505 UV/Visible usando celda de 1 cm de camino óptico.

EXTRACCION DE POLISACARIDOS

5.1. Material algal

Se trabajó con la fase gametofítica de *Nemalion helminthoides*. La primera serie de extracciones se realizó a partir de material recolectado en diciembre de 1994 en Miramar, provincia de Buenos Aires. El alga liofilizada se conservó en desecador en el laboratorio por más de una década. Este material dio lugar a la serie de productos de diálisis “PD” (ver 5.2.1).

La segunda serie de extracciones se realizó a partir de un pool de algas de recolecciones en abril y en diciembre de 2006 en Cabo Corrientes, Mar del Plata, provincia de Buenos Aires. Estas segundas extracciones dieron lugar a los productos de precipitación “PP” (ver 5.2.2.).

En ambos casos la recolección y reconocimiento del alga fueron gentilmente realizados por el especialista Lic. Hugo Benavides, del Instituto Nacional de Investigación y desarrollo Pesquero (INIDEP).

Una muestra de la colecta de abril 2006 fue depositada en el herbario del Museo de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Buenos Aires, con el número BA 46.775.

5.2. Extracciones acuosas a 90°C

5.2.1. Extracción y aislamiento por diálisis y liofilización (PD)

El material algal liofilizado (colecta 1994) se molió en molinillo. 55,8 g de alga molida se extrajeron en 1,20 L de agua a 90 °C por 4 h. Durante la extracción, realizada en balón sobre manta calefactora, se mantuvo agitación mecánica constante y se agregó unas gotas de meta-toluidina y ~50 mg de azida sódica, como conservantes. El extracto se centrifugó a 13130 xg durante 15 min. El sobrenadante se separó, se concentró a la mitad de su volumen, se dializó con bolsa MWCO 6.000-8.000 y se liofilizó, originando el extracto “producto de diálisis 1” (PD-1; 11,17 g). El residuo se extrajo dos veces más

con idéntico procedimiento y volúmenes de 800 mL y 580 mL, dando origen a PD-2 (1,31 g) y a PD-3 (0,30 g), respectivamente.

Nota: Se utilizó también material de la colecta 2006 para aislar dos productos de diálisis (PD1-bis y PD-2bis) a pequeña escala, con fines comparativos. Partiendo de 5,00 g de alga seca, se trabajó con idénticas condiciones, y se obtuvieron 1,10 g en el primer extracto y 0,13 g en el segundo.

5.2.2. Extracción y aislamiento por precipitación con isopropanol (PP)

El material algal fresco (colecta 2006) se lavó adecuadamente varias veces con agua de mar, se separó todo material contaminante (otras algas, valvas de molusco) y se secó por liofilizado.

145 g de alga seca y molida se extrajeron en 3,1 L de agua a 90°C por 4h. Durante la extracción en manta calefactora se mantuvo agitación mecánica constante y se agregó unas gotas de meta-toluidina y ~50 mg de azida sódica, como conservantes. Seguidamente el extracto se centrifugó 15 min a 13130 xg y se separó el sobrenadante, que se volcó muy lentamente sobre 4 volúmenes de isopropanol, con agitación manual con varilla de vidrio. Al cabo de una hora, se separó con la varilla el precipitado mayor y se colocó en papel de filtro, realizándose cuatro lavados sucesivos con acetona, y dejándose secar a temperatura ambiente. El isopropanol se centrifugó para aislar los precipitados más pequeños, que se secaron de la misma manera. Se obtuvo así el extracto “Producto de Precipitación 1” (PP-1; 41,52 g). Al residuo de la extracción se lo extrajo dos veces más con el mismo procedimiento y volúmenes de 2,0 L y 1,4 L, dando origen a PP-2 (7,34 g) y PP-3 (0,012 g), respectivamente.

PP-1 se repitió una vez de manera independiente y se obtuvieron 40,3 g a partir de 140 g de alga (colecta 2006).

FRACCIONAMIENTO

5.3. N1 a N7: fracciones de mananos y xilomananos sulfatados a partir de PP-1

20 g de PP-1 se disolvieron bajo agitación magnética durante 16 h en 2,2 L de agua, y la solución se centrifugó por 20 minutos a 13130 xg. para separar un residuo que se liofilizó (0,48 g)

A los 19,52 g disueltos en el sobrenadante se les agregó paulatinamente pequeños volúmenes de una solución 10% de Cetrimida (bromuro de hexadeciltrimetilamonio). La adición se realizó bajo agitación magnética, mientras se observaba la formación de un precipitado opalescente. Se continuó agregando hasta no observar precipitación. En total y en los distintos pasos, se necesitaron 270 mL de Cetrimida 10 % para completar la precipitación. La mezcla se centrifugó durante 20 min a 13139 xg y se conservó el precipitado. El sobrenadante se dializó, se liofilizó y se separó para su análisis.

Con el precipitado se inició el fraccionamiento, basado en su redisolución secuencial en soluciones de concentraciones crecientes de NaCl, en el rango 0,50 – 4,00 M. (Diagrama 1).

Al precipitado con Cetrimida (**p1**) se lo disolvió en 1,50 L de NaCl 0,50 M, dejando 16 h bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Se aisló el precipitado remanente (**p2**) por centrifugación a 13130 xg, lavándose 3 veces con 200 mL de NaCl 0,50 M, para optimizar la solubilización. El sobrenadante (~ 2,10 L) se extrajo en ampolla de decantación con 300 mL de 1-pentanol ($\times 3$) para aislar en la fase orgánica el cloruro de hexadeciltrimetilamonio. Se conservó solamente la fase acuosa, que se concentró, dializó y liofilizó, originando la fracción **N1** (390 mg).

El precipitado p2 se sometió al mismo procedimiento redisolviéndose en 1,40 L de solución de NaCl 1,00 M, dando origen a la fracción **N2** (150 mg). Con los sucesivos precipitados y por redisolución en concentraciones crecientes de NaCl se obtuvieron las fracciones **N3** (160 mg) en 750 mL de NaCl 1,50 M, **N4** (100 mg) en 950 mL NaCl 2,00 M, **N5** (7,01 g) en 750 mL de NaCl 3,00 M y **N6** (2,77 g) en 750 mL de NaCl 4,00 M. La fracción **N7** fue insoluble en NaCl 4,00 M, aun así se la conservó para analizar su estructura, dado su alto rendimiento (4,01 g).

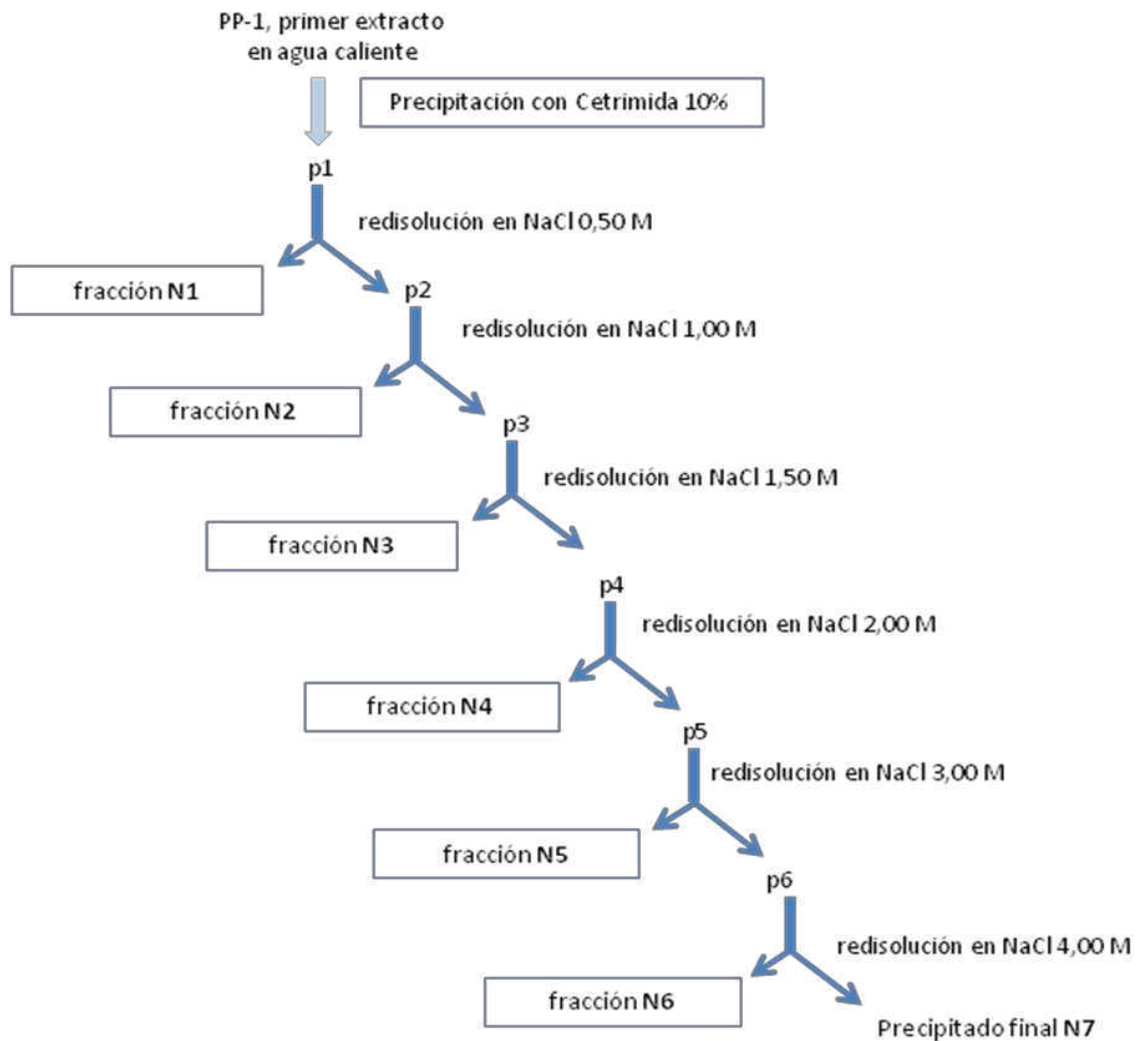


Diagrama 1. Esquema general del fraccionamiento de PP-1 que dio origen a las fracciones N1-N7.

Las fracciones N1 y N5 resultaron muy poco solubles en agua, por lo que se repitió el paso de solubilización en NaCl, de la molaridad correspondiente, y la extracción con 1-pentanol. Se prepararon así las fracciones N1 y N5 definitivas, con un rendimiento aproximado del 65%.

Con las fracciones que se utilizaron para actividad biológica, pese a no tener problemas de solubilidad, también se realizó esta segunda solubilización en NaCl y

extracción con 1-pentanol, a fin de asegurar una completa remoción del contraíón de Cetrimida. Esto dio origen a todas las fracciones N3, N4 y N6 utilizadas para actividad biológica.

Cuando se necesitó obtener mayor masa de las fracciones N3 y N4, el procedimiento se realizó una vez más a partir de los 20 g restantes de PP-1. Los rendimientos fueron similares, obteniéndose 240 mg de N3 y 140 mg de N4. También se sometieron a un segundo tratamiento con NaCl y 1-pentanol.

En todas las fracciones utilizadas para actividad biológica se verificó además la no contaminación con Cetrimida por RMN ^1H .

5.3. Obtención de fracciones neutras a partir de PD-2: xilanos mixtos $\beta\text{-D-(1}\rightarrow\text{3; 1}\rightarrow\text{4)}$

5.3.1. Separación de polisacáridos cargados y neutros

610 mg del extracto PD-2 se disolvieron 16 h en 60 mL de agua bajo agitación magnética leve. La solución se centrifugó 10 min. a 4904 xg y se separó el material insoluble (31 mg). Al sobrenadante se lo trató con Cetrimida 10% bajo agitación constante por 16 h, con el objetivo de precipitar a los polisacáridos cargados (volumen necesario hasta precipitación negativa: 7 mL). Se centrifugó 15 min. a 5836 xg y el sobrenadante se dializó, se concentró y liofilizó. Se obtuvo así la fracción “PD-2 neutra” (78,3 mg).

El precipitado con Cetrimida se resuspendió directamente en 60 mL de NaCl 4,00 M, se centrifugó 15 min. a 5836 xg, el sobrenadante se extrajo con 25 mL de 1-pentanol (x 3), se dializó y liofilizó; se aislaron 160 mg de fracción “PD-2 no neutra”.

El procedimiento se realizó una vez más de manera independiente; se partió de 500 mg de PD-2, obteniéndose un rendimiento similar (57,0 mg “PD2-neutra-bis”).

5.3.2. Columna de intercambio aniónico

Se preparó una columna analítica (9,5 cm x 1,0 cm) con DEAE Sephadex A-25 (Cl⁻), hinchada previamente en agua, durante 2 h, en baño de agua a ebullición.

23 mg de “PD-2 neutra” en 5 mL de agua se pasaron por la columna, que se eluyó con agua. Se colectaron fracciones de 1 mL, y 10 μL de cada una se analizaron en

contenido de hidratos de carbono por el método de fenol-sulfúrico. Se graficaron las absorbancias a 490 nm en función del volumen eluido. Las fracciones correspondientes a un mismo pico se juntaron – tubos 3 a 18 - y se liofilizaron para dar la fracción “xilano neutro” (10,9 mg). Los polisacáridos retenidos en la columna se eluyeron con NaCl 4,00 M, y se juntaron para su análisis.

Cuando se repitió la columna de intercambio a partir del 45 mg de “PD2-neutra-bis”, se obtuvo nuevamente un rendimiento similar: los tubos 3 a 20 conformaban un mismo pico, del que se obtuvieron 25,9 mg de una nueva fracción “xilano neutro”.

5.4. Aislamiento de xilanos β -D-(1 \rightarrow 4): extracciones alcalinas al residuo final

5 g del residuo final de la serie PP se extrajeron en 500 mL de NaOH 8% m/v por 4 h a temperatura ambiente, con 50 mg de NaBH₄ y previo burbujeo de N₂ a fin de evitar reacciones de oxidación en el medio alcalino. La mezcla se dializó para remover el NaOH. A continuación, se centrifugó 15 min el dializado a 13130 xg y se conservó el sobrenadante, que se precipitó paulatinamente en tres volúmenes de isopropanol. Se dejó secar al aire, y luego se realizaron otros tres secados con solventes en la secuencia acetona – isopropanol – acetona, dando origen a “E1”. El procedimiento, que se realizó en su totalidad según Matulewicz y Cerezo (1987a), se repitió dos veces más con el residuo remanente siguiendo idénticas proporciones. Se obtuvieron así “E2” y “E3”.

MODIFICACIONES QUIMICAS

5.6. Sulfatación de mananos

5.6.1. Obtención de las sales de piridinio de las fracciones N5 y N6

Para todas las reacciones de sulfatación, se prepararon en primer lugar las sales de piridinio de la fracción a sulfatar. Soluciones 10 mg/mL de N5 ó N6 se pasaron por resina de intercambio IR-120 plus (forma H⁺), eluyéndose directamente sobre una solución de piridina 20 % v/v. Lo obtenido se dializó para remover el exceso de piridina y se liofilizó. El rendimiento fue de 70-80% en promedio en las preparaciones. Una vez obtenidas, se procedió enseguida a la sulfatación, dado que estas sales no son muy estables y tienden a degradarse.

5.6.2. Método de sulfatación con el complejo SO₃-piridina

Se prepararon soluciones de 1 % de sales de piridinio en DMSO, y se agitó O.N. A 175 mg de sales de N6 se agregaron 1,20 g de complejo SO₃-piridina y se mantuvo a 60°C durante 2 ó 3 h, bajo agitación magnética leve. La mezcla se dializó sucesivamente con agua, NaCl 0,10 M para intercambiar Na⁺ con Py⁺, y luego normalmente con agua. Así se obtuvieron a las dos horas N6S-2h (97 mg) y a las tres horas N6S-3h (105 mg).

Cuando se repitió el protocolo durante 2 h, se partió la primera vez de 26 mg de sales de piridinio y se obtuvieron 23 mg de producto sulfatado; la segunda vez, se partió de 60 mg de sales de piridinio y se recuperaron 56 mg de producto.

N5 sulfatado (58 mg) se obtuvo a partir de 60 mg de sales de piridinio con la misma proporción de agente sulfatante, durante 2 h a 60 °C.

5.6.3. Método con H₂SO₄ - DCC

Se realizó según Takano y colaboradores (1996). 50 mg de sales de piridinio de N6 se disolvieron en 2,70 mL de N,N-dimetilformamida (DMF). A continuación se agregaron 0,12 g de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) disueltos en 1,50 mL de DMF. La solución se enfrió a 0°C, y se agregó 13,5 mg H₂SO₄ en 0,70 mL de DMF. Se agitó por 15 min a 0 °C bajo atmósfera de N₂. Se volcó en 500 g de hielo partido, se neutralizó con NaOH 0,10 M y se dializó. Luego de la diálisis se observó precipitado blanco (urea), que se filtró con papel Whatman n°1. Se probó también variando al doble la cantidad de agente sulfatante.

5.7. Oxidación y degradación de Smith a xilomananos

Se realizó según Cardoso y colaboradores (2007). Se aplicó por igual a N2, N3, N4 y F3. Aproximadamente 50 mg de polisacárido se disolvieron en 20 mL de NaIO₄ 0,050 M. Se agitó 2 h magnéticamente (en oscuridad) y se dejó por 48 h también en oscuridad. Al cabo de ese tiempo, se agregaron 2 mL de etanodiol y la mezcla se dializó durante dos días. Luego el dializado se concentró a aproximadamente 2 mL y se dejó

reduciendo con NaBH_4 durante 15 horas. Se llevó a pH ácido con ácido acético y se dializó durante 48 h. Se hidrolizó con TFA 1,00 M durante 20 h, a 25 °C. Al finalizar se neutralizó con NaOH 1,00 M, se dializó normalmente y se liofilizó. El tratamiento aplicado a las distintas fracciones dio lugar a “N2-Smith”, “N3-Smith”, “N4-Smith” y “F3-Smith”.

ANALISIS DE COMPOSICION DE EXTRACTOS CRUDOS Y DE FRACCIONES NATIVAS Y MODIFICADAS

Las determinaciones se realizaron al menos por duplicado a partir de soluciones independientes.

5.8. Determinación de monosacáridos componentes

Se determinaron por cromatografía gaseosa (CG), previa hidrólisis del polisacárido y derivatización de los monosacáridos componentes a alditoles peracetilados.

5.8.1 Hidrólisis total a monosacáridos

La hidrólisis total se realizó a partir de 2-3 mg de muestra, en 1,00 mL de TFA 2,00 M a una temperatura de 121°C durante 2 h. Una vez finalizada, se procedió a eliminar el ácido con corriente de aire. Se agregaron 200 μL de agua y se llevó a sequedad nuevamente con el objetivo de eliminar todo resto de ácido; este procedimiento se repitió 2 veces más.

El precipitado final de las extracciones se hidrolizó según Morrison (1988). 3 mg de muestra se disolvieron en 0,20 mL de TFA concentrado y se calentaron a 37 °C durante 60 min. Al cabo de ese tiempo, se agregaron 25 μL de agua y la mezcla se dejó a 100 °C por 60 min. Luego se agregaron 1,054 mL de agua, llegándose a concentración 2,00 M de TFA, y se dejó la mezcla a 121 °C por 90 min.

5.8.2. Preparación de alditoles acetilados

La mezcla de monosacáridos obtenida por hidrólisis se disolvió en 1 mL de agua. Se agregaron 80 mg de NaBH_4 y se dejó un mínimo de dos horas para reducir la muestra. Al cabo de ese tiempo se destruyó el exceso de agente reductor agregando resina de intercambio catiónico Amberlite IR-120 plus (H^+). Se controló que el pH bajara a 4,00 y luego se filtró al vacío con papel de filtro. Se evaporó el agua hasta sequedad y se lavó la muestra 5 veces consecutivas con metanol para eliminar el ácido bórico como borato de metilo.

A continuación se procedió a la acetilación de la muestra con anhídrido acético-piridina 1:1, 30 min a 80 °C. Una vez enfriada la muestra, se agregó 1 mL de agua y se extrajo con 1 mL de Cl_3CH ; la fase acuosa se reextrajo dos veces más con 1 mL de Cl_3CH . Se juntaron las fases clorofórmicas y se lavaron con 1 mL de solución saturada de NaHCO_3 ($\times 3$). Finalmente se lavó 2 veces con 1 mL de agua, siempre conservando la fase clorofórmica, que se secó con Na_2SO_4 y se filtró al vacío. El cloroformo se evaporó hasta sequedad y se conservó la muestra a -20°C para analizar por CG.

5.8.3. Cromatografía gaseosa de los monosacáridos derivatizados

Los monosacáridos derivatizados según 4.1.2 se disolvieron en 30-50 μL de cloroformo y 1 μL de muestra se inyectó en columna capilar SP-2330 (Supelco) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 μm de espesor de fase estacionaria. Se trabajó con una presión de cabeza de 15 psi y un flujo de gas portador de 1 mL/min. Las corridas se realizaron de forma isotérmica con 220 °C de temperatura del horno y 240 °C de inyector y detector. Cada pico se identificó contra estándar según los tiempos de retención. Se utilizó para ello una mezcla de monosacáridos comerciales (Sigma-Aldrich) compuesta por Ram, Fuc, Ara, Xil, Man, Gal y Glc.

5.9. Determinación cuantitativa de hidratos de carbono totales

Se realizó según la técnica de Dubois et al. (1956), que utiliza ácido sulfúrico 98% (grado analítico) y solución acuosa de fenol 5%.

Procedimiento: A una solución diluida de hidrato de carbono (que contuviera entre 10 y 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 0,500 mL), tanto de los extractos como de las fracciones, se le agregó

0,5 mL de la solución de fenol y se la agitó. Luego se dejó caer 2,5 mL de sulfúrico concentrado por dispensador automático. Los tubos se agitaron a los 10 min con vórtex, y luego de 20 min a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 490 nm. En paralelo se realizó un blanco con agua y una curva de calibración cubriendo el rango 10-70 μg con monosacáridos comerciales de manosa o xilosa, de acuerdo a la composición mayoritaria de la fracción.

5.10. Determinación cuantitativa del contenido de sulfato

Se efectuó en todos los casos por el método turbidimétrico detallado en 5.10.1. y en algunos casos, a modo de doble verificación, se realizó también por el método conductimétrico enunciado en 5.10.2, hallándose siempre resultados similares por ambos métodos.

5.10.1. Método turbidimétrico según Dodgson y Price (1962)

Se utilizaron como reactivos una solución de cloruro de bario – gelatina y ácido tricoloroacético (TCA) 3% p/v. También un estándar de Na_2SO_4 en HCl 1,00 M de manera de cubrir el rango 40-400 μg de $\text{SO}_4^{2-}/\text{mL}$.

Procedimiento: Se hidrolizó la muestra de polisacárido (4-5 mg) en 1 mL de HCl 1,00 M a 105-110 °C durante 5 h. Una vez enfriada, se tomaron diferentes alícuotas llevando a volumen final de 0,5 mL con HCl 1,00 M. A cada una, en paralelo con el estándar, se agregó 3,50 mL de TCA, se mezcló por agitación y se agregó 1 mL de cloruro de bario-gelatina, mezclando nuevamente. Luego de 15-20 min se registró la absorbancia a 360 nm y se refirió a la curva de calibración para interpolar el contenido (% m/m) de SO_4^{2-} . Dicho contenido se transformó proporcionalmente a contenido de NaSO_3^- , en una aproximación a como se presentan los grupos sulfato en los polisacáridos, y luego a % m/m de la muestra analizada.

Para la preparación de cloruro de bario-gelatina, se disolvieron a 60-70°C 50 mg de gelatina (Oxoid, libre de sulfato) en 50 mL de agua desionizada. Se dejó a 4 °C al menos 6 h. Luego se agregaron 250 mg de cloruro de bario, dejando a 4 °C 3 h más.

5.10.2. Cromatografía iónica con detector conductimétrico

Se utilizó como segundo método para corroborar contenido de sulfato en: “xilano neutro”, “PD-2 sobrenadante”, PD-1, PD-2, N6 y N7 y en todos los derivados sulfatados.

4-5 mg de muestra se hidrolizaron en TFA 2,00 M durante 2 h a 121 °C. Las muestras se evaporaron hasta sequedad y se redisolieron en agua Milli-Q. Se utilizó un cromatógrafo iónico DIONEX DX-100 equipado con una columna AS4A (250 x 4 mm) y un detector conductimétrico. El eluyente fue 1.8 mM Na₂CO₃/1.7 mM NaHCO₃, a un flujo de 2 ml/min.

5.11. Determinación del contenido de proteínas

Se realizó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) para las muestras solubles en agua. Se utilizaron como reactivos:

Solución A: Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0,1 N

Solución B: sulfato cúprico pentahidratado al 0,5% en tartrato de sodio y potasio al 1%.

Solución C: 50 ml A + 1 ml C, preparados en el momento.

Solución D: reactivo de Folin-Ciocalteau (Merck) diluido al medio en agua.

Procedimiento: A 400 µL de muestra que contenga hasta 200 µg de proteína:

- agregar 2 ml de solución C
- mezclar y dejar 10 min
- agregar 0,2 ml de solución D y mezclar
- dejar en reposo 30 min y medir absorbancia a 500 nm, en paralelo con curva de BSA cubriendo un rango 20-200 µg de proteína.

En el caso de las muestra insolubles (N7 y los extractos alcalinos del precipitado final) se determinó el contenido (% m/m) de nitrógeno por análisis elemental. Dicho contenido se convirtió a % de proteína utilizando la conversión % N x 6,25.

5.12. Determinación del peso molecular promedio

El peso molecular promedio de las muestras se determinó por dosaje de sus extremos reductores, y comparación de los mismos con sus contenidos de hidratos de carbono y de sulfato.

5.12.1. Dosaje de extremos reductores

Se realizó según el método colorimétrico de Park y Johnson (1949). Se utilizaron como reactivos las siguientes tres soluciones:

- Solución A: ferricianuro de potasio (0,05 % p/v).
- Solución B: carbonato de sodio (0,53 % p/v) y cianuro de potasio (0,065 % p/v).
- Solución C: sulfato amónico-férrico (0,15 % p/v) y dodecil sulfato de sodio (SDS; 0,10 % p/v) en H₂SO₄ 0,025 M.

Procedimiento:

A 0,50 mL de solución de muestra (entre 2 y 4 mg/mL), se agregaron 0,50 mL de solución A + 0,50 mL de solución B. Se mezcló por agitación y se calentó en baño de agua hirviendo durante 15 minutos. Una vez enfriado, se agregaron 2,50 mL de solución C. Luego de 15 minutos en reposo, se registraron las absorbancias a 690 nm. Paralelamente se procesó una curva patrón con unidades de manosa cubriendo el rango 6-30 nmoles de azúcar reductor en 0,500 mL.

5.12.2. Cálculo del Peso Molecular Promedio Numérico

Teniendo en cuenta los contenidos de extremos reductores, de hidratos de carbono y de sulfato, se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Peso Molecular } \textit{promedio numérico} = \frac{(\% \text{ m/m Hidratos De Carbono} + \% \text{ m/m SO}_4^{2-}) \times 180}{\% \text{ azúcar reductor}}$$

5.13. Homogeneidad por HPSEC

Se determinó la homogeneidad de las fracciones en un cromatógrafo High-Performance Size Exclusion (Waters, USA) con bomba Waters (Modelo 515) y refractómetro diferencial (Modelo 2410 RID). Se utilizaron cuatro columnas Waters Ultrahydrogel (2000, 500, 250 y 120) conectadas en serie y se eluyó con una solución 0,1 M de NaNO_2 (200 ppm NaN_3 como conservante) a un flujo de 0,6 mL/min. Las muestras (1 mg/mL), disueltas en el mismo solvente, se mantuvieron 2 h bajo agitación magnética y se filtraron con membranas de nitrocelulosa de 0,45 y 0,22 μm . Las corridas se realizaron a 25 °C y los datos fueron recolectados y analizados con el programa ASTRA (Wyatt Technology).

ANALISIS ESTRUCTURAL DE FRACCIONES NATIVAS Y MODIFICADAS

5.14. Metilación

Se debieron utilizar distintos métodos ya que no todas las fracciones lograban metilarse por el método ensayado en primer lugar, que en todos los casos fue el de Ciucanu y Kerek (ver 5.1.1).

A todas las fracciones de polisacáridos sulfatados se los convirtió primeramente en sus sales de trietilamonio, para mejorar su solubilidad en DMSO, el solvente de reacción. Se hizo por intercambio en columna con resina Amberlite IR-plus- H^+ previamente equilibrada con solución 5 % p/v de clorhidrato de trietilamina, según la adaptación de Stevenson y Fourneaux (1991).

5.14.1 Metilación con NaOH-ICH_3

Las fracciones N3 (7 mg), N4 (14 mg), N5 (19,6 mg), N7 (20 mg), N6S-2h (12 mg), N6S-3h (21 mg), N3-Smith (9 mg) y N4-Smith (20 mg) se metilaron por el método de Ciucanu y Kerek (1984). En todos los casos se utilizó como material de partida sus correspondientes sales de trietilamonio. En el caso del precipitado N7, su solubilidad se

optimizó usando LiCl-DMSO como solvente inicial, con LiCl 10 % m/v (Petruš et al., 1995).

El procedimiento tuvo adaptaciones a lo largo del trabajo respecto de los tiempos de incubación. La modificación más relevante, que mejoró significativamente el nivel de metilación, fue el tratamiento 16 h en el primer paso con NaOH.

Procedimiento:

- Polisacárido o sales de trietilamonio del mismo se disuelven en DMSO en una proporción 10 mg/mL. Se agita el tiempo necesario hasta disolución.
- Se agregan 100 mg de NaOH molido en mortero por cada 10 mg de muestra. Se sonica la muestra 15 min, se deja descansar otros 15 min, y luego se vuelve a sonicar 15 min. Se deja la muestra bajo agitación magnética por 16 h.
- Se agregan 0,5 mL de ICH_3 por cada 10 mg de muestra, en baño de hielo. Se sonica 15 min. y se deja 45 min bajo agitación magnética.
- Se agrega nuevamente NaOH en las mismas proporciones que en el primer paso. Se sonica nuevamente 15 min ($\times 2$) con un intervalo de 15 min. Luego se deja 2 h bajo agitación magnética
- Se agrega otro ciclo de ICH_3 , sonicando 15 min y dejando agitar 45 min más.
- Se agregan 10 mL de agua, se dializa y liofiliza.

Rendimientos finales luego de todos los pasos de metilación: N3, 3 mg; N4, 5 mg; N5, 10 mg; N7, 5,5 mg; N6S-2h, 3 mg; N6S-3h, 4 mg; N3-Smith, 3,1 mg; N4-Smith, 7,6 mg.

La fracción “xilano neutro” fue directamente soluble en DMSO. Se partió de 7 mg y se permetiló en un paso por este método, con la diferencia de que no se realizó diálisis sino extracción con cloroformo (4 mL) de los derivados metilados ($\times 4$). El cloroformo se evaporó hasta sequedad para el posterior análisis de la muestra. Se analizó también la presencia de derivados metilados en la fase acuosa.

5.14.2. Métilación con NaOH - $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{SO}_2$.

N6 se metiló en un primer paso por el método de Haworth (1915). 20,0 mg de la fracción se disolvieron en 0,60 mL de agua y se dejaron reduciendo con NaBH_4 durante 16 h bajo agitación, al cabo de lo cual se agregaron 120 μL de NaOH 30%. Luego se mantuvo agitación vigorosa mientras se agregaban gota a gota alternadamente 280 μL de sulfato de dimetilo y 840 μL de NaOH 30 %, en baño de hielo y bajo atmósfera de N_2 . La agitación continuó durante 5 h. Se realizaron dos agregados adicionales de NaOH y sulfato de dimetilo, en las mismas condiciones, con incubaciones más cortas. Se agregaron 5 mL de agua, la mezcla se dializó y liofilizó. Luego de esta primera metilación, se realizaron dos pasos por Ciucanu y Kerek, llegándose a composición constante. Rendimiento final: 3 mg.

5.14.3. Análisis de monosacáridos componentes de los polisacáridos metilados

Se realizó de manera similar a los expuesto en 5.8. para las muestras no metiladas. Como única diferencia, las corridas en CG se realizaron bajo el programa: temperatura inicial 160 °C con rampa a 2 °C/min hasta 210 °C, luego rampa 5 °C/min hasta 240 °C seguidos de 30 min de corrida a 240 °C (Shea y Carpita, 1988). Se utilizaron como estándares muestras conocidas metiladas previamente en el labotario.

Además, en las muestras en que se consideró pertinente, para lograr una mejor separación entre los picos de 1,2,3,5-tetra-O-acetil-4,6-di-O-metilmanitol y 1,3,4,5-tetra-O-acetil-2,6-di-O-metilmanitol se efectuaron corridas adicionales en columna capilar SP-2380, con las rampas de temperatura indicadas, y también bajo el siguiente programa: 20 min a 190 °C, rampa 2 °C/min hasta 230 °C, seguido de 35 min de corrida. Si bien se logró una mejor separación, las áreas de integración no difirieron de las obtenidas con las corridas originales.

5.15. Estudios de desulfatación-metilación

5.15.1 Desulfatación de las fracciones mayoritarias: N5, N6 y N7

Con la fracción N5 se ensayó el tiempo requerido para lograr una desulfatación exhaustiva luego utilizable en las restantes fracciones. 40 mg de N5 se colocaron en

cloruro de hidrógeno metanólico 0,10 M (30 mL; formado a partir de 35 mL de metanol anhidro + 250 μ L de cloruro de acetilo). Se preparó en paralelo por cuadruplicado y las soluciones se agitaron a temperatura ambiente durante 24, 48, 72 ó 96 h. Para detener la reacción se agregaron 10 mL de agua, se llevó la mezcla a neutralidad con NaHCO_3 y se liofilizó. Luego se determinó el contenido de sulfato.

24 h fueron suficientes para obtener fracciones con un contenido de sulfato de sólo 5%, y este porcentaje no mejoró con tiempos mayores de reacción. Se decidió de todas formas desulfatar durante 48 h 100 mg de N6 y 100 mg de N7 en 75 mL de cloruro de hidrógeno metanólico. Así se obtuvieron las fracciones N6DS (80 mg) y N7DS (40 mg). Para los análisis de N5 se siguió trabajando con la fracción de 48 h (N5DS; 26 mg)

5.15.2. Metilación de fracciones desulfatadas

N5DS (22 mg), N6DS (21 mg) and N7DS (24 mg) se trataron en primer lugar con el método de Haworth (ver 5.14.2) y, luego se metilaron dos veces por el método de Ciucanu y Kerek (ver 5.1.1) hasta lograr composición constante. Las masas finales luego de los tres pasos de metilación: N5DS, 12,4 mg; N6DS, 4 mg; N7DS, 11,5 mg. La composición de las muestras se analizó tal como se describe en 5.14.3. para polisacáridos metilados.

5.16. RMN

Las fracciones N3, N4, N5, N6, N3-Smith, N4-Smith y los extractos PP-1 y PP-2 (20-30 mg) se intercambiaron con agua deuterada por tres liofilizaciones sucesivas y luego se disolvieron en 0,50 mL de agua deuterada (D_2O). La fracción N7, insoluble en agua, se disolvió en dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6). Los espectros se registraron a 70 °C, en tubos de 5 mm, en un espectrómetro Bruker DRX400.

En el caso de los experimentos de RMN ^1H a 400-MHz los parámetros utilizados fueron: ancho espectral de 6.1 kHz, 90° de ángulo de pulso, tiempo de adquisición de 5.2 segundos, 16-32 scans.

En los espectros a 100.63 MHz de ^{13}C -RMN con desacoplamiento protónico se utilizaron los parámetros: ángulo de pulso de 90° ; tiempo entre pulsos de 0,11 seg.; tiempo de adquisición de 0,59 seg.; ancho espectral de 20,1 kHz, 33.000-90.000 scans.

Las fracciones N6S-2h, N6S-3h y N5S se prepararon de la misma manera; los espectros se registraron a 60°C bajo los parámetros: 90° de ángulo de pulso, ancho espectral de 24,0 kHz, tiempo entre pulsos de 0,10 seg., tiempo de adquisición de 0,55 seg., 80.000-90.000 scans. Y para los espectros de 400-MHz ^1H -RMN, 90° de ángulo de pulso, ancho espectral de 4,3 kHz, tiempo de adquisición de 7,7 seg., 16-32 scans.

El espectro de ^{13}C -RMN de N6DS se realizó en NaOH 0,50 M en D_2O - H_2O 1:1 a 40°C , y fijando a 61,9 ppm la señal correspondiente al C-6.

La fracción “xilano neutro” (15 mg) se disolvió en 0,50 mL de D_2O - H_2O 1:1 y el espectro de ^{13}C -RMN con desacoplamiento protónico fue registrado a temperatura ambiente en tubo de 5 mm en equipo Bruker AM500 con un ancho espectral de 29,4 kHz, ángulo de pulso de 51.4° , tiempo de adquisición de 0,56 seg., tiempo entre pulsos de 0,60 seg, 30.000 scans.

En todos los casos los desplazamientos químicos se midieron en relación a acetona como estándar intero, a 2,21 ppm en ^1H -RMN y 31,1 ppm en ^{13}C -RMN. En el caso del espectro de N7 se usó como referencia DMSO- d_6 , a 39,8 ppm.

5.17. Cromatografía gaseosa - espectrometría de masa

De todas las muestras metiladas y de las principales no metiladas, sus acetatos de alditoles fueron analizados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa en un espectrómetro GCMS-QP 5050A (Shimadzu Corporation). Las cromatografías se realizaron en columna SP-2330 usando el programa isotérmico para las muestras no metiladas (ver 5.8.3.) y el programa con rampa para los metilados (ver 5.14.3.) El flujo total de He fue de 4.4 mL/min, la presión de cabeza de 12 psi; la temperatura del inyector 250°C y la relación de split 10:1. Los espectros de masa fueron registrados en un rango de masa de 30-600 Da, con un potencial de ionización de 70 eV. El análisis de los picos se efectuó en el programa CLASS-5K contando con espectros modelo.

Sección II



**Capítulo 6: INTRODUCCION A ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE
POLISACARIDOS DE ALGAS**

Tal como se introdujo en el Cap. 2, además de las aplicaciones industriales de polisacáridos, éstos ofrecen un campo promisorio y de amplia investigación en el área de la salud dada sus propiedades como anticoagulantes, antivirales, antioxidantes, inmunomoduladores y antitumorales (Wijesekara et al., 2010).

El alto potencial terapéutico de los polisacáridos sulfatados de algas se explica en parte por su analogía estructural con los glicosaminoglicanos (GAGs) presentes en la membrana celular y en la matriz extracelular, implicados en numerosas funciones fisiológicas (Pujol et al., 2007). El dermatán sulfato, el condroitín sulfato y el heparán sulfato (HS) son GAGs importantes en la fisiología animal. Por otra parte, y como se detallará en la sección de actividad inmunomoduladora, pese a la analogía estructural muchos polisacáridos son reconocidos como exógenos, provocando una respuesta inmune en animales.

ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Dentro de los GAGs, el HS está involucrado en varias funciones homeostáticas y también constituye un receptor de entrada de muchos virus. De localización ubicua, se hallan en las matrices extracelulares de todos los animales cadenas de carbohidratos de HS unidas a “cores” proteicos de las membranas celulares. Estas cadenas exhiben una amplia variedad estructural (Spillmann, 2001), siendo su estructura básica un esqueleto lineal en el cual alternan unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina enlazadas por uniones α -(1→4). Las modificaciones biosintéticas más frecuentes son la N-deacetilación y N-sulfatación de la glucosamina, epimerización del C-5 del ácido idurónico, además de la O-sulfatación de ambas unidades, específicamente en C-2 del ácido urónico y en C-6 de la glucosamina (Fig. 1).

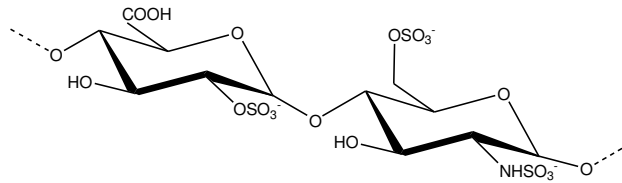


Figura 1. Disacárido básico del heparán sulfato, componente abundante de los proteoglicanos de células animales, en su versión más sulfatada.

Algunos virus envueltos patógenos en humanos, entre ellos herpes simplex (HSV), citomegalovirus (HCMV), respiratorio sincicial (RSV), dengue (DENV), de papiloma (HPV), influenza A, de inmunodeficiencia (HIV), Junín (JUNV) y Tacaribe son susceptibles a la inhibición por polisacáridos sulfatados (Damonte et al., 2004). En efecto, estos virus utilizan el HS de la membrana celular como receptor primario (Pujol et al., 2007; Spillmann, 2001). Esta particularidad explica la inhibición de amplio espectro ejercida por parte de polisulfatos, que mediante su carga negativa interactúan con las cargas positivas de las glicoproteínas virales, interfiriendo en la adhesión al HS y la posterior entrada del virus a la célula.

Muy estudiados al respecto fueron los polisacáridos de algas rojas, en particular distintos aislamientos de carragenanos. También se estudiaron numerosos fucoidanos de algas pardas y algunas fracciones de algas verdes. La heparina de origen animal, de estructura muy similar al HS pero de mayor grado de sulfatación y peso molecular, además de productos de semisíntesis como el pentosán sulfato (obtenido por sulfatación de (1→4)-β-D-xilanos de plantas) y el dextrán sulfato (por sulfatación de (1→6)-α-D-glucanos ramificados de bacterias), también exhiben buena actividad inhibitoria de virus envueltos y suelen usarse como sustancias de referencia en las determinaciones de actividad antiviral de los productos de algas.

Los polisacáridos sulfatados actúan generalmente como inhibidores de la adsorción viral y, con menos frecuencia, en etapas tempranas de la internalización (Witvrouw y de Clercq, 1997); en sólo algunas ocasiones se reportó inhibición en etapas posteriores a la internalización (Gonzalez et al., 1987).

La abundante información recopilada en las últimas décadas permitió realizar algunas generalizaciones respecto de los parámetros que mejorarían la capacidad antiviral de un polisacárido sulfatado (Pujol et al., 2007):

- ✓ el peso molecular, siendo óptimo el rango 10-100 kDa
- ✓ el grado de sulfatación, tendrían menor actividad las estructuras con sulfato menor al 20 %
- ✓ la linealidad, en general las estructuras ramificadas serían menos activas
- ✓ las posiciones de sulfatación, cuanto más similar al HS mejor mimetizan su estructura
- ✓ la forma de macromolécula, de acuerdo a sus interacciones internas tanto iónicas como hidrofóbicas, y su capacidad de adaptarse a la proteína viral.

HSV-1 y HSV-2 fueron de los primeros virus con los que se demostró el requerimiento de HS para la adsorción a la célula, evitándose infecciones por tratamiento con heparinasas - y no por condroitinasas - (Spear, 1993), y también en células mutadas carentes de HS (Rostand y Esko, 1997).

Si bien el HS es bastante menos sulfatado que la heparina, se ha utilizado a esta última como herramienta de esclarecimiento del tipo de interacción que opera entre proteínas virales y estos carbohidratos de carga negativa (Spillmann y Lindahl, 1994). Se asume que dichas proteínas contienen aminoácidos básicos, ya sea expuestos en un “cluster” o en forma discontinua con algún motivo determinado. Así, la especificidad de reconocimiento de algunos virus fue probada con heparinas químicamente modificadas, en particular por desulfataciones selectivas. En el caso de HSV-1, se concluyó el requerimiento de un oligómero mínimo de 10-12 unidades y la O-sulfatación en C-2 y C-6 para mantener la actividad inhibitoria (Feyzi et al., 1997). Para el caso del virus dengue, en cambio, no se mostraron relevantes las posiciones de sulfatación sino solamente que fueran heparinas altamente sulfadas (Chen et al., 1997).

6.1. Virus herpes

Dentro de la familia Herpesviridae, se conocen ocho tipos de herpesvirus específicos humanos, que presentan como característica común la capacidad de establecer latencia

en el huésped generando infecciones recurrentes: HSV-1 y HSV-2, varicella-zoster, HCMV, virus Epstein-Barr (EBV) y los herpesvirus humanos 6, 7 y 8.

Se trata de virus envueltos, con genomas de ADN ubicados en un “core”, rodeado por la cápside, luego por el tegumento y a continuación por la capa más externa, la envoltura. Esta posee unos 120-200 nm de diámetro y consta de una bicapa lipídica que contiene unas doce glicoproteínas diferentes.

Los antivirales utilizados en la actualidad para infecciones herpéticas son en su mayoría análogos de nucleótidos, que interfieren exclusivamente en la replicación del genoma viral (Aciclovir, Ganciclovir y otros análogos) de uso tópico y algunos también para uso sistémico. Sus principales inconvenientes provienen de la generación de resistencias y efectos colaterales como nefrotoxicidad y cefaleas.

El HSV es la causa de una infección muy común en la población mundial, que se transmite por contacto directo con la lesión o el fluido corporal de una persona infectada. Mientras que HSV-1 afecta típicamente labios, mucosas y áreas faciales y su lugar de latencia es el ganglio trigémino, HSV-2 tiene como blanco principal la mucosa genital y el nervio invadido para la latencia es el ciático. Aun así, se detectan infecciones cruzadas en ambos sentidos (Ellerman-Eriksen, 2005). El genoma viral puede permanecer en las neuronas en estado latente, pudiendo reactivarse y producir virus lítico. Dicha reactivación puede ocurrir por estrés, radiación UV, depresión del sistema inmune, entre otros factores.

Todos los herpesvirus fueron ampliamente estudiados en cuanto a su susceptibilidad frente a polisacáridos sulfatados. En el caso de HSV, se demostró que es la glicoproteína C (gC) de la envoltura la que interacciona con HS en la adhesión inicial virus-membrana celular (Herold et al., 1994), mientras que otras glicoproteínas de envoltura interaccionan a continuación con receptores proteicos específicos para su entrada.

Dentro de las algas rojas, se reportaron activas contra ambos serotipos de HSV fracciones con una variedad de estructuras: agaranos sulfatados (por ejemplo de *Aghardiella tenera*, Witvrouw et al., 1994), galactanos DL-híbridos (por ejemplo de *Pterocliadiella capillacea*, Pujol et al., 1996), λ -carragenanos, mezcla de κ / ι -carragenanos y de μ / ν -carragenanos (por ejemplo los de *Gigartina skottsbergii*, Carlucci et al., 1997; Carlucci et al., 1999) y también mananos sulfatados, detallado en 6.1.1.

Pese a la amplia variedad estructural de fracciones activas, muchas veces se ha sugerido que los polisacáridos con mayor capacidad inhibitoria sobre HSV son aquellos que mejor mimetizan el dominio de unión de HS a la glicoproteína gC que, al igual que lo descrito para el experimento con heparinas, exhibirían el mismo patrón de sulfatación que HS, en C-2 y C-6, por ejemplo λ -carragenano ó θ -carragenano (Pujol et al., 2007). De las varias fracciones de carragenanos de *G. skottsbergii*, aquella de λ -carragenano fue la única con actividad en post-adsorción y la fracción más protectora in vivo en infecciones intravaginales en ratones (Carlucci et al., 1999, Carlucci et al., 2004).

6.1.1. Mananos y xilomananos sulfatados como antivirales

De las estructuras de algas Nemiales, sólo varias fracciones de *Nothogenia fastigiata* y una de *Scinaia hatei* se estudiaron al respecto.

Trabajando con HSV, se encontró que un manano, “F6”, de *N. fastigiata* era la fracción marcadamente mas activa de las extraídas del alga. En la Tabla 1 se resume lo publicado para las tres fracciones de mananos y las tres de xilomananos aisladas (Kolender et al., 1997), cuyas estructuras químicas se graficaron en la pág. 21.

Tabla 1. Principales características y CI_{50} contra HSV-1 y HSV-2 de fracciones de *N. fastigiata*

Mananos y Xilomananos de <i>N. fastigiata</i>	HSV-1 (F)	HSV-2 (G)
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
F5 (97,5% Man, 2,5% Xil) PM ¹ : 6.400 Da, 16,0 % sulfato	>100	96,3
F6 (98% Man, 2% Xil) PM: 30.000 Da, 32,0 % sulfato	0,7	0,7
F2 (21% Xil, 62% Man, 16% Gal) PM: 12.000 Da; 17,6% sulfato	7,1	7,1
F3 (20% Xil, 74% Man) PM: 39.000 Da; 26,1% sulfato	14,4	6,1
F4 (16% Xil, 82% Man) PM: 22.000 Da; 26,0 % sulfato	28,2	27,6

¹PM: peso molecular

El manano F6, con grupos sulfato en C-2 y C-6, se agregó a las estructuras que mejor mimetizan al HS. Los xilomananos, ramificados en C-2, presentaron CI_{50} intermedias y el manano F5, de bajo peso molecular y menor grado de sulfatación, resultó inactivo. Cabe destacar que en este último era casi nula la sustitución con sulfato en C-2.

Damonte y colaboradores (1994) informaron la actividad contra un mayor espectro de virus envueltos por parte de F6. En cultivo, esta fracción mostró valores particularmente bajos de CI_{50} durante la adsorción con: HCMV, Influenza A, Influenza B, RSV, Junin, Tacaribe, HIV-1, HIV-2 y SIV.

También fue analizada una fracción de xilomananos sulfatados de *Scinaia hatei* en su actividad contra HSV. En este caso, (23% Xil, 77% Man, PM: 160.000, 8% sulfato) la estructura ramificada se mostró de alta actividad contra ambos serotipos, en varias cepas (Mandal et al., 2008), con valores de 0,6-1,5 $\mu\text{g/mL}$. Cabe recordar que esta fracción está sulfatada en C-4, y la xilosa enlazada por cualquiera de los tres carbonos C-2, C-4 ó C-6.

6.2. Virus Dengue

El género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*) comprende aproximadamente 70 virus vectorizados por insectos y causantes de diversas enfermedades en humanos; entre ellos, el virus del dengue (DENV), de la fiebre amarilla y de West Nile.

Los flavivirus también son dependientes de HS celular para el inicio de la infección, habiéndose demostrado la unión del virión a HS para virus dengue (Chen et al., 1997) y luego para otros del grupo. Se corroboró la eficiencia de la heparina sobre la replicación de flavivirus, y a partir del año 2000 de polisacáridos sulfatados de algas, principalmente galactanos (Pujol et al., 2002; Tischer et al., 2006).

DENV es un virus envuelto con genoma ARN de cadena positiva y tres proteínas estructurales. Se encuentran descriptos cuatro serotipos genéticamente relacionados (DENV-1 a DENV-4) que cocirculan en las regiones tropicales y subtropicales del mundo entre sus vectores, los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*. La infección en humanos por DENV puede resultar asintomática, una benigna fiebre del dengue o bien enfermedades más severas como la “fiebre hemorrágica del dengue” o el “síndrome del shock por dengue”; estas dos últimas se manifiestan luego de una infección secundaria con un serotipo diferente al de la infección original. No existen en

la actualidad antivirales ni vacunas específicos para tratar o prevenir este virus, probablemente el desarrollo de los mismos requiera un mejor conocimiento del ciclo viral y los posibles blancos de acción (Acosta et al., 2008).

De los cuatro serotipos caracterizados de virus dengue (DENV-1 a DENV-4), dos de ellos son los más susceptibles a inhibición por polisacáridos sulfatados, DENV-2 y DENV-3 en células de mamíferos - y no de mosquitos - también durante la adsorción viral. Distintas estructuras de galactanos inhibieron las infecciones con DENV-2 (Pujol et al., 2002; Talarico et al., 2005) pero no se habían probado de (xilo)mananos hasta la presente Tesis.

6.3. Actividad anticoagulante

La heparina, extraída para uso comercial de pulmón bovino o mucosa intestinal de cerdo, es la droga anticoagulante utilizada en la actualidad, y desde hace varias décadas. Algunas estructuras de polisacáridos de algas también interfieren en la cascada de coagulación, uniéndose a proteínas de la misma, prolongando ya sea el tiempo de tromboplastina parcial activada, el tiempo de trombina y en mucho menor medida el tiempo de protrombina. En galactanos sulfatados se vio una correlación positiva entre peso molecular y grado de sulfatación con poder anticoagulante (Shanmugam y Mody, 2000). Dada esta propiedad que pueden presentar algunas fracciones, es de rutina probarla al ensayarse actividades biológicas/farmacológicas: un compuesto interesante desde el punto de vista antiviral presenta limitaciones si interfiere además en la coagulación.

6.4. Desarrollos para uso clínico

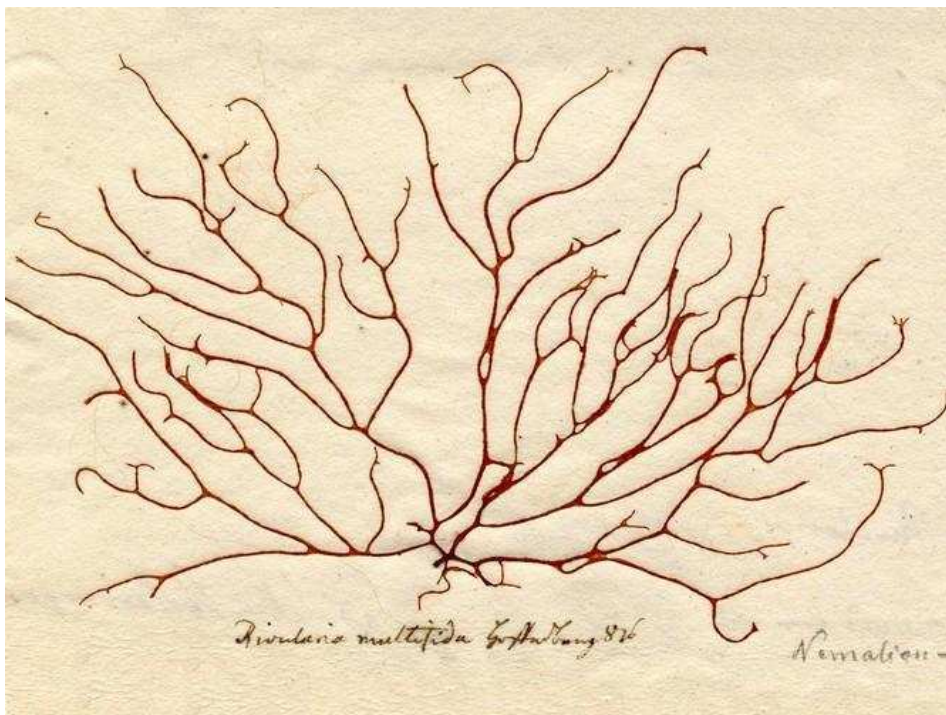
Pese a que las propiedades antivirales de polisacáridos sulfatados son conocidas desde hace mas de cincuenta años, es poco lo que se pudo aplicar de todas las investigaciones. Esto se debe en parte a que la eficacia in vivo de estas estructuras es limitada por algunos factores, tales como:

- un bajo tiempo de vida media en sangre, dificultando la absorción y la llegada a órganos blanco.
- efectos tóxicos por vía oral e intravenosa.
- en muchos casos su acción anticoagulante, como se detalló más arriba.

De esta forma, el uso postulado más viable es de aplicación tópica en piel o mucosas, evitando así los inconvenientes mencionados.

El caudal de lo investigado con carragenanos en sistemas celulares, así como en experimentos en ratones, en cuanto a protección de HSV, HIV y otros virus de transmisión sexual, llevó a la formulación de un gel para uso humano de aplicación vaginal denominado Carraguard®. Si bien las primeras pruebas clínicas fueron alentadoras, confirmando su seguridad y falta de efectos colaterales/irritabilidad colocado hasta 3,5 veces/semana (The Carraguard Phase II, 2010), no pudo demostrarse su eficacia en el contagio de HIV: la tasa de contagio del grupo tratado fue igual a la del grupo con gel placebo, en una prueba con unas 3000 mujeres de Sudáfrica (Skoler-Karpoff et al., 2008).

Teniendo en cuenta el marco presentado, en el presente trabajo se avanza sobre la acción inhibitoria de estructuras naturales poco estudiadas, mananos y xilomananos sulfatados, en infecciones con HSV y DENV; también de los mananos sobresulfatados, que se prueban por primera vez en infecciones in vivo con HSV por aplicación tópica en mucosa intranasal.



**Capítulo 7: INTRODUCCION A INMUNOMODULACION POR
POLISACARIDOS DE ALGAS**

Otra posible aplicación terapéutica de polisacáridos de algas está basada en la modulación del sistema inmune. La inmunomodulación es un campo promisorio en la medicina actual, que inclusive es tenida en cuenta como alternativa a la administración de antibióticos. Por lo mismo, la búsqueda de compuestos bioactivos naturales que puedan potenciar o regular el sistema inmune es actualmente un área importante en la investigación inmunofarmacológica y oncoterapéutica (Na et al., 2010).

7.1. Polisacáridos botánicos como inmunomoduladores

En una categoría de inmunomoduladores naturales, se encuentran los “polisacáridos botánicos”, denominación bajo la cual se suele agrupar en la literatura a polisacáridos de plantas superiores, hongos, algas y líquenes. El principal efecto terapéutico adjudicado a polisacáridos botánicos es la modulación del sistema inmune innato; en particular, la modulación de macrófagos, ya sea activándolos en sus distintas funciones o bien estimulando su proliferación (Schepetkin y Quinn, 2006).

Los polisacáridos de fuentes fúngicas y de plantas superiores fueron los más estudiados al respecto, dado los eficaces usos de estos recursos en la medicina china y medicina hindú (Ayurveda). En dichas medicinas milenarias se utilizan extractos de polisacáridos fúngicos y de plantas como inmunoestimulantes en personas sanas y también complementando la quimioterapia en tratamientos oncológicos o de otras enfermedades. Aun cuando la vigencia de estas medicinas es ancestral, sólo en la última década creció exponencialmente el trabajo científico sobre las elucidación de los principios activos de dichos extractos, adjudicando un papel central a los polisacáridos (Wasser, 2002; Thakur et al., 2012). Asimismo, el reforzamiento del sistema inmune como complemento en las oncoterapias está cada vez más aceptado en Occidente, y es llevado a cabo actualmente sobretodo con plantas superiores, para atenuar los efectos colaterales de la quimioterapia (Dr. Golberg, Asoc. Arg. de Fitomedicina, com. pers., 2011).

Cabe destacar que los polisacáridos de plantas son generalmente poco tóxicos y no causan efectos secundarios, contrariamente a lo que puede ocurrir con polisacáridos sintéticos o aquéllos obtenidos de bacterias.

7.2. Mecanismos de acción inmunomoduladora de polisacáridos

Cuando un patógeno logra atravesar la primera barrera de protección, la piel, macrófagos y neutrófilos conforman la siguiente línea de defensa, siendo efectores de la inmunidad innata. Mientras que los neutrófilos son los primeros fagocitos en migrar al sitio de inflamación, los macrófagos presentes en los tejidos, además de fagocitar, cumplen un rol importante en la regulación de la inmunidad tanto innata como adaptativa, por medio de la producción de citoquinas: IL-1 β , IL-6, TNF- α , interferón- γ , controlando no sólo las reacciones inflamatorias sino también la homeostasis del organismo. Además, tienen la función de presentar antígenos en el contexto de las moléculas de histocompatibilidad clase II a linfocitos T helper iniciando así la respuesta inmune adaptativa.

El reconocimiento de partículas extrañas por parte de macrófagos opera a través de receptores agrupados dentro de los llamados Receptores de Reconocimiento de Patrones, “PRR”, del inglés Patterns Recognition Receptors. En efecto, estos receptores tienen afinidad por patrones moleculares extraños conservados en la evolución y muchos se describieron como receptores de polisacáridos, particularmente de microorganismos. Se expresan no sólo en macrófagos, sino también en otros tipos celulares del sistema inmune (monocitos, linfocitos, neutrófilos, células dendríticas, endotelio), y se clasifican en cinco familias principales:

➤ “TLR”: Receptores tipo toll (del inglés Toll Like Receptors). Son receptores de señalización. Hay caracterizados quince, denominados TLR-1 a TLR-15, de afinidad por diferentes motivos moleculares, a través de su asociación con coreceptores como el CD14 y/o proteínas adaptadoras. Inducen la activación de gran variedad de vías de transducción de señales que activan numerosos genes de la respuesta inmune. Muchos polisacáridos de plantas superiores, así como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) y mananos de levaduras se evidenciaron como ligandos de TLR-4.

Cap. 7: Inmunomodulación por polisacáridos

- Receptores del complemento CR1, CR3 y CR4: Reconocen la activación del complemento en la superficie del patógeno, en especial el fragmento C3b, que es una potente opsonina. CR3 también reconoce β -glucanos.
- “CLR”: Receptores de lectina tipo C (del inglés C Lectin Receptors). Reconocen exclusivamente motivos de carbohidratos de microorganismos. Dentro del grupo se distinguen receptores con diferentes afinidades:
 - Receptor de manosa (MR): sus ligandos son residuos de D-manosa, N-acetilglucosamina y L-fucosa, a través de ocho dominios de reconocimiento de carbohidratos “CDR” en la porción extracelular de este receptor; que también puede estar soluble en citoplasma. (McGreal et al., 2004)
 - DC-SIGN: entre sus ligandos se encuentran D-manosa y L-fucosa. Manosas principalmente ramificadas, con un mínimo de dos o tres residuos terminales.
 - Dectin-1 y Dectin-2: β -glucanos, mananos, manoproteínas y quitina son reconocidos por estos receptores.
 - SR: Receptores carroñeros (en inglés Scavenger Receptors): también reconocen LPS, y fucoidanos de algas pardas.
 - Receptores citosólicos de tipo NOD (en inglés NOD like receptors), reconocen estructuras exógenas en citosol, y actúan como activadores de la transcripción de genes del sistema inmune innato.

A su vez, los receptores de fagocitos son de dos tipos: endocíticos, que median la fagocitosis (por ejemplo MR, scavenger, CR) y de señalización, que participan en la inducción de la respuesta inmune (por ejemplo los TLR).

Como contraparte de los PRR, se clasifican a sus ligandos dentro del gran grupo de los Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) en inglés, Pathogens Associated Molecular Patterns. Entre ellos, el ya nombrado LPS, así como ADN bacteriano, lipoproteínas, y carbohidratos de origen microbiano. Según el arreglo de

azúcares se clasifican tres grupos principales de polisacáridos PAMPs capaces de inducir respuesta inmune (Liu et al., 2006):

- **(1→3)-β-D-glucanos** derivados de pared celular **hongos**, y también de sus reservas citoplasmáticas.
- **(1→4)-α/β-D-mananos** derivados principalmente de pared celular de **levaduras**; se incluyen también en este grupo a los mananos de Aloe vera.
- **heteropolisacáridos** altamente ramificados, derivados en su mayoría de **plantas superiores**.

En efecto, se demostró en muchos casos que polisacáridos botánicos, sin ser de patógenos, actúan como ligandos de PRR. Cabe destacar que los motivos terminales abundantes en glicoproteínas de mamíferos, como ácido siálico o galactosa, son por ende mucho menos reconocidos por los receptores de patrones extraños.

Dado el especial rol adjudicado a macrófagos en la defensa innata y en el reconocimiento de polisacáridos botánicos, se detallan en la Fig. 2 sus receptores PRR capaces de reconocer motivos de carbohidratos:

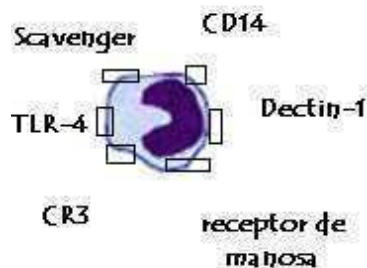


Figura 2. Esquema de un macrófago y sus principales receptores PRR que reconocen motivos de carbohidratos. CD: Cluster de diferenciación; CR: receptor de complemento; TLR: Toll Like Receptor.

Las cascadas de señalización de los receptores activados por sus ligandos confluyen en su mayoría en los factores de transcripción NF-κB, Jun, Fos o STAT (Schepetkin y Quinn, 2006), activando genes de citoquinas u otros componentes del sistema inmune innato. La activación de TLR-4, en particular, produce la activación de NF-κB y a

través del mismo la transcripción de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, el reconocimiento de ligandos también puede actuar como mitógeno, o bien como disparador de especies reactivas de oxígeno (Fig. 3).

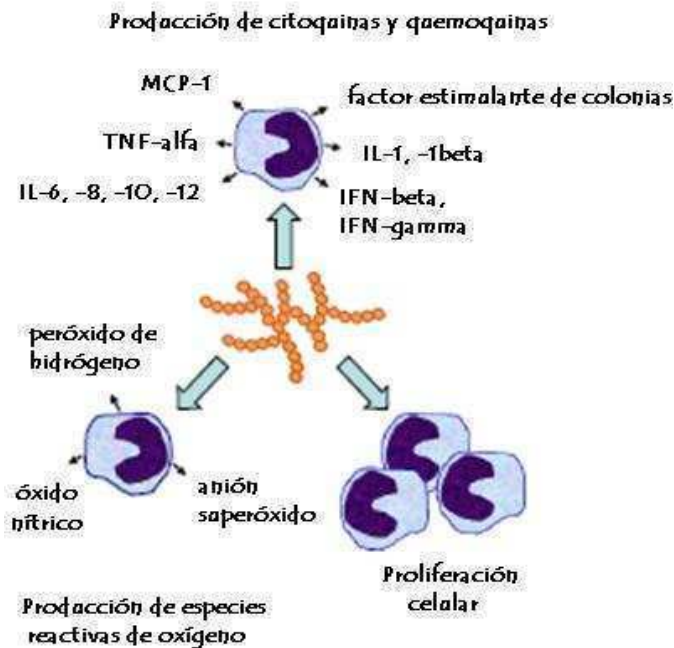


Figura 3. Variedad de respuestas de macrófagos activadas por polisacáridos de plantas (adaptado de Schepetkin y Quinn, 2006). IL: interleuquina; TNF: Factor de necrosis tumoral; MCP: Proteína quemoattractante de monocitos.

La citoquina proinflamatoria TNF- α es producida principalmente por macrófagos y, junto con IL-1, es la responsable de la respuesta inflamatoria sistémica. IL-6 también se considera un importante mediador de la respuesta aguda, como diferenciador y factor de crecimiento de células B, T y endoteliales. A su vez, está asociada con el control de la inflamación, por lo que se le reconoce un doble rol a IL-6, tanto proinflamatoria como antiinflamatoria.

IL-8 media la activación de neutrófilos y la quimiotaxis; IL-10 inhibe la diferenciación a Th1 y la diferenciación T, mientras que IL-12 es una citoquina crítica para la diferenciación a Th1.

Los interferones son inhibidores de la replicación viral y aumentan la capacidad presentadora de antígenos de los macrófagos. Las especies reactivas de oxígeno son

generadas tras la unión de los patógenos a receptores endocíticos de macrófagos y neutrófilos generando agentes oxidantes muy reactivos capaces de destruir microorganismos. Los macrófagos cuentan con un segundo sistema de generación de radicales libres, la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS). Esta enzima se induce durante la fagocitosis y cataliza la generación de óxido nítrico (NO) que es también un potente agente microbicida (Regueiro González et al., 2003).

7.3. Polisacáridos inmunomoduladores de plantas y hongos

Dada la existencia de abundante literatura al respecto, se enumeran a continuación sólo algunos ejemplos representativos de estructuras inmunoactivadoras y sus efectos publicados.

El manano de Aloe vera var. chinensis fue definido como modificador de respuestas biológicas por Leung et al. (2004). Este polisacárido, aislado del gel de aloe, es conocido como “acemannan” y consiste en un (1→4)-β-D-manano acetilado en C-6, de muy alto peso molecular (hasta 10.000 kDa), que mostró estimular in vitro macrófagos peritoneales, y células T y B de bazo murino, induciendo su proliferación y secreción de citoquinas. Además, in vivo aumentó significativamente el nivel de TNF-α sérico por inyección intravenosa, y de la misma forma protegió un 50 % el crecimiento de un tumor inducido en ratones. Continuando con la misma fracción, Liu et al. (2006) estudiaron más detalladamente la activación de macrófagos, sugiriendo que en la misma participaba el receptor de manosa y que dicha activación, que incluía aumento de la capacidad fagocítica y de la secreción de citoquinas, era la causante de la acción antitumoral del manano.

Shuai y colaboradores (2010) demostraron que (1→4)-α-D-glucanos ramificados de 22,4 kDa extraídos de raíces del árbol Sophora subprostrate inducen proliferación tanto de células T como B de bazo murino.

En el mismo sentido, las raíces de Actinidia eriantha (familia Actiniadiaceae), utilizadas en medicina china, dan extractos acuosos ricos en heteropolisacáridos con alto contenido de arabinosa, y de muy alto peso molecular (>1000 kDa). Xu y colaboradores (2009) demostraron su actividad proliferativa en células NK y linfocitos T, además de acción antitumoral en un modelo murino administrando las fracciones por vía oral; concluyeron que la acción antitumoral operaba por aumento de la respuesta inmune.

Polisacáridos extraídos del tronco de *Tinospora cordifolia*, usado tradicionalmente en medicina ayurvédica como estimulante, protegieron contra el desarrollo de un tumor experimental por inducir la proliferación de células B, administrado por vía intraperitoneal (Leyon et al., 2004).

En cuanto a polisacáridos de hongos, los de *Ganoderma lucidum*, una especie muy utilizada en medicina china, demostraron acción antitumoral vía refuerzo de la inmunidad (Shao et al., 2004). Se trata de β -heteropolisacáridos de alto peso molecular - 580 kDa - que en cultivos primarios de ratones BALB/c activaron linfocitos B y macrófagos vía TLR-4, pero no células T.

Li y colaboradores (2010) informaron que los β -D-glucanos de *Polyporus umbellatus*, otro hongo usado en medicina china, estimulan la producción de NO y citoquinas TNF- α e IL-1 β en macrófagos peritoneales murinos mediante TLR-4, de animales tanto sanos como portadores de tumores. También demostraron que la unión ligando-receptor activa al factor de transcripción NF- κ B, finalizando en la transcripción de citoquinas.

Por último, en esta enumeración en absoluto exhaustiva, el lentinano, producto del hongo *Lentinus edodes* - conocido como “shiitake” - es un (1 \rightarrow 3)- β -D-glucano ramificado con glucosa en C-6, de conocidas propiedades anticancerígenas vía estimulación del sistema inmune y está considerado un medicamento en países orientales (Zhang et al., 2011)

Los β -glucanos fúngicos en general fueron propuestos como promotores de la salud en cuanto a la prevención del cáncer (Mantovani et al., 2008). Cuando se analizó su farmacocinética luego de la administración intravenosa en ratas (Rice et al., 2004), se encontró que su vida media en plasma es de unas pocas horas (entre 2 y 6) y el clearance era dependiente del peso molecular, grado de ramificación y conformación en solución de los distintos glucanos fúngicos.

7.4. Inmunomodulación por polisacáridos de algas

En un trabajo de revisión de 2006, Schepetkin y Quinn registraron solamente nueve especies de algas de las cuales se había estudiado el efecto de sus polisacáridos sobre macrófagos, en líneas humanas o murinas. Los efectos principales comunes eran aumento de la secreción de IL-1 β , TNF- α , IL-6 y NO. Las especies abarcaban tres algas pardas con diferentes estructuras de fucooidanos: *Cladosiphon okamuranus*, *Sargassum thunbergii* e *Hizikia fusiformis*; dos algas rojas con estructuras de agaranos: *Gracilaria verrucosa* y *Porphyra yesoensis*; la euglenofita *Euglena gracilis*, con un glucano de tipo paramilon, completando la enumeración los preparados a partir de microalgas: las verde-azules *Spirulina* y *Nostoc* y la verde *Chlorella*. Las propiedades de estas tres últimas como restablecedoras generales del organismo son más conocidas popularmente, adquiriéndose el alga disecada como suplemento dietario. En investigación, la eficacia como inmunomoduladores de sus extractos polisacáridicos les valió la denominación “Inmulina”, “Inmunon” e “Inmurella” respectivamente (Pugh et al., 2001); contienen heteropolisacáridos de muy alto peso molecular.

En el período 2007-2011, polisacáridos de otras especies fueron incorporados a la literatura con sus efectos sobre el sistema inmune.

Jiao y colaboradores (2009) estudiaron un polisacárido sulfatado de 46,8 kDa del alga parda *Enteromorpha intestinalis* compuesto mayormente por L-ramnosa. Dicha fracción mostró ejercer un efecto proliferativo en macrófagos y en linfocitos T, además de aumentar el peso de bazo y timo y la producción de TNF- α en animales tratados por vía oral. Además, indujo un aumento de la fagocitosis y la secreción de NO y TNF- α en macrófagos peritoneales.

Las algas rojas *Hypnea spinella* (Gigartinales) y *Halopithys incurva* (Ceramiales) fueron estudiadas por Abdala-Díaz et al. (2011). Tanto el κ -carragenano de la primera como el pululano de la segunda, de los cuales no se informó el peso molecular, indujeron un aumento de IL-6 y NO en macrófagos de la línea RAW 264.7, pero no de TNF- α .

El mismo grupo estudió los heteropolisacáridos de alto peso molecular de la microalga roja *Porphyridium cruentum* (Abdala-Díaz, 2010) también sobre la línea RAW 264.7 y detectaron una secreción diferencial de TNF- α e IL-6 cuando los macrófagos eran expuestos a concentraciones de polisacárido de al menos 6 $\mu\text{g/mL}$; recién con 25 $\mu\text{g/mL}$ detectaron un efecto sobre la concentración de NO.

Del alga verde comestible *Capsosiphon fulvescens*, Na y colaboradores (2010) caracterizaron un glucuronogalactomanano sulfatado de 385 kDa, con 55% de manosa, y su acción sobre macrófagos RAW 264.7. Concluyeron que el compuesto inducía la producción de TNF- α e IL-6 luego de 24 h de incubación, a partir de 1 $\mu\text{g/mL}$. También activó la producción de NO en una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$. De otra alga verde, *Ulva rigida*, Leiro y colaboradores (2007) concluyeron que el glucuronoramnano sulfatado sintetizado por esta especie provocaba un incremento de la expresión de dos genes involucrados en la inducción de NO (COX-2 y NOS-2).

Las algas pardas *Ascophyllum nodosum* y *Fucus vesiculosus* biosintetizan dos tipos de fucoidanos que fueron comparados en su acción sobre macrófagos RAW 264.7 en cuanto a inducción de NO y de citoquinas, siendo mucho mayor la activación por el “ascophylano”. Ambos ejercen su acción por NF- κB , y por MAP kinasas para producción de NO (Jiang et al., 2011).

Si bien los carragenanos fueron descriptos como potentes agentes inflamatorios en ratones y activadores de macrófagos (Nacife et al., 2004) también algunos carragenanos y fucoidanos pueden inhibir la funcionalidad de estas células fagocíticas (Yang et al., 2006)

Por último, polisacáridos de tres algas verdes fueron recientemente estudiados: a partir de *Codium fragile* (Lee et al., 2010), *Enteromorpha prolifera* (Kim et al., 2011) y *Monostroma nitidum* (Karnjanapratum y You, 2011), se obtuvieron xiloglucoramnanos sulfatados fuertemente estimuladores de macrófagos *in vitro*.

Los mecanismos moleculares así como el estudio de los receptores involucrados fueron descriptos hasta el momento para carbohidratos de plantas superiores y de hongos. Se postuló que para polisacáridos de algas el mecanismo activador de macrófagos sería similar, dada la similitud de los efectos producidos en cuanto a activación y proliferación (Schepetkin y Quinn, 2006).

El interés creciente en la búsqueda de compuestos bioactivos sobre el sistema inmune, y la poca exploración de polisacáridos de algas rojas, motivó que se estudiaran en esta Tesis las fracciones caracterizadas de *Nemalion helminthoides*.

**Capítulo 8: ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE FRACCIONES DE
NEMALION HELMINTHOIDES**

Abreviaturas utilizadas:

ATCC: American Type Culture Collection

CC: control celular

CI₅₀: concentración inhibitoria 50%

CC₅₀: concentración citotóxica 50%

DENV: virus dengue

DMEM: Dulbecco's modified Eagle Medium

HSV: virus herpes simplex

LPS: Lipopolisacárido

m.i.: multiplicidad de infección

MEM: Medio esencial mínimo Eagle

MM: medio de mantenimiento

MTS:(3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)

PBS: solución salina de fosfatos

PRR: Receptores de reconocimiento de patrones

p.i.: post infección

RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute

ST: Suero de ternera

SFB: Suero fetal bovino.

TTPA: Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada

UFP: Unidades formadoras de placas virales.

ACTIVIDAD ANTIVIRAL

A pesar de la amplia bibliografía existente acerca de la actividad de polisacáridos sulfatados de algas sobre la replicación de virus envueltos, son escasos los reportes en relación a mananos o xilomananos. Con el fin de caracterizar biológicamente los de *Nemalion helminthoides*, se determinó en esta sección la actividad inhibitoria contra virus Herpes Simplex (HSV) y Dengue (DENV) de las fracciones nativas así como de sus derivados químicamente modificados.

8.1. Estudio de la actividad antiviral y virucida contra HSV

8.1.1. Efecto de las fracciones nativas N1-N6 sobre las primeras etapas de la infección

Se comenzó por evaluar la capacidad inhibitoria de las fracciones nativas en etapas tempranas del ciclo de replicación viral de HSV-1, incubando el sistema células + virus + compuestos sólo durante la primera hora, a 37 °C. En dichas condiciones, las fracciones están presentes durante la adsorción y la penetración viral.

De las seis fracciones, N3 y N4 fueron las únicas que lograron reducir el número de placas virales. Como se puede ver en la Fig. 1, estos xilomananos mostraron una moderada acción inhibitoria dependiente de la concentración.

En efecto, los valores de CI_{50} (concentración inhibitoria 50%) fueron de 9,68 $\mu\text{g/mL}$ para N3 y de 5,43 $\mu\text{g/mL}$ para N4, mientras que para la heparina fue de 1,34 $\mu\text{g/mL}$, usada como control positivo. Si bien N4 presentó una CI_{50} menor que N3, ambos xilomananos alcanzaron porcentajes de inhibición viral similares entre 10 y 20 $\mu\text{g/mL}$.

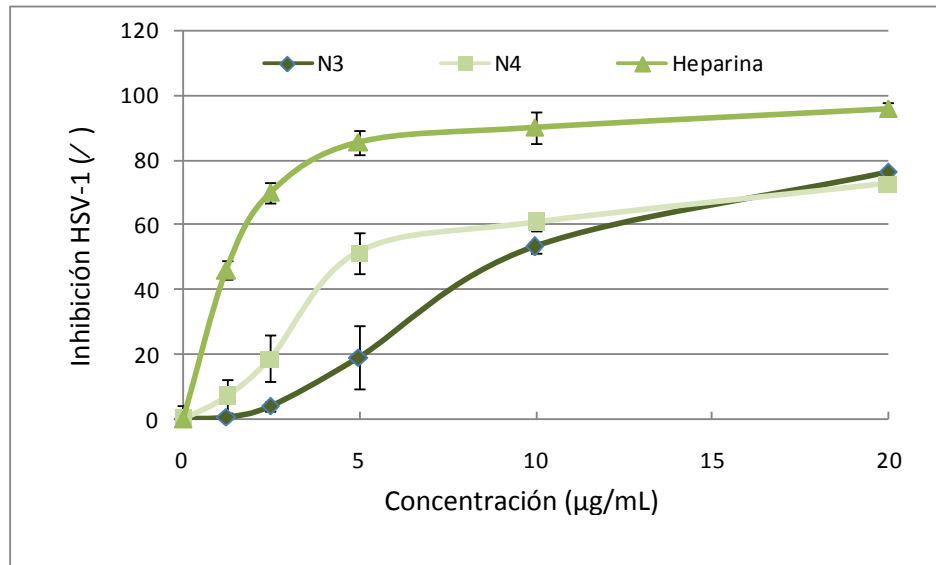


Figura 1. Actividad inhibitoria de los xilomananos N3 y N4 agregados durante la adsorción. Se infectaron cultivos de células Vero con HSV-1 cepa F, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de los compuestos. Luego de 1 h a 37°C se removió el inóculo. Las células se cubrieron con MM con metilcelulosa. Al cabo de 48 h de incubación a 37°C se determinó la CI_{50} por el método de reducción del número de placas virales. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Las fracciones N1 y N2, de menor peso molecular y grado de sulfatación, y un apreciable contenido de galactosa, no mostraron inhibición contra HSV-1 hasta 40 µg/mL inclusive, por lo que se las consideró inactivas.

Tampoco ejercieron efecto inhibitorio hasta 40 µg/mL los mananos N5 y N6, a pesar de poseer mayor grado de sulfatación y peso molecular que los xilomananos. Este último resultados fue llamativo por su disparidad con lo previamente informado para F6, el manano sulfatado de *N. fastigiata* de gran similitud estructural con estas fracciones, y que había mostrado una CI_{50} de 0,70 µg/mL (ver Introducción).

Cuando se probó la acción inhibitoria de N1-N6 en la adsorción de HSV-2, también los xilomananos resultaron las fracciones más activas, mostrando valores de CI_{50} considerablemente más bajos que los obtenidos para HSV-1: 3,72 µg/mL para N3 y 2,79 µg/mL para N4. Los mananos N5 y N6 resultaron menos activos, con una CI_{50} cercana a los 20 µg/mL.

La Fig. 2 muestra los porcentajes de inhibición obtenidos para las fracciones N3, N4, N5 y N6. Como se observa, con los mananos (N5 y N6) se detectó un leve efecto

antiviral recién con 10 $\mu\text{g/mL}$, en tanto que para N3 y N4 en dicha concentración se alcanzó una inhibición viral de 77 % y 89 %, respectivamente. La inhibición de HSV-2 por los xilomananos resultó muy similar a la del control con heparina, cuya CI_{50} fue 2,09 $\mu\text{g/mL}$.

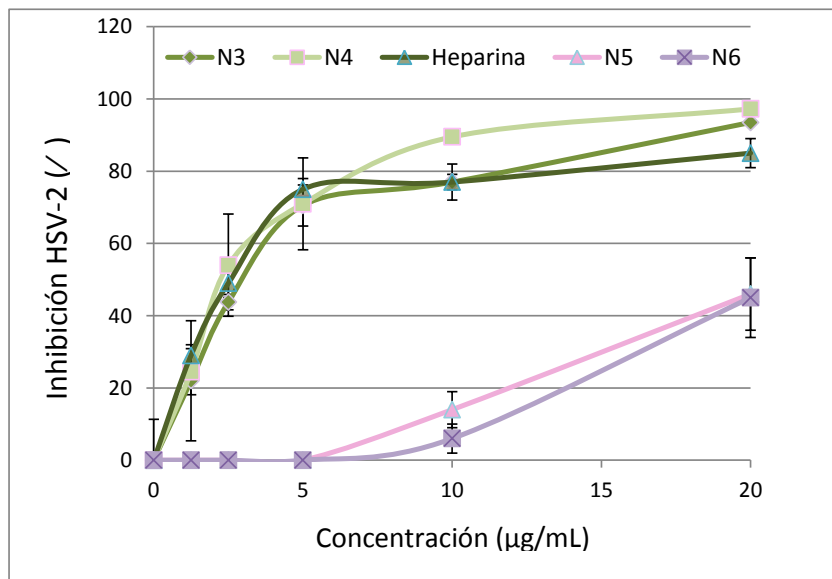


Figura 2. Actividad inhibitoria de los xilomananos N3 y N4 y de los mananos N5 y N6 agregados durante la adsorción. Se infectaron cultivos de células Vero con HSV-2 cepa MS, en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de los compuestos. Luego de 1 h a 37°C se removió el inóculo. Las células se cubrieron con MM con metilcelulosa. Al cabo de 48 h de incubación a 37°C se determinó la CI_{50} por el método de reducción del número de placas virales. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Los resultados indicaron que en etapas tempranas de la infección – adsorción y penetración viral – de ambos serotipos de HSV, los xilomananos sulfatados aislados de *N. helminthoides* tuvieron un apreciable efecto inhibitor, exhibiendo una marcada diferencia con los mananos del mismo origen.

8.1.2. Efecto de fracciones químicamente modificadas en etapas tempranas de la infección

En las mismas condiciones que en 8.1.1, se evaluó la actividad inhibitoria de los productos de sulfatación (N6S-2h y N6S-3h) así como de los productos de degradación de Smith (N3-Smith y N4-Smith) en infecciones con ambos serotipos de HSV.

En cuanto a los productos sulfatados, las CI_{50} obtenidas (Tabla 1) mostraron que la modificación química generó fracciones muy activas. Al igual que las fracciones de origen, éstos fueron más potentes contra HSV-2, con valores de CI_{50} de 0,84 y 0,70 $\mu\text{g/mL}$ para N6S-2h y N6S-3h, respectivamente. Para ambos virus la actividad antiviral de los derivados de alta sulfatación en C-2 aumentó aproximadamente 20 veces respecto de N6.

Tabla 1. Actividad antiherpética de las fracciones modificadas por sulfatación, N6S-2h y N6S-3h, a partir de N6. La CI_{50} se determinó por el método de reducción del número de placas virales. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Virus	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	N6	N6S-2h	N6S-3h
HSV-1 (F)	> 40	2,31 \pm 0,55	1,89 \pm 0,05
HSV-2 (MS)	16,8 \pm 1,90	0,84 \pm 0,22	0,70 \pm 0,05

La Fig. 3 muestra el patrón de inhibición de N6S-2h y N6S-3h contra HSV-1. Dichas fracciones redujeron el número de placas virales aproximadamente en un 65% a 5 $\mu\text{g/mL}$, pero no mostraron diferencias con el control a concentraciones menores de 1,25 $\mu\text{g/mL}$.

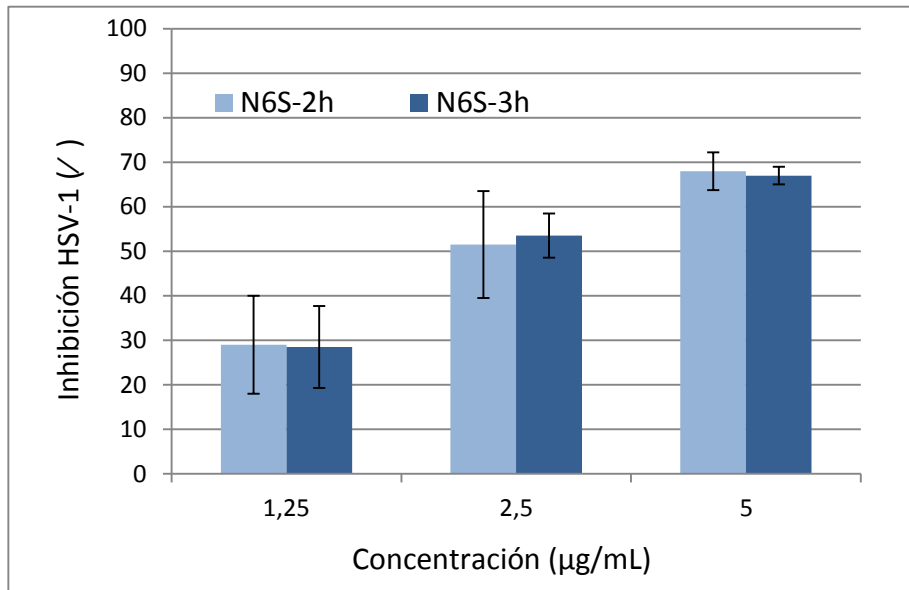


Figura 3. Determinación de la actividad antiviral de los derivados sulfatados de N6, N6S-2h y N6S-3h. Se infectaron células Vero con HSV-1 cepa F en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de las fracciones. Luego de 1 h a 37°C se removió el inóculo. Las células se cubrieron con MM con metilcelulosa. Al cabo de 48 h de incubación, se cuantificó el virus por UFP. Los valores representados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

En el caso de HSV-2, en cambio, el número de placas disminuyó un 60% con una concentración aproximada de 1 µg/mL. La Fig. 4 muestra la pronunciada actividad antiviral contra HSV-2 dependiente de la concentración: con ambos mananos sobresulfatados se obtuvieron valores cercanos a 90 % de inhibición con 4 µg/mL. Con ambos serotipos de HSV, dos horas de reacción de sulfatación habían sido suficientes para aumentar sustancialmente la actividad de N6.

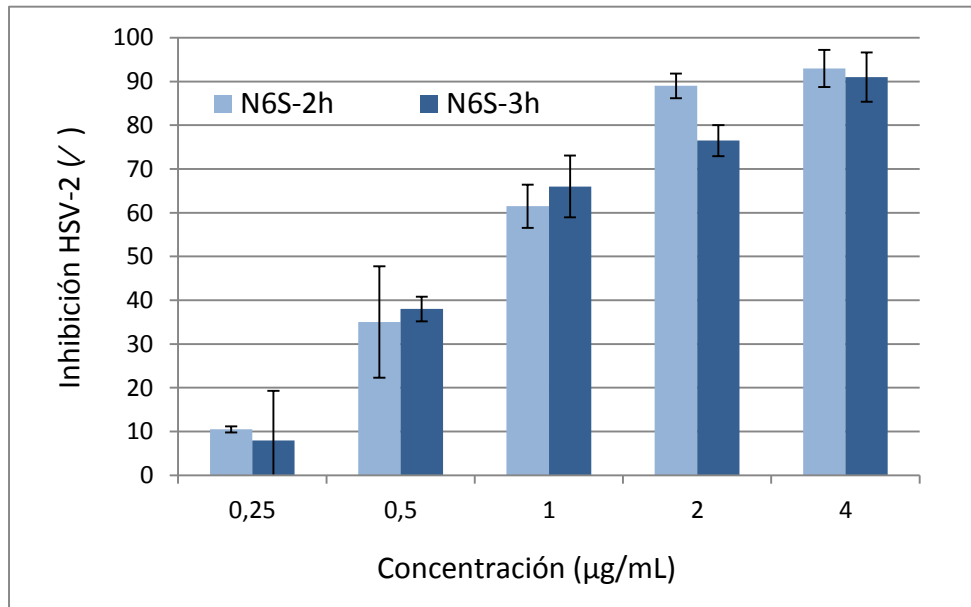


Figura 4. Determinación de la actividad antiviral de los derivados sulfatados de N6: N6S-2h y N6S-3h. Se infectaron células Vero con HSV-2 cepa MS en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de las fracciones. Luego de 1 h a 37°C se removió el inóculo. Las células se cubrieron con MM con metilcelulosa. Al cabo de 48 h de incubación, se cuantificó el virus por UFP. Los valores representados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Cuando se efectuaron los ensayos con N3-Smith y N4-Smith, ninguna de las dos fracciones fueron buenas inhibidoras de la adsorción de HSV, mostrando una significativa disminución de la actividad respecto de los xilomananos nativos (Tabla 2). Consistentemente con lo observado para todas las fracciones en estudio, N3-Smith mostró moderada actividad contra HSV-2.

Tabla 2. Actividad antiherpética de las fracciones modificadas por degradación de Smith, comparadas con sus fracciones de origen N3 y N4. La CI_{50} se determinó por el método de reducción del número de placas virales. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Virus	CI_{50} (µg/mL)			
	N3	N3-Smith	N4	N4-Smith
HSV-1	9,68 \pm 1,72	26,3 \pm 2,10	5,43 \pm 1,45	> 40
HSV-2	3,72 \pm 0,05	8,20 \pm 1,80	2,79 \pm 0,36	> 40

En base al estudio de la estructura química realizado a las mismas, la reducción en la actividad de las fracciones modificadas pudo adjudicarse principalmente a la ausencia de ramificaciones xilosa en C-2. Si bien por la remoción de xilosas el peso molecular de la mismas disminuye, el cambio no fue 15-20%.

La menor actividad antiviral de estas fracciones modificadas fue concordante con lo hallado con mananos y xilomananos nativos, cuyas diferencias de actividad se sustentan principalmente por las ramificaciones xilosa en C-2 de los segundos.

8.1.3. Efecto virucida

Con el objeto de determinar si la inhibición observada es consecuencia de un efecto virucida, se realizó un experimento para evaluar la inactivación del virus por contacto directo con los compuestos, fuera del sistema celular. Se realizó únicamente con HSV-1.

Tabla 3. Determinación del efecto de xilomananos sobre la inactivación de HSV-1. Se incubaron alícuotas de HSV-1 (2×10^6 UFP/mL) con distintas concentraciones de los compuestos por 90 min a 37°C. El virus remanente se tituló por UFP.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Título de HSV-1 (UFP/mL)			
	N3	N4	N6S-2h	N6S-3h
0	$1,10 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	$1,03 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$
50	$1,00 \times 10^3$	$1,13 \times 10^3$	$1,01 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3$
100	$1,20 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	$1,02 \times 10^3$

Las fracciones no produjeron inactivación directa del virión hasta 100 $\mu\text{g/mL}$, no registrándose diferencias en el título del virus incubado con N3, N4, N6S-2h ó N6S-3h respecto del control sin polisacárido (Tabla 3).

Estos resultados demostraron que las fracciones activas no ejercen su acción inhibitoria por un efecto virucida, sino que intervienen durante el ciclo de replicación viral.

8.1.4. Efecto de las fracciones activas post-adsorción

Se estudió el efecto de las fracciones en una etapa posterior de la infección, permitiendo la adsorción de partículas virales durante 1 hora, y adicionando las soluciones de polisacáridos una vez retirado el inóculo de virus. En esta serie de experimentos se trabajó la primera hora a 4°C, de manera de permitir exclusivamente la adsorción, pero no la penetración viral.

Se realizaron ensayos con fracciones activas durante la adsorción, con el fin de continuar la caracterización de su acción antiviral: N6S-2h y las nativas N3 y N4.

Tal como se expone en la Tabla 4, la presencia de N6S-2h por 48 h luego de la infección con HSV también afectó la replicación del virus, siendo nuevamente HSV-2 más susceptible, con porcentajes de inhibición considerables a 4 y 8 µg/mL.

Tabla 4. Inhibición de la replicación de HSV post-adsorción por el manano sobresulfatado N6S-2h, empleando ensayo de reducción del número de placas virales. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE.

Concentración (µg/mL)	Inhibición viral (% control)	
	HSV-1	HSV-2
2	0	22 ± 1
4	15 ± 1	40 ± 3
8	36 ± 2	72 ± 2

Cuando se colocó al manano durante y después de la adsorción, se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores, que evidenciaban un efecto combinado de su acción en ambas etapas. Así, con HSV-1 se obtuvo una CI_{50} de 1 µg/ml y una menor aún con HSV-2, alcanzando el 89% de inhibición de ambos virus con 2 µg/mL (Tabla 5).

Tabla 5. Efecto de N6S-2h presente durante y después de la adsorción viral en infección con HSV empleando un ensayo de reducción del número de placas virales. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición viral (% control)	
	HSV-1	HSV-2
1	50 \pm 4	75 \pm 3
2	89 \pm 1	89 \pm 2
4	95 \pm 1	100 \pm 0

Teniendo en cuenta los resultados de las Tablas 4 y 5, se pudo verificar que la mayor eficiencia antiviral de N6S-2h se encuentra en la etapa de adsorción; aun así, en el caso de HSV-2, se aprecia una inhibición considerable en la post adsorción. La etapa susceptible podría ser la penetración viral que sigue a la adsorción, aunque la presencia del polisacárido en el medio de plaqueo implicaría la inhibición de nuevas adsorciones de las partículas virales generadas en las 48 h de incubación.

En cuanto a los xilomananos, ninguna de las dos fracciones ejerció acción inhibitoria sobre la replicación de HSV-1 colocado después de la adsorción viral en concentraciones hasta 7,5 $\mu\text{g/mL}$. Recién con 15 $\mu\text{g/ml}$ N4 inhibió un 10 % la replicación de HSV-1 y con 30 $\mu\text{g/mL}$, N3 inhibió un 20 % y un 45 % N4 (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentajes de inhibición post-adsorción de HSV-1 y HSV-2 por los xilomananos N3 y N4. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición viral (% control)			
	HSV-1		HSV-2	
	N3	N4	N3	N4
7,5	0	0	0	0
15	0	10 \pm 1	39 \pm 2	42 \pm 1
30	20 \pm 1	45 \pm 2	56 \pm 2	51 \pm 2

Tal como se desprende de la Tabla 6, ambas fracciones se mostraron mucho menos activas que cuando fueron agregadas durante la adsorción. Por otra parte, la inhibición observada fue más acentuada para HSV-2 y muy similar para ambas fracciones.

Por último, se determinaron los porcentajes de inhibición cuando las fracciones estuvieron presentes durante y después de la adsorción viral (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de inhibición de HSV-1 y HSV-2 por los xilomananos N3 y N4 presentes durante y después de la adsorción viral. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibición viral (% control)			
	HSV-1		HSV-2	
	N3	N4	N3	N4
7,5	16 \pm 1	51 \pm 1	73 \pm 2	85 \pm 2
15	50 \pm 2	76 \pm 2	80 \pm 2	92 \pm 1
30	61 \pm 2	91 \pm 4	n.d ¹	n.d

¹ n.d.: no determinado

Los altos porcentajes de inhibición obtenidos fueron acordes con lo hallado separadamente para la adsorción y luego de la misma. Se evidenció nuevamente la mejor inhibición de N4 sobre HSV-1, y también la de ambas fracciones sobre HSV-2.

Considerando que esta serie de experimentos se realizó con adsorciones a 4° C, se confirmó que la acción inhibitoria en etapas tempranas se ejerce fundamentalmente durante la etapa de adsorción del virus a la célula, ya que a dicha temperatura no ocurre la etapa subsiguiente de penetración viral.

Se pudo concluir que, al igual que con la mayoría de las estructuras de polisacáridos sulfatados, la adsorción es la etapa más susceptible a su acción. Además, de las estructuras naturales, aquéllas ramificadas fueron las más activas. Asimismo, las de mayor capacidad inhibitoria fueron los mananos modificados con alto grado de sulfatación en C-2, N6S-2h y N6S-3h.

8.2. Citotoxicidad en células Vero

Con el fin de analizar la citotoxicidad de los compuestos, se evaluó la viabilidad de células Vero en fase de crecimiento estacionario (monocapas confluentes) expuestas a los polisacáridos por un período de 48 h. Para ello, se utilizaron las fracciones que presentaron mayor actividad antiviral en concentraciones mucho más altas que sus respectivas CI_{50} .

En el caso de los xilomananos N3 y N4, no se observaron diferencias de viabilidad con respecto al control celular hasta una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. En cambio, con los mananos N6S-2h y N6S-3h, se observó una disminución de la viabilidad a partir de 500 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 5), más acentuada para N6S-2h, con una concentración citotóxica 50% (CC_{50}) de 480 $\mu\text{g/mL}$. La CC_{50} de N6S-3h, en tanto, quedó determinada como $> 1000 \mu\text{g/mL}$.

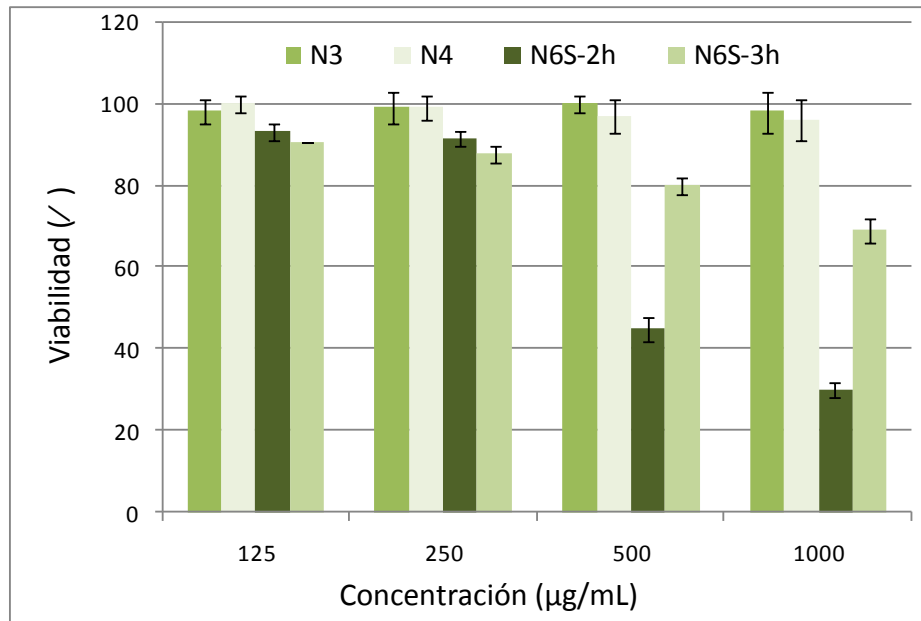


Figura 5. Porcentaje de viabilidad de células Vero luego de 48h de incubación con las fracciones N3, N4, N6S-2h y N6S-3h. Expresado como porcentaje respecto del control sin polisacárido. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

El manano N6, en tanto, resultó ser citotóxico en células Vero a una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$, con aproximadamente un 20 % de viabilidad celular (dato no mostrado). Aun sin haber mostrado actividad antiviral, se evaluó la toxicidad de N6 a fin de compararla con los derivados sulfatados. Dado que los mananos más sulfatados resultaron menos tóxicos, y en el mismo sentido N6S-3h conservó más la viabilidad que el sulfatado intermedio, se concluyó la implicancia de residuos manosa sin sustituyentes en este reconocimiento por parte de la célula.

Para el manano F6 de *N. fastigiata*, se había determinado una CC_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Kolender et al., 1997) indicando un perfil similar para ambas estructuras relacionadas, e independiente del patrón de sulfatación. También se determinó la CC_{50} en células HEL y HELa (para ambas, 100 $\mu\text{g/mL}$) y en linfocitos MT-4 (33 $\mu\text{g/mL}$), proponiendo valores relacionados (Damonte et al., 2004). Sin embargo, y en consistencia con lo aquí hallado, los xilomananos de *N. fastigiata* (F2, F3, F4) presentaron citotoxicidades menores, con una $CC_{50} > 1000$, 300 y >1000 respectivamente (Kolender et al., 1997).

8.3. Actividad antiviral en ratones infectados por vía intranasal con HSV-2

Teniendo en cuenta la buena actividad antiherpética del manano N6S-2h en etapas tempranas de la replicación viral, además de su baja citotoxicidad *in vitro*, se procedió a analizar su actividad en un modelo murino.

Se infectaron ratones BALB/c por vía mucosa intranasal, una vía natural de ingreso del virus, dos grupos de 8 animales cada uno con aproximadamente 1×10^6 UFP de HSV-2. Al grupo tratado se le inoculó, inmediatamente después de la infección, 20 μ L de solución al 1% de N6S-2h en solución fisiológica también por vía intranasal. Al grupo control se le inoculó 20 μ L de solución fisiológica. Los resultados se compendian en la Tabla 8.

Tabla 8. Efecto antiherpético *in vivo* del manano sulfatado N6S-2h inoculado por la misma vía de infección (intranasal). n=8.

	Grupo control	Grupo tratado
Síntomas	100% de los animales con inflamación ocular unilateral; pelos erizados; vesículas en nariz; pérdida de peso; fatiga.	25 % de los animales con inflamación ocular unilateral; pelos erizados
Mortalidad	75 %	Sobrevida

Los resultados obtenidos mostraron una notable protección por la fracción N6S-2h frente a una infección respiratoria aguda por HSV-2. Mientras que el control manifestó un 75% de mortalidad en un tiempo de sobrevida de 13 días, en el grupo tratado no se

registraron muertes y sólo un 25% de los animales enfermaron. Es de destacar que se administró una sola dosis del antiviral.

En experimentos efectuados en las mismas condiciones (Mateu, 2011) con κ -carragenano, no se detectó protección. Con ι -carragenano, en cambio, se observó un 60 % de sobrevida en los animales infectados.

8.4. Efecto inhibitorio en la adsorción de DENV

Con el fin de ampliar el espectro de la actividad antiviral de las fracciones, se utilizó DENV-2, cuya entrada a células animales es dependiente de heparán sulfato.

Los rendimientos virales disminuyeron por efecto de la incubación con las fracciones N3 y N4. El manano N6, en tanto, no mostró acción inhibitoria pero sí lo hicieron sus productos de sulfatación, siguiendo un perfil similar a lo obtenido con HSV.

En la Fig. 6 se muestran los resultados obtenidos con los dos xilomananos, cuya inhibición del rendimiento viral fue dependiente de la concentración; sus CI_{50} se calcularon en 8,22 $\mu\text{g/mL}$ para N3 y 16,1 $\mu\text{g/mL}$ para N4.

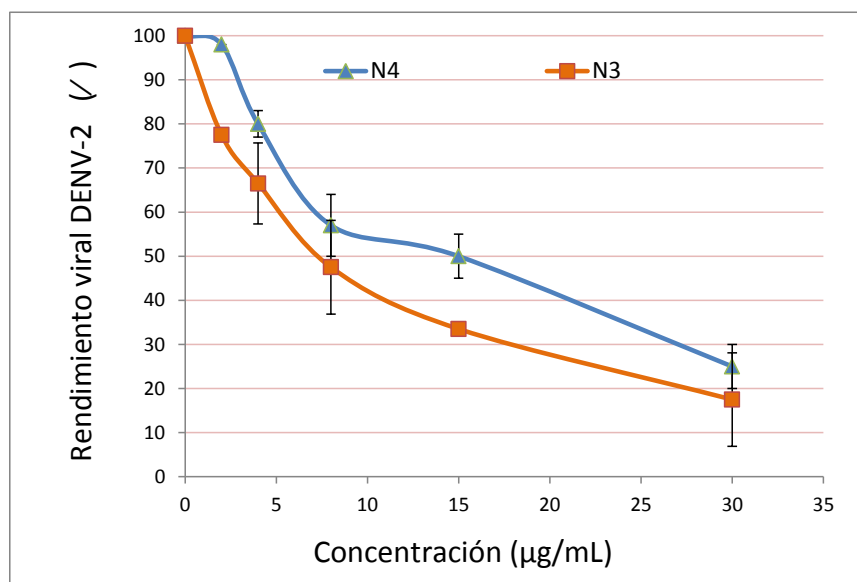


Figura 6. Rendimiento viral de DENV-2 en presencia de los xilomananos sulfatados N3 y N4. Se infectaron células Vero con DENV-2 cepa NCG en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de las fracciones. Luego de 1 h a 37°C se removió el inóculo, se lavaron los pocillos con PBS y se cubrieron con MEM. A las 48 h se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento por UFP. Los valores representados son el promedio de dos experimentos \pm DE

Se obtuvieron porcentajes muy altos de inhibición con N6S-2h y N6S-3h, con CI_{50} menores a 1,25 y 2,50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La Fig. 7 muestra la disminución del rendimiento viral de DENV-2 por incubación con N6S-2h durante la adsorción, que fue del 67% con una concentración de compuesto de 1,25 $\mu\text{g/mL}$, en contraposición con la ausencia de inhibición que mostró N6, inclusive a 30 $\mu\text{g/mL}$.

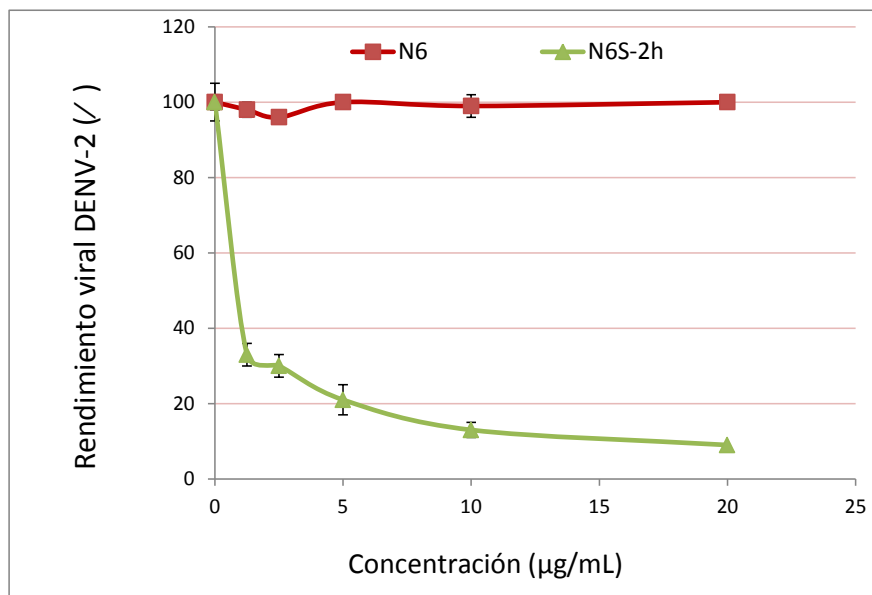


Figura 7. Rendimiento viral de DENV-2 en presencia de los mananos N6 y N6S-2h. Se infectaron células Vero con DENV-2 cepa NCG en ausencia y en presencia de distintas concentraciones de las fracciones. Luego de 1 h a 37°C se removió el inóculo, se lavaron los pocillos con PBS y se cubrieron con MEM. A las 48 h se cosecharon los sobrenadantes y se tituló el rendimiento por UFP. Los valores representados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Los polisacáridos sulfatados ensayados, entonces, lograron disminuir el efecto de la infección viral de DENV-2 in vitro, cuando éstos se agregaron en la adsorción. Al igual que con HSV, N6 no demostró actividad inhibitoria N6; lo último pudo relacionarse con la participación de HS como receptor también para este serotipo de dengue.

8.5. INHIBICION DE VIRUS JUNIN (JUNV)

El virus causante de la fiebre hemorrágica argentina, virus Junín, es un arenavirus que también fue estudiado en cuanto a la inhibición por fracciones de *N. helminthoides*. El estudio se realizó en colaboración con la Lic. M. Belén Forlenza (datos contenidos en su Tesina de licenciatura QB, FCEyN, UBA, 2011).

El análisis fue motivado dado que se había encontrado que uno de los receptores de JUNV era el receptor de patrones extraños DC-SIGN, y que la infección con el virus disminuía notablemente en presencia del manano de *Saccharomyces cerevisiae*, dada la afinidad a residuos manosa por parte de dicho receptor (Martínez., 2010).

Se trabajó con células de la línea 3T3, que no expresan DC SIGN y son por ende muy poco permisibles a la infección por JUNV, y con una línea establemente transfectada con el receptor DC-SIGN, “3T3 DC-SIGN”, que fue muy susceptible a la infección con el virus.

Se halló una notable diferencia entre el xilomanano N4 y el manano N6 en su interferencia en la infección, siendo las únicas dos fracciones ensayadas de *N. helminthoides*.

Por incubación de las células 3T3DC-SIGN por dos horas con las fracciones (50 y 100 µg/mL), y posterior infección con JUNV también en presencia de los compuestos, se obtuvo una reducción de la infección de más del 90 % en el sistema tratado con N6, mientras que de sólo un 30 % con N4, inclusive en la mayor concentración. Se utilizó el manano de *Saccharomyces* como control positivo, obteniendo porcentajes altos de inhibición y muy similares a los de N6.

Las células 3T3 mostraron poca infección con JUNV, y dicho patrón no se vio alterado por la presencia de los mananos o el xilomanano, sugiriendo fuertemente la participación de DC-SIGN en la inhibición descripta. Los datos se verificaron por dos técnicas diferentes: titulación de virus en sobrenadante, y por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-proteína N de JUNV.

Lo observado permitió concluir la especificidad del receptor proteico por los residuos manosa, y una marcadamente menor afinidad por los xilomananos. Los receptores DC-SIGN, de reconocimiento de patrones, se consideraron en la Introducción de inmunomodulación (pág. 121).

8.6. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE

Se determinó el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) en presencia de las fracciones activas contra virus. EL TTPA se prolonga cuando existen inhibidores de los factores intervinientes en la vía intrínseca clásica de coagulación.

Se ensayaron distintas concentraciones, en un rango que cubría sus valores de CI_{50} . Se utilizaron pools de plasma humano, PBS como control negativo y heparina como control positivo. Los datos se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Medición del TTPA de las fracciones activas contra virus derivadas de *N. helminthoides*.

Fracción	TTPA (segundos)					
	concentración ($\mu\text{g/mL}$)					
	0,2	0,5	2	5	10	20
N3	48,0 \pm 0,005	49,1 \pm 0,5	n.d.	44,5 \pm 2,4	46,5 \pm 1,8	50,9 \pm 0,1
N4	42,9 \pm 1,0	43,5 \pm 0,001	n.d.	43,4 \pm 0,4	46,0 \pm 1,0	47,6 \pm 1,2
N6S-2h	45,7 \pm 1,9	47,5 \pm 1,5	93,6 \pm 0,3	> 180	> 180	> 180
N6S-3h	43,1 \pm 2,2	45,6 \pm 1,9	142,9 \pm 1,4	> 180	> 180	> 180
Heparina	n.d.	62,3 \pm 0,7	n.d.	> 180	> 180	> 180
PBS	52,2 \pm 1,9					

No se evidenció una acción anticoagulante por los xilomananos. En efecto, N3 y N4 no extendieron el TTPA hasta 20 $\mu\text{g/mL}$, la mayor concentración probada, que es 3-4 veces mayor que sus CI_{50} .

Los mananos sobresulfatados, en cambio, interfirieron en el TTPA a concentraciones bajas y muy similares a las de su CI_{50} . La acción anticoagulante se detectó a partir de 2 $\mu\text{g/mL}$, de manera más pronunciada para el más sulfatado, N6S-3h.

Estos resultados confirmaron el uso excluyente por aplicación tópica de estos mananos de alta actividad antiviral, tal como se utilizó en el ensayo de protección en

ratones con N6S-2h. Esta vía de aplicación es adecuada para tratamiento de virus herpes, no así para dengue, cuyo contagio por picadura de mosquito promueve el ingreso directo a sangre.

**Capítulo 9: ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE
FRACCIONES DE NEMALION HELMINTHOIDES**

ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA

Los efectos de polisacáridos de algas sobre el sistema inmune son hasta el momento mucho menos estudiados que los de otras fuentes. Los trabajos existentes refieren mayormente a carragenanos, fucoidanos, o bien a heteropolisacáridos de estructura variable, tal como se detallara en la Introducción. En esta sección se presentan los primeros estudios de inmunomodulación con estructuras naturales no exploradas previamente.

Los ensayos se realizaron con los xilomananos N3, N4, el manano N6, todos caracterizados químicamente en esta Tesis. En algunos casos se utilizó el derivado sulfatado N6S-2h, además de un xilomanano (F3) y un manano (F6) de *Nothogenia fastigiata*, previamente caracterizados (Kolender, 2003), obteniéndose nuevos aislamientos para el presente trabajo - ver Anexo III pág. 168-.

Se comenzó analizando la proliferación de células del sistema inmune frente al estímulo de los polisacáridos. A continuación, se estudió la secreción de citoquinas de sistemas estimulados tanto *in vitro* en cultivo de macrófagos, como *in vivo* en ratones sujetos a estimulación.

9.1. Efecto sobre la proliferación de linfocitos T humanos (línea H9).

Para medir el efecto de los polisacáridos sobre la capacidad proliferativa de linfocitos T, se sembraron células de la línea H9 junto con MM (control) o con los compuestos N3, N4 ó N6S-2h. A las 48 h post-siembra se calculó el número de células en cada tratamiento. Se utilizó el método de MTS. Se compararon las absorbancias (Abs) con una curva de calibración (Abs vs N° células) realizada en las mismas condiciones que los experimentos.

Como puede observarse en la Figura 8, las tres fracciones ensayadas mostraron efectos proliferativos en concentraciones de 0,5 y 5 µg/mL, alcanzando a las 48 h un número de células significativamente mayor que el control celular (CC). El xilomanano N3 mostró mayor efecto en la concentración menor, duplicando el valor del control,

mientras que N4 y N6S-2h registraron un aumento en relación al control de 26 % y 58 %, respectivamente.

Con 5 $\mu\text{g/mL}$, ambos xilomananos y el manano sobresulfatado ejercieron un efecto similar, aumentando el número de células respecto del CC entre un 70 y un 85 %. El control positivo (mezcla LPS-Concanavalina A) indujo la proliferación de manera comparable a los polisacáridos, en las dos concentraciones del ensayo.

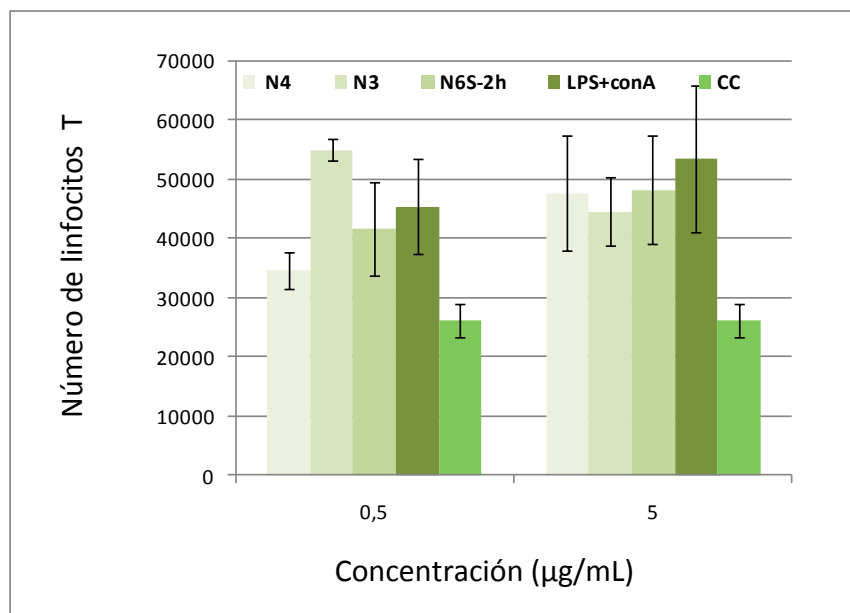


Figura 8. Efecto de los xilomananos N3 y N4 y del manano N6S-2h sobre la proliferación de linfocitos T (línea H9) a las 48 h de cultivo. LPS+conA fue utilizado como control positivo. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Los valores obtenidos evidenciaron un efecto proliferativo por ambos xilomananos sobre linfocitos T, que no se apreció cuando se redujo la concentración a 0,05 $\mu\text{g/mL}$.

Por otra parte, los mananos N6 y F6 no mostraron ejercer un efecto proliferativo en las condiciones descritas, aunque sí se obtuvo una tendencia con el manano sobresulfatado N6S-2h, incluido en la Fig. 8.

9.2. Efecto sobre la proliferación de monocitos humanos (línea U937)

Para medir el efecto proliferativo en células monocíticas humanas, las mismas fueron sometidas durante 48 h al mismo tratamiento que en el experimento anterior. En este caso se incorporaron las fracciones de *N. fastigiata*. Usando una curva de calibración se realizó la conversión de absorbancias a número de células; como control positivo se usó LPS.

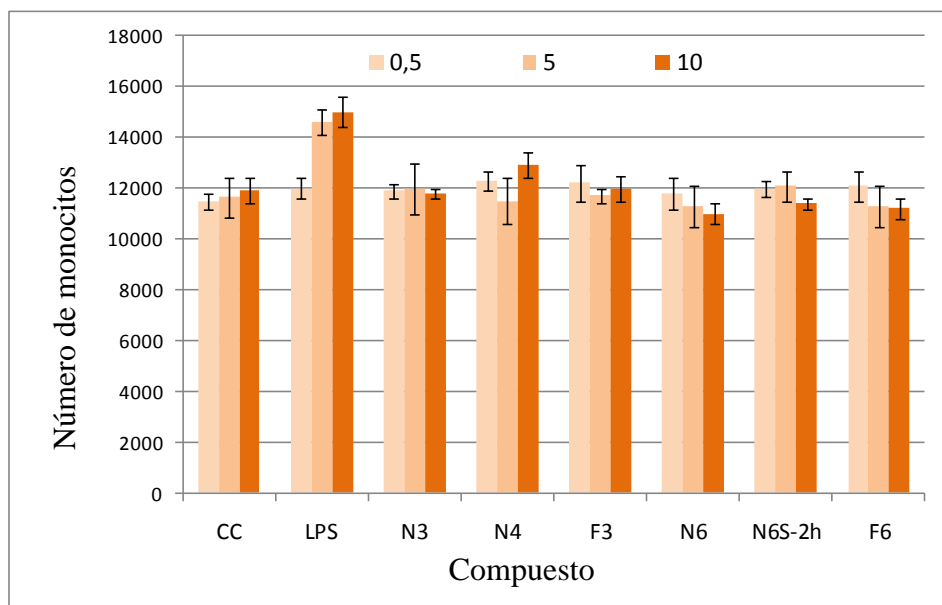


Figura 9. Número de células monocíticas U937 luego de 48 h de incubación con 0,5, 5 ó 10 µg/mL de mananos (F6, N6, N6S-2h) y xilomananos (N3, N4, F3) sulfatados. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Como muestra la Fig. 9, ninguna de las fracciones de mananos (N6, F6, N6S-2h) ó xilomananos (N3, N4, F3) manifestaron efectos proliferativo ni citostático en células U937, puesto que los valores no difirieron respecto del CC. Sólo la estimulación con LPS produjo, como era esperable, un aumento en el número de células en comparación con el CC.

9.3. Macrófagos murinos línea RAW 264.7

De acuerdo al rol crucial adjudicado a los macrófagos en el mecanismo de inmunomodulación por polisacáridos de origen vegetal (ver Introducción), se estudió más extensamente este tipo celular. Además del efecto proliferativo, se analizó la citotoxicidad de las fracciones y la liberación de citoquinas por parte de macrófagos estimulados con las mismas.

9.3.1. Citotoxicidad

Se evaluó el potencial citotóxico de los compuestos sobre los macrófagos en estudio. Se trataron monocapas confluentes de células RAW 264.7 con distintas concentraciones (8,75, 17,5 y 35 $\mu\text{g/mL}$) de polisacárido por 48 h, al cabo de lo cual se analizó la viabilidad celular por MTS.

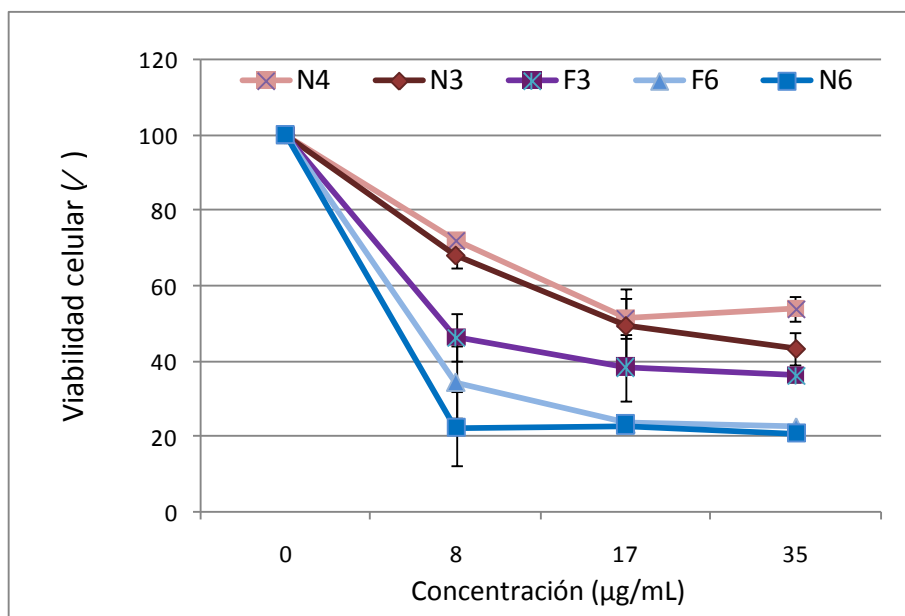


Figura 10. Efecto de mananos (N6, F6) y xilomananos (N3, N4, F3) sulfatados sobre la viabilidad de células RAW 264.7 confluentes incubadas por 48 h con distintas concentraciones (8,75, 17 y 35 $\mu\text{g/mL}$) de los compuestos. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Como se observa en la Figura 10, F6 y N6 mostraron ser citotóxicos inclusive a la menor concentración ensayada, reduciendo la viabilidad celular en más de un 65%

respecto del control. En el caso de los xilomananos, tanto N3 como F3 a 8,75 $\mu\text{g/mL}$ afectaron moderadamente la viabilidad, manteniéndola en un 72 y 68% respectivamente. Con N4, la viabilidad celular a la misma concentración fue del 50%; aun así, mostró ser mayor que la registrada con los mananos. En cuanto a las concentraciones de 17,5 y 35 $\mu\text{g/mL}$, con todas las fracciones se detectó una disminución de la viabilidad de más del 50%, indicando que este tipo celular resultó ser mucho más sensible a los compuestos que las células Vero, estudiado en el capítulo anterior, que no derivan de sistema inmune. Sin embargo, el efecto de los mananos fue muy similar entre N6 y F6 como en Vero, evidenciando la importancia de los residuos de manosa en esta acción citotóxica, independientemente del patrón de sulfatación.

9.3.2. Efecto sobre la proliferación celular

De manera similar a lo presentado en **9.1** y **9.2**, se midió la proliferación de macrófagos RAW incubados con distintas concentraciones de xilomananos (N3, N4, F3) ó de mananos (N6, F6, y el sobresulfatado N6S-2h) durante 48 h. Como control positivo se usó LPS. Se determinaron las absorbancias por MTS y se interpoló el número de células en una curva de calibración.

En este caso los resultados se expresan como porcentaje de proliferación respecto de la proliferación propia del control (Fig. 11). Las fracciones N3 y F3 ejercieron un efecto proliferativo moderado, mientras que se mostró más marcado con el xilomanano N4, siendo el efecto dependiente de la concentración y superando en un 80 % a la proliferación del CC cuando se colocó a 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$.

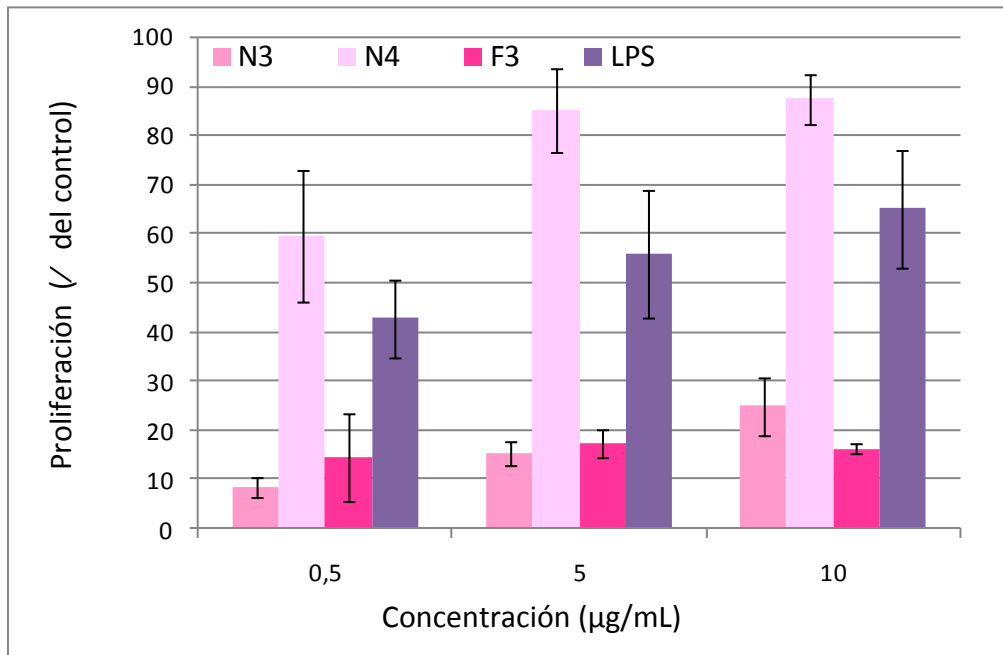


Figura 11. Efecto proliferativo sobre células RAW 264.7 por distintas concentraciones (0,5, 5 y 10 µg/mL) de los xilomananos sulfatados N3, N4 y F3 durante 48 h, y LPS como control positivo. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Con las fracciones de mananos a 0,5 µg/mL, no se observaron efectos significativos sobre la proliferación de macrófagos. A 5 µg/mL y 10 µg/mL, N6S-2h no provocó cambios respecto del nivel de proliferación del CC (no mostrado), indicando un perfil diferenciado con los xilomananos de la Fig. 11. N6 y F6, en tanto, tampoco se incluyeron en el gráfico dado que mostraron nuevamente su alta toxicidad, también en células en fase exponencial, reduciendo la replicación celular en más de un 60% respecto del CC, y nuevamente en porcentajes idénticos para ambas fracciones.

9.3.3. Efecto sobre la liberación de citoquinas

Se continuó analizando la activación de macrófagos RAW frente al estímulo de fracciones de *N. helminthoides* y *N. fastigiata*, analizando niveles de las citoquinas IL-6, TNF- α y del mediador inflamatorio NO. Si bien sólo el xilomanano N4 había mostrado claros efectos proliferativos, no se podía descartar una activación de este tipo celular por parte de alguna otra fracción. Asimismo, se mantuvieron en el estudio F6 y N6, con el fin de conocer sus respectivos perfiles.

A partir de monocapas de células confluentes, se adicionaron 5 µg/ml de los distintos polisacáridos. Como CC se emplearon células con MM, con LPS como control positivo

y con heparina como control interno. Se cosecharon sobrenadantes a distintos tiempos post estimulación (8, 16 y 24 h) y se realizó la medición de citoquinas por el método de ELISA y el nivel de NO por el Método de Griess.

9.3.4. Cuantificación de IL-6.

A las 8 h de tratamiento, las fracciones mostraron niveles de IL-6 bajos y similares al del CC. Sin embargo, todas las fracciones de xilomananos activaron la expresión de IL-6 a partir de las 16 h. Mientras que la heparina mantuvo los valores similares al control, con LPS se detectó un incremento en todos los tiempos medidos (Fig. 12).

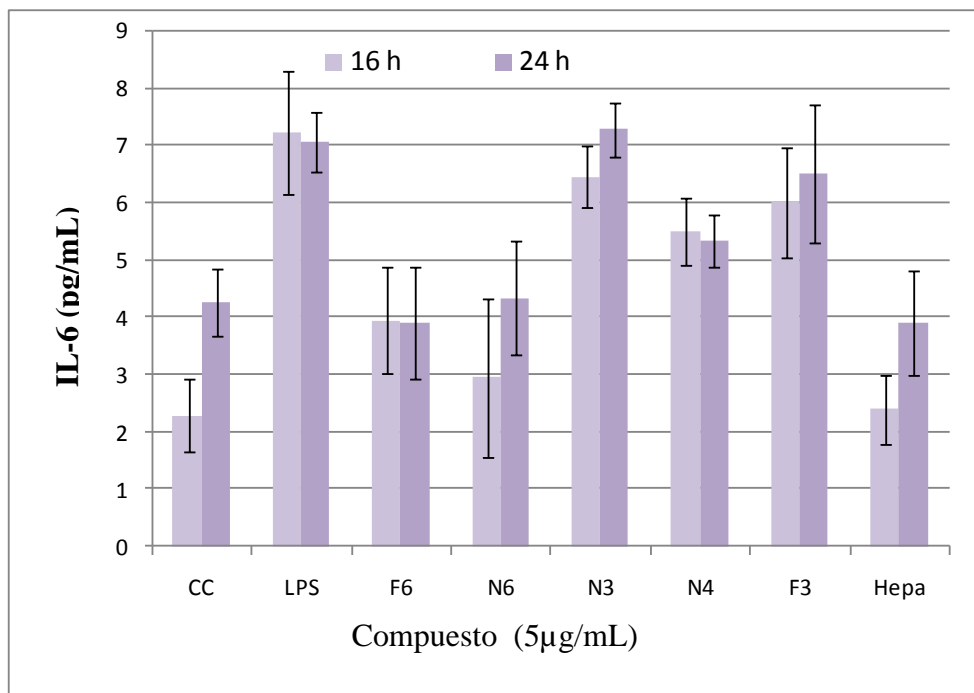


Figura 12. Concentración de la citoquina proinflamatoria IL-6 en sobrenadantes de macrófagos expuestos por 16 ó 24 h a 5 µg/mL de mananos (N6, F6) o xilomananos (N3, N4, F3) sulfatados, usando LPS y Heparina como controles. Los resultados son el promedio de dos experimentos ± DE

Se observó un aumento de la concentración de IL-6 en los sobrenadantes de los macrófagos estimulados con los polisacáridos de ambas algas. Por el contrario, la heparina no estimuló la producción de esta citoquina. .

9.3.5. Cuantificación de TNF- α .

Trabajando con los mismos sobrenadantes de macrófagos estimulados, se determinó la concentración de TNF- α por ELISA (Fig. 13). A 8 h, no hubo diferencias entre los tratamientos y el CC.

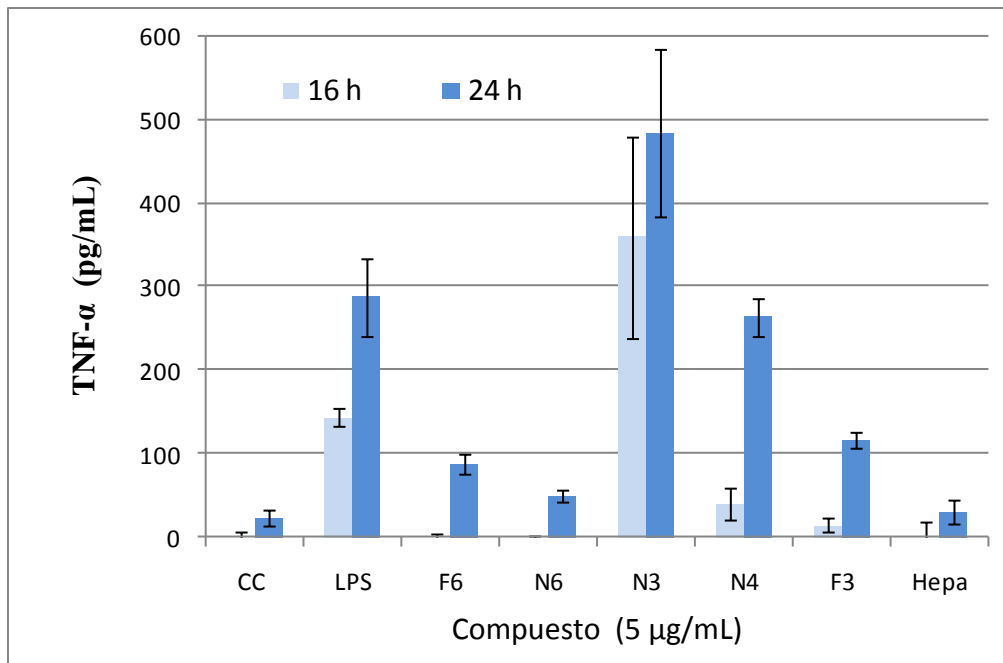


Figura 13. Concentración de TNF- α en sobrenadantes de macrófagos expuestos por 16 ó 24 h a 5 $\mu\text{g/mL}$ de mananos (N6, F6) y xilomananos (N3, N4, F3), usando LPS y Heparina como controles. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

A partir de 16 h, el xilomanano N3 mostró el mayor aumento de TNF- α en relación con los otros compuestos, superando inclusive los niveles del control positivo LPS. Para N4 y F3, la activación fue significativa luego de 24 h de exposición, siendo los niveles de N4 el doble que para F3. El tratamiento con los mananos, en tanto, produjo un leve aumento en el nivel de TNF- α detectable recién a las 24 h, y menor que en los xilomananos. Con la heparina, al igual que lo observado con los valores de IL-6, no se evidenciaron aumentos en los niveles de TNF- α en los tiempos ensayados.

9.3.6. Cuantificación de óxido nítrico (NO)

Los mismos sobrenadantes utilizados para cuantificar las citoquinas fueron analizados para determinar su concentración de NO (Fig. 14).

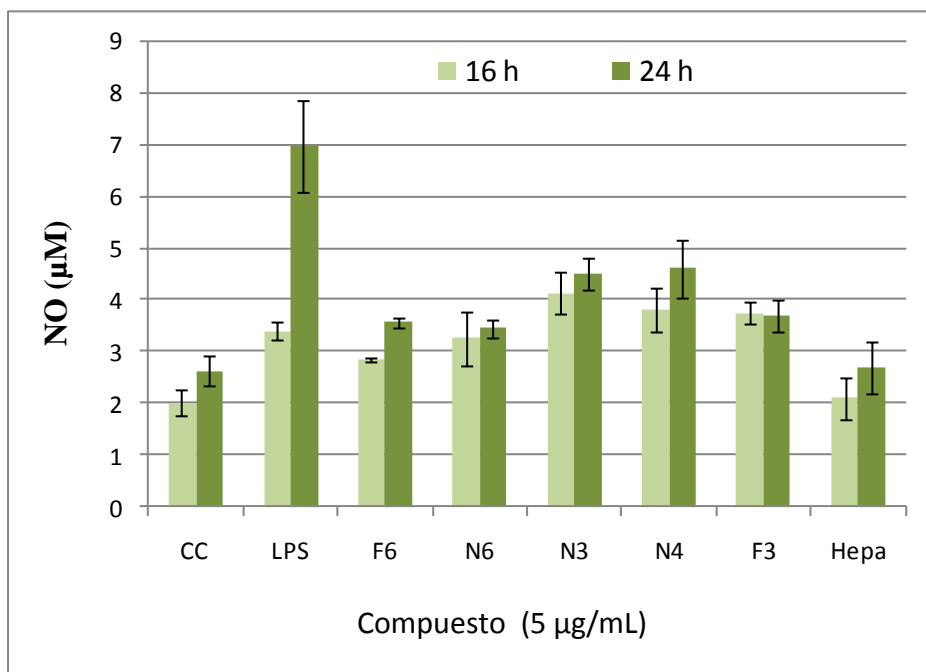


Figura 14. Concentración de NO en sobrenadantes de macrófagos expuestos por 16 ó 24 h a 5 µg/mL de mananos (N6, F6) y xilomananos (N3, N4, F3), usando LPS y Heparina como controles. Los resultados son el promedio de dos experimentos \pm DE.

Los niveles detectados de NO fueron bajos para los tiempos ensayados, salvo para el control positivo de LPS que a las 24 h fue de 7 µM. Los sobrenadantes de 24 h de incubación con N3 y N4 fueron los de mayor concentración, ambos con un valor de 4,5 µM, que prácticamente duplicaba el valor del CC. Nuevamente, ambas estructuras de mananos mostraron un patrón similar y diferente de los xilomananos, con una estimulación algo menor, tanto a las 16 h como a las 24 h.

Compendiando los resultados expuestos, las dos estructuras químicas ensayadas, xilomananos y mananos sulfatados, difirieron marcadamente en sus efectos inmunomoduladores *in vitro*.

Los xilomananos sulfatados, especialmente N4, promovieron la proliferación de macrófagos y linfocitos T, además de activar macrófagos provocando la liberación tanto

de IL-6, de TNF- α como así también de NO. Si bien mostraron cierta toxicidad en macrófagos, los efectos mencionados se evidenciaron a concentraciones tan bajas como 0,5 y 5 $\mu\text{g/mL}$, mucho menores que su CC_{50} .

Los mananos sulfatados, en cambio, mostraron una marcada citotoxicidad sobre macrófagos en fase estacionaria, y no tuvieron efecto proliferativo sobre células T. Por el contrario, el derivado sobresulfatado N6S-2h no mostró dicha citotoxicidad y estimuló la proliferación de linfocitos T.

Además, ambos mananos naturales - N6 y F6 - mostraron en todos los casos efectos muy similares entre sí, sugiriendo fuertemente que los residuos de manosa pero no el patrón de sulfatación estarían implicados en los efectos mostrados. De manera análoga, lo hallado para xilomananos - N3, N4 y F3 - pareciera más influenciado por su estructura ramificada con xilosa que por la posición de grupos sulfato.

9.4. Evaluación de la actividad inmunoestimuladora in vivo

Con el fin de analizar si los efectos manifestados por los xilomananos en macrófagos en cultivo podían ser evidenciados en un modelo murino, se procedió a estudiar la expresión de citoquinas y NO en animales estimulados con los compuestos.

En primer término, se realizó una prueba preliminar con dos xilomananos para seleccionar qué fracción se utilizaría en el estudio completo. Para ello, se inyectaron ratones BALB/c por vía intravenosa con N4 y F3 en una dosis de 30 mg/kg, empleando como control positivo LPS. A los 75 min post-inoculación se sangraron los animales y se cuantificaron las citoquinas séricas por ELISA. Una vez obtenidos los sueros de ratones - dos por tratamiento- se mezclaron y se cuantificaron los niveles de ambas citoquinas. Los datos se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Cuantificación de IL-6 y TNF- α en suero de ratones a 75 min de ser inyectados por vía intravenosa con xilomananos (30 mg/kg animal). Los resultados son el promedio \pm DE de los triplicados de un dosaje por ELISA.

Tratamiento	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
PBS	7 \pm 3	185 \pm 20
Xilomanano N4	>1000	470 \pm 35
Xilomanano F3	829 \pm 59	847 \pm 67
LPS	>1000	>1000

Como se observa en la Tabla 10, ambos xilomananos indujeron un considerable aumento de las citoquinas analizadas, en relación con el control de PBS. En el caso de IL-6, comparable con el control positivo. La estimulación de TNF- α , en tanto, fue bastante mayor para F3, con un valor de 847 pg/mL respecto de N4, con 470 pg/mL.

Cabe señalar que se observaron efectos colaterales en los animales inmediatamente después de las inyecciones. Durante un lapso de casi una hora, se vieron los ratones afectados en su comportamiento, con aquietamiento y temblores; esto no se observó en los controles con PBS y tampoco en los inyectados con LPS.

En base a los resultados obtenidos *in vitro* y de la tabla 10, se seleccionó el compuesto N4 para continuar el estudio *in vivo*. Se procedió a realizar una cinética con el fin de determinar el tiempo de mayor expresión de citoquinas en sangre. Se realizó idéntico protocolo de inyección intravenosa, aumentando el tamaño de la muestra a n=4.

A los 30, 60 y 90 min post-inoculación se sangraron los animales y se cuantificaron las citoquinas. En paralelo, se probó un κ -carragenano comercial (Sigma), que había generado estimulación de citoquinas en macrófagos RAW (Mateu, 2011).

Como puede observarse en las Tablas 11 y 12, los valores de IL-6 y TNF- α de animales inyectados con κ -carragenano fueron similares a los del control (PBS) en todos los tiempos medidos. El xilomanano, en tanto, mostró estimular ambas

citoquinas, de forma coherente con lo determinado a los 75 min de estimulación. Con su tratamiento, IL-6 alcanzó valores superiores a 1800 pg/mL a 60 min, manteniendo un valor similar a 90 min. Para TNF- α , por su parte, la concentración a 60 min fue de 317 pg/ml, aumentando a 90 min a un valor de 915 pg/mL, aproximadamente 12 veces más que el control con PBS.

Tabla 11. Cinética de activación de IL-6 en plasma a 30, 60 y 90 min luego de inyección intravenosa de xilomanano N4 (30 mg/kg). Los resultados son el promedio \pm DE de los triplicados de un dosaje por ELISA.

Tratamiento	IL-6 pg/mL		
	30 min	60 min	90 min
PBS	10 \pm 2	5 \pm 1	18 \pm 2
xilomanano N4	60 \pm 10	1850 \pm 97	2100 \pm 121
κ-carragenano	13 \pm 1	25,5 \pm 1	21,7 \pm 1,5
LPS	n.d.	3990 \pm 280	n.d.

Tabla 12. Cinética de activación de TNF- α en plasma a 30, 60 y 90 min luego de inyección intravenosa con el xilomanano N4 (30 mg/kg). Los resultados son el promedio \pm DE de los triplicados de un dosaje por ELISA.

Tratamiento	TNF pg/mL		
	30 min	60 min	90 min
PBS	62 \pm 1	68 \pm 2	70 \pm 9
xilomanano N4	52 \pm 10	317 \pm 20	915 \pm 51
κ-carragenano	60 \pm 3	69 \pm 4	80 \pm 3
LPS	n.d.	2000 \pm 102	n.d.

Los resultados confirmaron que a los 30 min p.i. no se detecta un nivel de citoquinas diferente del control; también, que no se observa un descenso de las concentraciones de IL-6 y TNF- α a los 90 min. La acción del xilomanano en estudio fue diferente respecto de la de κ -carragenano, en este modelo experimental.

Por último, en los animales tratados con N4, los valores de NO en los sueros fueron similares a los del control con PBS para los tres tiempos ensayados.

9.5. Efecto inmunoprotector de los xilomananos en una infección viral

Considerando las características experimentales obtenidas sobre el sistema inmune, se procedió a analizar el efecto protector de xilomananos por vía intravenosa frente a una infección herpética intranasal, en un modelo murino. Si bien la caracterización completa de activación de citoquinas se había hecho con N4, se compararon en paralelo los tres xilomananos en estudio.

Se inyectaron ratones BALB/c (n=4) con N4, N3 ó F3 30 mg/kg animal, por vía intravenosa, y nuevamente PBS como control. Al cabo de una hora, se inocularon con una dosis moderada de HSV-2 cepa MS (3×10^4 UPF/animal) por vía intranasal. Se siguió la evolución de morbilidad y mortalidad a lo largo de 21 días.

Tabla 13. Efecto protector de los xilomananos en ratones BALB/c por vía intravenosa 1 h antes de la infección intranasal con HSV-2; n=4.

Grupo	Morbilidad (%)
PBS	75
N4	0
N3	25
F3	75

Se obtuvieron resultados similares para ambos derivados de *N. helminthoides*, N4 y N3, cuya inmunoestimulación protegió a los animales de la aparición de la enfermedad en un 100 % y un 75 % de los casos, respectivamente. En el control con PBS, se registró un 75% de enfermedad, sin registrarse mortalidad, debido a la baja dosis viral usada para la infección.

El xilomanano de *N. fastigiata*, F3, manifestó una menor protección, observándose un mayor porcentaje de enfermedad (75%) y también gravedad de la misma en comparación con el control. Algunos síntomas fueron encorvamiento postural severo y parálisis en patas traseras, sumados a la inflamación ocular y debilidad observada en el resto de los enfermos, de todos los grupos.

Por último, para definir si la protección observada por N4 era dependiente de la dosis viral, se repitió el ensayo en las mismas condiciones anteriores aumentando las UFP (1×10^5 /animal). En este caso, no se observaron diferencias entre el control con PBS y el tratamiento, donde todos los animales infectados enfermaron y murieron entre los días 10 y 13.

Por lo tanto, estos resultados confirmaron la eficacia del efecto inmunoprotector de los xilomananos sólo cuando se emplean dosis virales que no superan el umbral inmunológico máximo de defensa del huésped, en el modelo experimental empleado. En infecciones controlables, el rápido acceso por vía sistémica de las citoquinas estimuladas por el inmunomodulador a la zona infectada explicarían, al menos en parte, la eficacia del tratamiento.

Capítulo 10: METODOS EXPERIMENTALES Sección II

Consideraciones Generales:

- Todos los tipos celulares crecidos en botella se mantuvieron en estufa a 37 °C.
- Las incubaciones de placas con células se efectuaron en estufa con 4% de CO₂ a 37 °C, salvo que se aclare otra temperatura.
- Todos los experimentos in vitro se realizaron en condiciones de esterilidad.
- Las soluciones madre de polisacárido se realizaron 2 mg/mL en agua destilada estéril y se centrifugaron 10 min a 3000 rpm, antes de efectuar las diluciones.
- En los experimentos en placas de 6 ó 24 pocillos, cada tratamiento se efectuó por duplicado.
- En los experimentos en placa de 96 pocillos, cada tratamiento se efectuó por cuadruplicado.
- Las absorbancias de las placas de 96 para experimentos de proliferación, citotoxicidad y ELISA se midieron en equipo Biotek Elx808.
- Los animales BALB/c provinieron del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la UBA.

10.1 LINEAS CELULARES Y VIRUS

Células

Vero: Línea de células epiteliales de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops* (ATCC CL-81). Las células se cultivaron en medio MEM (GIBCO) suplementado con 5 % ST inactivado y 0,20% de antibiótico gentamicina. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzar la confluencia se mantuvieron en MM.

RAW 264.7: Línea celular (ATCC TIB-71) de macrófagos adherentes, establecida a partir de un tumor inducido en ratones BALB/c por el virus de leucemia de Abelson. Las células se cultivaron en DMEM (GIBCO) suplementado con 10 % SFB y penicilina-estreptomina (1% de mezcla Gibco 15140-148), estabilizado con buffer Hepes. Las monocapas se subcultivaron periódicamente y luego de alcanzar la confluencia se mantuvieron en MM con 5% de SFB.

H9: Línea de linfocitos T humanos (ATCC HTB-176) establecida a partir de linfoma cutáneo. Las células se cultivaron en medio RPMI (1640, GIBCO) suplementado con 10 % SFB y antibióticos gentamicina (0,20 %), penicilina-estreptomina (10 %) (GIBCO). Cada 3-4 días se realizaron los pasajes, dejando decantar las células y retirando el medio antiguo. Se resuspendieron en medio nuevo a una concentración aproximada de $2 \cdot 10^5$ células/mL.

U937: Línea de monocitos humanos (ATCC CRL-1593.2) establecida a partir de linfoma humano histiocítico. Las células se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% SFB y penicilina-estreptomina (10%) (GIBCO, USA). El pasaje de células se realizó en las mismas condiciones que la línea H9 mencionada antes.

Virus

Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) cepa F y Herpes simplex (HSV-2) tipo 2 cepa MS se obtuvieron de ATCC.

Dengue 2 (cepa N.G.C.): La cepa fue cedida por la Dra. A.S. Mistchenko, Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina.

10.1.1 Preparación de las suspensiones virales

Los stocks de HSV-1 y HSV-2 se prepararon y titulados por plaqueo directo sobre células Vero. Se infectaron monocapas de células Vero con una m.i. que osciló entre 0,1 y 0,01 UFP/célula. Se dejó adsorber por 1 h a 37°C. Luego se procedió a retirar el inóculo y se cubrieron las células con MM. Transcurridas 24 h y observando un ataque del 90% de la monocapa por acción citopática viral, se lisaron las células mediante dos ciclos de congelamiento y descongelamiento. Se eliminaron los restos celulares por centrifugación durante 15 min a 1000 g y se guardó el sobrenadante a -70°C hasta su posterior uso. Los títulos virales obtenidos oscilaron entre 1×10^7 y 1×10^9 UFP/mL

El stock de DENV-2 se preparó en células de mosquito C6/36 HT y titulado por formación de placas en células Vero. La línea celular C6/36 HT de *Aedes albopictus* se cultivó en medio Leibovitz L-15 medium (Gibco).

10.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Monocapas de células Vero o macrófagos RAW confluentes se incubaron en presencia de distintas concentraciones de los compuestos en MM durante 48 h a 37°C. Luego se midió la viabilidad celular por MTS (Promega Cell Titer 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation. Se agregaron 20 µL de reactivo por pocillo, y luego de dos horas de incubación se leyó la 490 nm ref. 630 nm. Se consideró la absorbancia del control celular como el 100 % de viabilidad. La concentración citotóxica 50% (CC₅₀) fue definida como la concentración del compuesto capaz de reducir el número de células viables en un 50%.

10.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL

10.3.1. Reducción en el número de placas.

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en microplacas de 24 pocillos con 40-80 UFP por pocillo de HSV-1 y HSV-2, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de polisacáridos. Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, se retiró el inóculo y se cubrió con MM con 0,70 % de metilcelulosa. Luego de 2 días de incubación a 37°C, se procedió a contar las placas previa tinción con cristal violeta. La Concentración Inhibitoria 50% (CI₅₀) fue definida como la concentración de compuesto requerida para reducir el número de placas en un 50 % respecto del control.

10.3.2. Inhibición del rendimiento viral

Se infectaron monocapas de células Vero crecidas en placas de 24 pocillos con DenV-2 (m.i.: 0,1) en ausencia o presencia de distintas concentraciones de polisacárido. Luego de 1 h de adsorción a 37°C, se retiró el inóculo, se lavaron los pocillos tres veces con PBS y se cubrieron las monocapas con MEM 5% ST durante 48 h. Al cabo de ese tiempo se cosecharon los sobrenadantes (dos por cada concentración). Se tituló el virus del sobrenadante por formación de placas en células Vero. Se calculó la CI₅₀ como la concentración del compuesto que redujo al 50% el rendimiento viral.

10.3.3. Actividad virucida

Una suspensión de HSV con 1×10^6 UFP se incubó durante 1,5 h a 37°C en presencia de igual volumen de distintas concentraciones de los compuestos. Como control se incubó, en las mismas condiciones, la suspensión viral con igual volumen de MM. Luego se realizaron diluciones de las mezclas y se procedió a su titulación por UFP en células Vero, tomando en cuenta que en las diluciones ensayadas sobre las células los compuestos no ejercieran efecto antiviral.

10.3.4. Acción de los compuestos después de la adsorción

Se infectaron células Vero con 50 UFP de HSV-1 ó HSV-2 efectuando en ambos casos dos tratamientos distintos:

- Tratamiento 1 **“post-adsorción”**: Se infectaron células y luego de 1 h de adsorción a 4°C se retiró el inóculo de virus, las células fueron lavadas con PBS y se incorporaron las soluciones de polisacárido en el medio de plaqueo, permaneciendo las 48 h.
- Tratamiento 2 **“adsorción + post-adsorción”**: Los compuestos estuvieron presentes en la adsorción (a 4 °C) y posteriormente en el medio de plaqueo.

En ambos Tratamientos, en el control celular los compuestos estuvieron ausentes en la adsorción y en el medio de plaqueo. Luego de 48 h de incubación a 37°C, se fijaron y se determinó el número de placas.

10.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTICOAGULANTE

Se midió el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA, en inglés APTT) para varias concentraciones de los polisacáridos utilizando plasma humano. Se mezclaron 100 µl de un pool de plasma humano con 30 µl de la solución a probar y 100 µl de reactivo APTT (Wiener Lab.) las mezclas se incubaron por 1 min a 37 °C. Luego se agregó 70 µl de 0,025 M CaCl₂ y se registró el tiempo de coagulación. Se utilizó PBS como control negativo y heparina (0,5 µg/mL y 5 µg/mL) como control positivo.

10.5. ENSAYO DE PROTECCION EN UN MODELO DE INFECCION INTRANASAL

Se infectaron ratones hembras BALB/c de 7-8 semanas de edad, por vía intranasal con 20 µl de HSV-2 (1x10⁵ UFP). Inmediatamente después de la infección, se colocaron por la misma vía 20 µl de compuesto sulfatado (N6S-2h) 1% en solución fisiológica. Como controles se utilizó PBS y κ-carragenano (Sigma) 1%. Se siguió la

evolución de la morbilidad y mortalidad de los animales inoculados por un período de tres semanas.

10.6. ACCION INMUNOMODULADORA

10.6.1. Efecto sobre la proliferación celular

Para determinar el efecto inmunoproliferativo de los polisacáridos se emplearon macrófagos murinos línea RAW 264.7, linfocitos T humanos línea H9 y monocitos humanos línea U937. Se sembraron 50 μL de 1×10^4 ó 1×10^5 células por pocillo en microplaca de 96. A continuación se agregaron 50 μL de distintas concentraciones de polisacáridos en RPMI. En todos los casos se utilizó una concentración mínima calibrada de suero (0,5-1%) que permitiera el mantenimiento celular pero no estimulara el crecimiento.

Los cultivos se incubaron a 37°C durante 24 y 48 h, procediéndose al agregado de 20 μL /pocillo de MTS, que se dejó actuar durante 2 h a 37°C. Posteriormente, se midió la absorbancia con una longitud de prueba 490 nm y de referencia de 630 nm. Se estimó el número de células/pocillo por interpolación de los valores promedio de absorbancia con la curva de calibración. Como control positivo, para macrófagos se empleó LPS y para las células H9 se utilizó una mezcla de LPS y Concanavalina A. Dado que no había crecimiento suficiente o, en el caso de H9, resultados consistentes a 24 h, se presenta en Resultados lo obtenido para 48 h.

10.6.2. Efecto sobre la liberación de citoquinas en macrófagos RAW 264.7

Se expusieron monocapas confluentes de macrófagos RAW a distintas fracciones de polisacáridos (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en medio DMEM 1% SFB por un período de 8, 16 ó 24 horas. Cada dilución se realizó por duplicado. Como control se utilizó DMEM 1%, y LPS (Sigma) 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como control positivo. Al cabo del tiempo correspondiente, se cosecharon los sobrenadantes y se cuantificó la concentración de IL-6 y TNF- α por ELISA (BD Biosciences) de acuerdo a las instrucciones provistas. Cada ensayo se realizó por triplicado. Las placas fueron leídas a 450 nm y la concentración de proteínas se determinó empleando una curva de calibración.

10.6.3. Efecto de inyección intravenosa de las fracciones sobre las citoquinas plasmáticas.

Se inyectaron ratones hembra BALB/c de ocho semanas de edad (20 ± 1 g) por vía intravenosa con 0,20 mL de polisacárido (30 mg/kg de animal). Como controles se emplearon animales inyectados con PBS. Al cabo de 30, 60 o 90 minutos post-inyección, se recolectaron muestra de sangre. Se centrifugaron 10 min a 1000 rpm. Se cuantificó las citoquinas (TNF- α y IL-6) de los sueros por ELISA (BD Biosciences) de acuerdo a las instrucciones provistas, colocando cada muestra por triplicado. Las placas fueron leídas a 450 nm y la concentración de proteínas se determinó empleando una curva de calibración.

10.6.4. Efecto inmunoprotector en una infección viral

Se inyectaron ratones hembra BALB/c de ocho semanas de edad (20 ± 1 g) por vía intravenosa con 0,20 mL de los polisacáridos (30 mg/kg de animal). Luego de 1 h, se colocó por vía intranasal 20 μ L de HSV-2 (3×10^4 UFP). Durante tres semanas se siguió la evolución de la morbilidad y mortalidad de los animales.

Todos los procedimientos de manipulación y cuidado de animales se realizaron en conformidad con las leyes y políticas nacionales e internacionales (Regulación para el cuidado y el uso de animales de laboratorio, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Buenos Aires, Argentina, aprobado por CD 140/00, y el Departamento de salud y Servicio humano, Public Health Service, NIH, 2002. Assurance Identification #A5523-01).

Anexo III: Obtención de fracciones de *Nothogenia fastigiata*

El aislamiento de las fracciones F3 y F6 se realizó por el mismo procedimiento utilizado en esta Tesis para N3 y N6 de *Nemalion helminthoides*.

La fracción F3 proviene de la redisolución con NaCl 1,50 M y la F6 de NaCl 4,00 M del precipitado de Cetrimida de un primer extracto de *N. fastigiata*.

El procedimiento en su totalidad, desde la extracción, se basó en lo descrito en la Tesis doctoral de A.A. Kolender (2003). Se partió para el aislamiento del presente trabajo de material liofilizado de recolección en Puerto Deseado, Santa Cruz, Argentina.

Se obtuvo nuevamente un xilomanano en F3 (75% Man, 16% Xil, 5% Gal, 24% sulfato) y un manano casi puro en F6 (98% Man, 2% sulfato, 32% sulfato). En ambos, se confirmaron las posiciones de sulfatación en C-2 y C-6 y la no contaminación con Cetrimida por RMN ¹H.

Sección III

DISCUSION Y CONCLUSIONES GENERALES

Las estructuras de polisacáridos caracterizadas a lo largo de este trabajo guardan similitud con las antes descritas para otras algas rojas Nemaliales. En particular, se determinó en *Nemalion helminthoides* la misma estructura de mananos sulfatados que en *N. vermiculare*, la única especie del género previamente estudiada, y en las analizadas del género *Liagora*, sugiriendo un patrón de sulfatación común en la familia *Liagoraceae*.

La escasa presencia de mananos y xilomananos como componentes sulfatados en algas otorga especial interés a este tipo de estructuras, que todavía no poseen aplicaciones terapéuticas ni industriales. En cuanto a los xilanos neutros de uniones mixtas, éstos tampoco poseen aplicaciones conocidas aunque se los investiga como aditivos alimentarios (Ebringerová et al., 2005). Asimismo, con la caracterización química aquí efectuada se describió la mayor parte de la fibra soluble de un alimento que es recurso no sólo en las costas de Argentina sino en muchos otros países.

De lo ensayado en cuanto a actividad biológica de las fracciones de polisacáridos de *N. helminthoides* destacan la acción antiherpética, antidengue y sobre el sistema inmune de los xilomananos sulfatados, de manera marcadamente diferente de los mananos del mismo origen.

En cuanto a la acción antiviral, las ramificaciones de β -D-xilosa en C-2 serían un factor favorable en la conformación general de estas macromoléculas para mimetizar dominios de reconocimiento de HS. En efecto, lo obtenido mediante degradación de Smith descartaría que dicha mimetización proviniera de una particular distribución favorable de grupos sulfato, sino que confirma la relevancia de las ramificaciones, ya evidenciada entre las fracciones nativas. Asimismo, estos xilomananos tendrían mayor afinidad por los dominios de HS reconocidos por HSV-2, dadas las diferencias de CI_{50} con HSV-1. Junto con la acción antiviral, es de considerar la muy baja toxicidad de las fracciones.

La generación, por medio de una reacción sencilla, de compuestos de alto grado de sulfatación a partir de mananos sulfatados naturales se describe por primera vez. Dichos productos, muy sustituidos en C-2 y C-6, ofrecen una alternativa a explorar como antiherpéticos de uso tópico en mucosas, por su protección aquí demostrada en infecciones intranasales en ratones. La búsqueda de antivirales contra HSV-2 es actualmente un foco de gran interés dado que no se han logrado vacunas efectivas contra el mismo, su virulencia es

alta y es un virus muy relevante epidemiológicamente en el contexto de enfermedades de transmisión sexual.

El alto rendimiento con que se extraen los mananos de *N. helminthoides* - y el simple acceso al alga dada su ecología - provee una excelente fuente de sustrato para la sulfatación. De hecho, a la luz de los resultados, la reacción podría efectuarse directamente sobre un primer extracto completo, simplificando la metodología y disminuyendo en consecuencia costos y tiempos de obtención. Si bien el mencionado F6 de *N. fastigiata* posee similares CI_{50} y la ventaja de ser un producto natural, esta fracción no actúa en etapas posteriores a la adsorción y es considerablemente más citotóxica en varios tipos celulares.

En cuanto al virus dengue, las determinaciones efectuadas con xilomananos y mananos sulfatados como antivirales no poseen antecedentes en la literatura. Si bien la actividad de xilomananos fue moderada, considerando que no son anticoagulantes podría investigarse su acción en otras líneas celulares, ante la falta de tratamientos para este síndrome.

En lo que respecta a la acción sobre el sistema inmune, son promisorios los resultados obtenidos con las fracciones de xilomananos sulfatados, abriéndose un campo en el estudio de la activación de la respuesta inmune innata por parte de estas estructuras. El amplio espectro de dicha respuesta permite proseguir investigando en el área de suplementos inmunoactivadores o bien de adyuvantes de vacunas, para los cuales son muy utilizados polisacáridos de microorganismos, pero cada vez más se investigan los de origen vegetal, inclusive por vía oral (Sun et al., 2011; Pereira da Silva et al., 2009; Sun et al., 2009).

El efecto proliferativo del xilomanano N4 en linfocitos T y macrófagos, además de la activación de estos últimos en sus mecanismos inflamatorios *in vitro*, y el correlato en modelo murino con altas citoquinas plasmáticas, brinda un importante sustento como para continuar evaluando a dicho compuesto como inmunomodulador. La respuesta positiva en cuanto a defensa antiviral y falta de efectos colaterales es alentadora en tanto era aún desconocida la acción de xilomananos sulfatados en organismos de mamíferos. Además, se evidenció una respuesta diferente a la obtenida con galactanos sulfatados (κ -carragenano) inyectados por vía intravenosa, que no generaron activación de citoquinas, aunque sí lo habían hecho *in vitro*.

Además, lo presentado sobre el efecto diferencial de mananos y xilomananos en células del sistema inmune plantea y provee importantes herramientas para un mejor conocimiento de los ligandos de receptores de reconocimiento de patrones. Lo hallado es consistente con que estos receptores reconocen el tipo de monosacárido - no la forma de la macromolécula ni su patrón de sulfatación - habiéndose descrito perfiles generales comunes para N6 y F6 por un lado, y para N3, N4 y F3 por el otro. En cuanto a estos últimos, se acepta para polisacáridos de microorganismos que los monosacáridos de la ramificación son los determinantes en la inmunogenicidad (Bishop y Jennings, 1982), lo cual pudo también verificarse en este trabajo en las fracciones con xilosa. Esta, por otra parte, es un ligando no muy estudiado de PRR, que a su vez están mucho más especializados en superficies de microorganismos. Del conocimiento actual, los PRR implicados en el reconocimiento de manosa podrían ser, entre otros, el de manosa (MR), DC-SIGN, Dectin-1, Dectin-2, CR3, SR o bien algún TLR (McGreal et al., 2004, Saijo et al., 2010).

MR es un receptor esencialmente endocítico y desprovisto de cola citoplasmática, que actúa en conjunto con otros receptores para desencadenar las variadas respuestas celulares en las que participa, entre ellas, producción de citoquinas (Gazi y Martínez-Pomares, 2009). Empero, sus dominios extracelulares de unión a carbohidratos están bien caracterizados y, como se detalló en la Introducción, no tendría afinidad por residuos xilosa (Taylor et al., 2005). No puede descartarse de este trabajo que la toxicidad de mananos en macrófagos provenga de alguna activación conjunta entre MR y otro receptor no identificado. DC-SIGN, cuya afinidad por manosa - y no xilosa - está reportada y se comprobó con lo presentado para JUNV, podría ser dicho receptor, entre otros. Asimismo, no está descrita la presencia de MR en monocitos, siendo entonces la no respuesta de células U937 otro elemento a tener en cuenta en considerar a MR como uno de los posibles receptores de mananos sulfatados.

Fue muy sugerente al respecto la similar toxicidad de ambos mananos comparados, N6 y F6. Asimismo, cabe destacar la mucho menor toxicidad mostrada por los sobresulfatados (N6S-2h, y menor aún N6S-3h), lo cual sugiere fuertemente la relevancia de residuos manosa sin sustituyentes para ser reconocidos por receptores celulares.

En cuanto a los residuos terminales de “alta manosa” de las glicoproteínas de mamíferos, los mismos también son reconocidos por MR, que en ese sentido es considerado un receptor de reconocimiento de patrones “no canónico” por reconocer tanto estructuras extrañas como

endógenas, siendo una pieza fisiológica importante en el clearance normal de proteínas. De hecho, se cree que sus ligandos - de bacterias, hongos, protozoos, e inclusive envolturas virales como la de HIV y DENV (Linehan et al., 2000) - comparten motivos de manosa con los oligosacáridos propios del organismo.

De los receptores nombrados, SR o algún TLR podrían, si bien no está demostrado, contar entre sus ligandos a los residuos de xilosa, iniciando la respuesta a xilomananos observada en macrófagos.

De los TLR, se conoce su cascada hasta la activación de genes de citoquinas proinflamatorias, vía factores de transcripción como NF- κ B o Jun. Un interrogante que queda planteado es si los xilomananos actúan vía algún TLR; en particular, TLR-2 y TLR-4 son afines a muchos heteropolisacáridos de plantas, siendo dos vías importantes a explorar en la elucidación del mecanismo activador, utilizando por ejemplo células knock-out para dichos receptores (Li et al., 2010). β -glucanos fúngicos, por ejemplo, se unen conjuntamente a Dectin-1 y TLR-2 para inducir activación de NF- κ B y la producción de citoquinas (Brown y Gordon, 2003).

La respuesta observada en ratones implica considerar no sólo receptores celulares, sino también elementos solubles en plasma, como la proteína de unión a manosa (MBL), que se une a superficies de microorganismos y genera la activación del complemento.

En cuanto a la protección contra HSV, es sabido que macrófagos llevan a cabo la mayor parte de acciones antiherpéticas en las primeras horas de infección (Ellerman-Eriksen, 2005), teniendo este tipo celular y sus secreción de citoquinas un papel central en la defensa del huésped. Más precisamente, en la primera ola de respuesta antiviral actúan TNF- α e IFN- γ , agregándose luego las especies reactivas de oxígeno y NO, que tiene un papel importante en la respuesta a HSV, aunque no a otros virus. Estos elementos permiten correlacionar lo hallado para N4 in vitro en la línea celular de macrófagos con las altas citoquinas proinflamatorias plasmáticas y la muy buena defensa antiviral de los animales. Es llamativa, sin embargo, la respuesta deficiente de los animales inyectados con F3, que provoca una concentración de TNF- α de casi el doble que N4, aunque no se puede descartar una excesiva respuesta inflamatoria contraproducente en dicho grupo.

Para finalizar, y como se desprende de la discusión, de los aportes generados en esta Tesis la acción de xilomananos sulfatados en el sistema inmune representa un tópico novedoso que deja planteados muchos interrogantes para futuras investigaciones. Por el contrario, la caracterización química de polisacáridos de *Nemalio helminthoides* así como la actividad antiviral de sus fracciones nativas y modificadas de los virus estudiados quedan descriptas, destacándose la acción en mucosa intranasal de los mananos sobresulfatados en infecciones con HSV-2. En este sentido, sería oportuno seguir evaluando sus alcances en vistas de una aplicación del conocimiento generado, respondiendo a los objetivos generales del proyecto de investigación en el cual se insertó la presente Tesis.

De los Resultados expuestos en las Secciones I y II se concluye principalmente que:

- ✓ El sistema de polisacáridos de pared celular del alga roja *Nemalion helminthoides* incluye mananos y xilomananos sulfatados, y xilanos neutros.
- ✓ Por medio de extracciones acuosas a 90 °C se obtienen con alto rendimiento polisacáridos de matriz, y dan productos de composición muy similar aislados por diálisis (23% de peso seco de alga) o por precipitación con isopropanol (28% de peso seco de alga).
- ✓ Los componentes mayoritarios de matriz de pared de *Nemalion helminthoides* son cadenas lineales de (1→3)- α -D-manopiranosas sustituidas con un grupo sulfato por cada ~ 4 monosacáridos, en C-4 ó C-6, con un mínimo de unidades disulfatadas. Las fracciones de mananos representan 15-20% del peso seco del material algal de partida y tienen un peso molecular promedio de 43 kDa.
- ✓ Componentes minoritarios de matriz son (1→3)- α -D-mananos ramificados con β -D-xilosa en C-2; con una ramificación en promedio por cada 4-5 manosas y un grupo sulfato, también en C-4 ó C-6, por cada 3-4 monosacáridos. Estos xilomananos son separables de los mananos por fraccionamiento en soluciones de diferente fuerza iónica, y su rendimiento en cuanto a peso seco del alga es de ~ 0,5 %; su peso molecular promedio es de 12-14 kDa.
- ✓ Como componentes de matriz se aíslan también xilanos neutros de uniones mixtas β -D-(1→3;1→4) de aproximadamente 6 kDa, con rendimientos de ~ 2 % en masa seca del alga.
- ✓ (1→4)- β -D-xilanos forman parte de la pared fibrilar de *Nemalion helminthoides*; estos componentes rígidos se extraen con NaOH 8,0%, condiciones en las que no se solubiliza celulosa.

- ✓ Se logran fracciones de mananos de alto grado de sulfatación (40-50%) por reacción con SO_3 -piridina, a 60 °C. Las posiciones favorecidas para la sulfatación son C-2 y C-6 y el nivel de sustitución es dependiente del tiempo de reacción.
- ✓ Por degradación de Smith se eliminan ramificaciones de xilosa a xilomananos sin afectar el esqueleto de (1→3)-manopiranosas, ni su grado de sulfatación.
- ✓ Los xilomananos N3 y N4 mostraron moderada acción antiviral contra HSV y DENV-2.
- ✓ Las ramificaciones de xilosa favorecen la actividad antiviral de N3 y N4.
- ✓ La sobresulfatación de los mananos, principalmente en C-2 y C-6, aumenta muy significativamente su actividad antiviral contra HSV y DENV-2 in vitro.
- ✓ El manano N6S-2h mostró efecto protector en una infección intranasal con HSV-2 en modelo murino.
- ✓ No se detectan alteraciones en el tiempo de coagulación en presencia de hasta 20 $\mu\text{g/mL}$ de los xilomananos N3 y N4.
- ✓ Los mananos sobresulfatados son anticoagulantes, por interferencia en el TTPA, a partir de 2 $\mu\text{g/mL}$.
- ✓ Los xilomananos mostraron ser inductores de la proliferación celular de linfocitos T (línea H9) y macrófagos murinos (línea RAW).
- ✓ Los xilomananos estimularon la activación de citoquinas proinflamatorias ($\text{TNF-}\alpha$, IL-6) tanto in vitro (macrófagos) como in vivo (vía intravenosa ratones BALB/c).
- ✓ La estimulación del sistema inmune innato por los xilomananos puede aumentar la capacidad de defensa antiviral hasta prevenir el desarrollo de la enfermedad, de acuerdo a lo observado en ratones BALB/c en una infección con HSV-2.

Citas bibliográficas

Abdala-Díaz, R., Chabrilón, M., Cabello-Pasini, A., Gómez-Pinchetti, J., Figueroa, F. (2011) Characterization of polysaccharides from *Hypnea spinella* (Gigartinales) and *Halopithys incurva* (Ceramiales) and their effect on RAW 264.7 macrophage activity. *J. Appl. Phycol.* 23, 523-528.

Abdala-Díaz, R., Chabrilón, M., Cabello-Pasini, A., Lopez-Soler, B., Figueroa, F. (2010) Effect of *Porphyridium cruentum* polysaccharides on the activity of murine macrophage cell line RAW 264.7. *Ciencias Marinas* 36, 345-353.

Acosta, E., Talarico, L. y Damonte, E.B. (2008) Review: Cell entry of dengue virus. *Future Virol.* 3, 471-479.

Adams, N.M., Furneaux, R.H., Miller, I.J. y Whitehouse, L.A. (1988) Xylan from *Leptosarca simplex* and carrageenans from *Iridea*, *Cenacrum* and *Nemastoma* species from the subantarctic islands of New Zealand. *Bot. Mar.* 31, 9-14.

Alban, S., Schauerte, G. Franz, G. (2002) Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydr. Polym.* 47, 267-276.

Allerhand, A. y Berman, E. (1984) Systematic approach to the analysis of carbon-13 NMR spectra of complex carbohydrates. 2. Application to the high mannose glycopeptides of hen ovoalbumin. *J. Am. Chem. Soc.* 106, 2400-2412.

Alveal, K. (1988) *Gracilaria* de Tubul: Historia y significado de un recurso. *Gayana (Bot.)* 45:119-140.

Aspinall, G. (1982) "Isolation and fractionation of polysaccharides". Capítulo 2 en *The polysaccharides Volumen 1*. Editorial Academic Press, Inc. pp 19-35.

Bishop, C. y Jennings, H. (1982) "Immunology of polysaccharides". Capítulo 6 en *The polysaccharides Volumen 1*. Editorial Academic Press, Inc. pp 19-35.

Björndal, H., Eriksson, K.E., Garegg, P.J., Lindberg, B y Swan, B. (1965) Studies on the xylan from the red seaweed *Rodhymenia palmata*. *Acta Chem. Scan.* 19, 2309-2315.

Brown, G. y Gordon, S. (2003) Fungal β -glucans and mammalian immunity. *Immunity* 19, 311-315.

Cardoso, M.A, Nosedá, M.D., Fujii, M.T., Zibetti, R.G.M. y Duarte, M.E.R., (2007). Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosum* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil. *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.

Carlucci, M.J., Ciancia, M., Matulewicz, M.C., Cerezo, A.S. y Damonte, E.B. (1999) Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral Res.* 43, 93-102.

Carlucci, M.J., Pujol, C.A., Ciancia, M., Nosedá, M.D., Matulewicz, M.C., Damonte, E.B. y Cerezo, A.S. (1997) Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *Int. J. of Bio. Macrom.* 20, 97-105.

Carlucci, M.J., Scolaro L.A., Nosedá M.D., Cerezo A.S., Damonte E.B. (2004). Protective effect of a natural carrageenan on genital herpes simplex virus infection in mice. *Antiviral Res.* 64, 137-141.

Caro, D., Matsuhira, B. y Urzúa, C. C. (1991) El polisacárido soluble de *Curdiae rakovitzae* Hariot. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 36:17-22.

Carpita, N.C. y Gibeaut, D.M. (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1-30.

Cerezo, A. S., Lezerovich, A., Labriola, R. y Rees, D.A. (1971) A xylan from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. *Carbohydr. Res.* 19, 289-296.

Cerezo, A. S. (1972) The fine structure of *Chaetangium fastigiatum* xylan: studies of the sequence and configuration of the (1→3)-linkages. *Carbohydr. Res.* 22, 209-211.

Ciancia, M. y **Cerezo, A. S.** (2010) D/L-Hybrid Galactans from Red Seaweeds: Do they really exist? Cap. 10 en "Handbook of Carbohydrate Polymers" editado por R. Ito y Y. Matsuo, Nova Science Publishers, Inc. New York.

Ciancia, M., **Nosedá, M.D.**, **Matulewicz, M.C.**, **Cerezo, A.S.** (1993) L-galactose containing galactans from the carrageenophyte *Gigartina skottsbergii*. *Phytochem.* 34; 1541-1543.

Ciucanu, I. y **Kerek, F.** (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 131, 209-217.

Craigie, J.S.(1990) Capítulo 10 « Cell walls » en *Biology of the Red Algae* de Cole, K.M. y Seath, R.G. (Editores) Cambridge University Press, Cambridge.

Chen, Y., **Maguire, T.**, **Hileman, R.E.**, **Fromm, J.R.**, **Esko, J.D.**, **Linhardt, R.J.** y **Marks, R.M.** (1997). Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* 3, 866-871.

Damonte, E., **Neyts, C.**, **Pujol, C.A.**, **Snoeck, R.**, **Andrei, G.**, **Ikeda, S.** **Witrouw, M.**, **Reymen, D.**, **Haines, H.**, **Matulewicz, M.C.**, **Cerezo, A.S.**, **Coto, C.E.** y **De Clercq, E.** (1994) Antiviral activity of a sulphated polysaccharide from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*. *Biochem. Pharm.* 47, 2187-2192.

Damonte, E.B., **Matulewicz, M.C.** y **Cerezo, A.S.** (2004) Review: Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. *Curr. Med. Chemistry* 11, 2399-2419.

Dodgson, K.S. y **Price, R.G.** (1962). A note on the determination of the ester sulphate content of sulphated polysaccharides. *Biochem. J.* 84, 106-110.

Dubois, M., **Gilles, K.A.**, **Hamilton, J.K.**, **Rebers, P.A.** y **Smith, F.** (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-366.

Ebringerová, A., Hromadková, Z. y Heinze, T. (2005) Hemicellulose. *Adv. Polym. Sci.* 186, 1-67.

Ellerman-Eriksen, S. (2005). Review: Macrophages and cytokines in the early defence against herpes simplex virus. *Virology Journal* 2:59.

Estévez, J. M., Ciancia, M., Rodriguez, M. C. y Cerezo, A. S. (2003) Ficocoloides de algas rojas (Rhodophyta): carragenanos, agaranos y DL-híbridos. *Investigaciones en Argentina. Bol. Soc. Argent. Bot.* 38 (1-2) 13-28.

Estévez, J. M., Ciancia, M. y Cerezo, A. S. (2004) The system of galactans of the red seaweed, *Kappaphycus alvarezii*, with emphasis of its minor constituents. *Carbohydr. Res.* 339, 2575-2592.

Falshaw, R., Furneaux, R.H. y Stevenson, D. E. (1998) Agars from nine species of red seaweed in the genus *Curdiea* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* 308, 107-115.

Feyzi, E., Trybala, E., Bergström, T., Lindahl, U. y Spillmann, D. (1997) Structural requirement of heparan sulfate for interactions with herpes simplex virus type I virions and isolated glycoprotein C. *J. Biol. Chem.* 272, 24850-24857.

Flores, M.L., Stortz, C.A., Rodriguez, M.C. y Cerezo, A.S. (1997) Studies on the skeletal cell wall and cuticle of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* Bory. *Bot. Mar.* 40, 411-419.

Fukuyama, Y., Kolender, A.A., Nishioka, H., Nonami, H., Matulewicz, M. C., Erra-Balsells, R. y Cerezo, A. S. (2005) “Matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4)-xylans from *Nothogenia fastigiata* using nor-harmane as matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 349-358.

Gazi, U. y Martínez-Pomares, L. (2009) Influence of the mannose receptor in host immune responses. *Immunobiology* 214, 554-561.

González, M. E., Alarcón, B. y Carrasco, L. (1987). Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1388-1393.

Grahan, L., Grahan, J. y Wilcox, L. Capítulo 16 “Red Algae” en libro *Algae*, segunda edición (2000) Editorial Benjamin Cummings.

Gretz, M.R., Sommerfeld, M.R. y Aronson, J.M. (1982) Cell wall composition of the generic phase of *Bangia atropurpurea* (Rhodophyta). *Bot. Mar.* 25, 529-535.

Haines, H., Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S. (1990) Sulfated galactans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata* (Nemaliales, Rhodophyta). *Hydrobiol.* 204/205, 637-643.

Haworth, W. N. (1915) A new method of preparing alkylated sugars. *J. Chem. Soc.* 107, 8-16.

Herold, B.C., Visalli, R. J., Susmarki, N., Brandt, C. R. y Spear, P. G. (1994) Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J. Gen. Virol.* 75, 1211-1222.

Hidari, K., Takahashi, N., Arihara, M., Nagaoka, M., Morita, K. y Suzuki, T. (2008). Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Bioch. and Bioph. Res. Com.* 376, 91-95.

Jiang, Z., Okimura, T., Yamaguchi, K., Oda, T. (2011) The potent activity of sulfated polysaccharide, ascophyllan, isolated from *Ascophyllum nodosum* to induce nitric oxide and cytokine production from mouse macrophage RAW 264.7 cells: Comparison between ascophyllan and fucoidan. *Nitric Oxide* 25, 407-415. .

Jiao, L., Li, X., Li, T., Jiang,, P., Zhang, L., Wu, M. y Zhang, L. (2009) Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. *Int. Immunopharm.* 9, 324-329.

Karnjanapratum, S. y You, S. (2011) Molecular characteristics of sulfated polysaccharides from *Monostroma nitidum* and their in vitro anticancer and immunomodulatory activities. *Int. J. of Biol. Macrom.* 48, 311-318.

Kim, J., Cho, M., Karnjanapratum, S., Shin, I. y You, S. (2011) In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. *Int. J. of Biol. Macromol.* 49, 1051-1058.

Knutsen, S. H. y Grasdalen, H. (1987) Characterization of Water-extractable Polysaccharides from Norwegian *Furcellaria lumbricaris* (Huds.) Lamour. (Gigartinales, Rhodophyceae) by IR and NMR Spectroscopy. *Bot. Mar.* 30, 497-505.

Kolender, A. A., Matulewicz, M. C. y Cerezo, A. S. (1995) Structural analysis of antiviral sulfated α -D-(1 \rightarrow 3)-linked mannans. *Carbohydr. Res.* 273, 179-185.

Kolender, A.A., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S. (1997) The system of sulfated α -(1 \rightarrow 3)-linked D-mannans from the red seaweed *Nothogenia fastigiata*: structures, antiherpetic and anticoagulant properties. *Carbohydr. Res.* 304, 53-60.

Kolender, A. A. (2003). Tesis Doctoral: Polisacáridos de *Nothogenia fastigiata* y *Georgiella confluens* (Rhodophyta). Nuevos métodos de análisis para polisacáridos de algas. Depto. Q.O., FCEyN, UBA.

Kovač, P. y Hirsch, J. (1980) ^{13}C -n.m.r. spectra of xylo-oligosaccharides and their application to the elucidation of xylan structures. *Carbohydr. Res.* 85, 177-185.

Lahaye, M., Yaphe, W. y Rochas, C. (1985) ^{13}C -n.m.r. spectral analysis of sulfated and desulfated polysaccharides of the agar. *Carbohydr. Res.* 143, 240-245.

Le Gall, L. y Saunders, G. W. (2007) A nuclear phylogeny of the Florideophyceae (Rhodophyta) inferred from combined EF2, small subunit y large subunit ribosomal DNA: Establishing the new red algal subclass Corallinophycidae. *Mol. Genetics and Evolution* 43, 1118-1130.

Lee, R.E. Libro: Phycology, tercera edición (2000) Editorial Cambridge University Press, Cambridge.

Lee, J., Ohta, Y., Hayashi, K. y Hayashi, T. (2010) Immunostimulating effects of a sulfated galactan from *Codium fragile*. *Carbohydr. Res.* 345, 1452-1454.

Leung, M. Y., Liu, C. Zhu, L.F., Hiu, Y.Z., Yu, B. y Fung, K. P. (2004) Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg. *Glycobiology* 14, 501-510.

Leung, M. Y., Liu, C., Koon, J.C., Fung, K.P. (2006) Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol. Lett.* 105, 101-114.

Leyon, P., Kuttan, G. (2004) Inhibitory effect of a polysaccharide from *Tinospora cordifolia* on experimental metastasis. *J. of Ethnopharm.* 90, 233-237.

Li, X., Xu, W. (2010) TLR4-mediated activation of macrophages by the polysaccharide fraction from *Polyporus umbellatus* (pers.) Fries. *J. of Ethnopharm* 135, 1-6.

Linehan, S., Martínez-Pomares, L. y Gordon, S. (2000) Review: Macrophage lectins in host defence. *Microbes and infection* 2, 279-288.

Liu, Q., Ross, N., Lanthier, P. y Reith, M. (1996) A gametophyte cell wall protein of the red alga *Porphyra purpurea* (Rhodophyta) contains four apparent polysaccharide-binding domains. *J. Phycol.* 32, 995-1003.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Maggs, C.A. y Poeschel, C.M. (1989) Morphology and development of *Ahnfeltia plicata* (Rhodophyta): proposal of Ahnfeltiales ord.nov. *J. of Phycology* 25, 333-351.

Maggs, C., Verbruggen, H. y de Clerck, O. (2007) “Molecular systematics of red algae: building future structures on firm foundations” en *Unravelling the algae: the past, present and future of algal systematics*. Juliet Brodie y Jane Lewis Editores. Natural History Museum, Londres.

Mandal, P., Pujol, C.A., Carlucci, M. J., Chattopadhyay, K, Damonte, E.B., Ray, B., 2008. Anti-herpetic activity of a sulfated xylomannan from *Scinaia hatei*. *Phytochemistry* 69, 2193-2199.

Mandal, P., Pujol, C.A., Damonte, E.B., Ghosh, T. y Ray, B., 2008. Xylans from *Scinaia hatei*: Structural features, sulfation and anti-HSV activity. *Int. J. of Biol. Macromol.* 46, 173-178.

Mantovani, M., Bellini, M., Angeli, J., Oliveira, R., Silva, A., Ribeiro, L. (2008) β -glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. *Mutation Res.* 658, 154-161.

Martinez, M. G. (2010) Tesis Doctoral: Estudio de las etapas tempranas de multiplicación del virus Junín. Depto QB, FCEyN, UBA.

Mateu, C.G. (2011) Tesis Doctoral: Polisacáridos y variantes del virus herpes simplex como herramientas en el esclarecimiento de la patogenia viral. Depto. QB, FCEyN, UBA.

Matsuhira, B., Rivas, P. y Lamba, D. (1992) Polisacáridos de fases nucleares de *Gracilaria chilensis*. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 37:89-95.

Matulewicz, M. C. (1995). Capítulo “Determinación estructural de polisacáridos de algas: Métodos químicos” en *Manual de Métodos Ficológicos* editado por Alveal. K., Ferrario, M. E., Oliveira, E.C. y Sar, M. E. Editorial Universidad de Concepción, Chile.

Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S. (1987a). Alkali-soluble polysaccharides from *Chaetangium fastigiatum*: Structure of a xylan. *Phytochemistry* 26, 1033-1035.

Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S. (1987b). Water-soluble sulfated polysaccharides from the red seaweed *Chaetangium fastigiatum*. Analysis of the system and the structures of the α -D-(1 \rightarrow 3)-linked mannans. *Carbohydr. Polym.* 7, 121-132.

Matulewicz, M. C., Cerezo, A.S., Jarret, R. y Syn, N. (1992). High resolution ^{13}C -n.m.r. spectroscopy of "mixed linkage" xylans. *Int. J. Biol. Macromol.* 14, 29-32.

Matulewicz, M.C. y Haines, H.H., Cerezo, A.S. (1994). Sulfated xylogalactans from *Nothogenia fastigiata*. *Phytochemistry* 36, 97-103.

McCandless, E. L, West, J. A. y Guiry, M. D. (1982) Carrageenans patterns in the Phylloporaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 10, 275-284.

McCandless, E. L, West, J. A. y Guiry, M. D. (1983) Carrageenans patterns in the Gigartinaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* 11, 175-182.

McGreal, E., Martínez-Pomares, L. y Gordon, S. (2004). Review: Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol. Immunol.* 41, 1109-1121.

McGreal, E., Juarez Carabajal, E., López González, J., Torres Rojas, M., Sada Díaz, E. (2009) Receptores de la inmunidad innata en procesos infecciosos pulmonares. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 22(4) 366-378

Morrison, I. M. (1988) Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid. *Phytochemistry* 27, 1097-1100.

Mukai, L.S., Craigie, J.S. y Brown, R.G.(1981) Chemical composition and structure of the cell walls of the conchocelis and thallus phases of *Porphyra tenera* (Rhodophyceae). *J. Phycol.* 17, 192-198.

Na, S., Kim, W., Kim, S., Park, J., Lee, S., Kim, A., Park, Y. (2010) Purification, characterization and immunostimulating activity of water-soluble polysaccharide isolated from *Capsosiphon fulvenscens*. *Int. Immunopharm.* 10, 364-370.

Nerinckx, W., Broberg, A., Duus, J., Ntarima, P., Parolis, L., Parolis, H. y Claeysens, M. (2004) Hydrolysis of *Nothogenia erinacea* xylan by xylanases from families 10 and 11. *Carbohydr. Res.* 339, 1047-1060.

Nunn, J.R., Parolis, H. y Russell, I. (1973) Polysaccharides of the red alga *Chaetangium erinaceum*. Part I. Isolation and characterization of the water-soluble xylan. *Carbohydr. Res.* 26, 169-180.

Painter, T. (1983) Capítulo 4 "Algal Polysaccharides" en *The polysaccharides Volumen 2.* Academic Press, Inc. pp 196-275.

Park, J. y Johnson, M. (1949). A submicrodetermination of glucose. *J. Biol. Chem.* 181, 149-151.

Pereira da Silva, B., de Medeiros Silva, G. y Parente, J. (2009) Chemical properties and adjuvant activity of galactoclucomannan from *Acrocomia aculeata*. *Carbohydr. Polym.* 75, 380-384.

Petruš, L., Gray, D.G. y BeMiller, J.N. (1995). Homogeneous alkylation of cellulose in lithium chloride/dimethyl sulfoxide with dimethyl sodium activation. A proposal for the mechanism of cellulose dissolution in LiCl/Me₂SO. *Carbohydr. Res.* 268, 319-323.

Pugh, N., Ross, S.A., ElSohly, H.N. y Pasco, D. S. (2001) Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Med.* 67, 737-742

Pujals, C. (1960) "Nemalion" ("Rhodophycophyta") género nuevo para la flora Argentina. *Darwiniana* tomo 12, n°1, 75-80.

Pujol, C. A., Estévez, J. M., Carlucci, J. M., Ciancia, M., Cerezo, A.S. y Damonte, E. B. (2002). Novel DL-galactan hybrids from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* are potent inhibitors of herpes simplex virus and dengue virus. *Antivir. Chem. Chemoter.* 13, 83-89.

Pujol, C.A., Carlucci, M. J., Matulewicz, M.C. y Damonte, E.B. (2007) Natural sulfated polysaccharides for the prevention and control of viral infections. *Top. Heterocycl. Chem.* 11, 259-281, en *Bioactive Heterocycles V*, Springer, Editor M. T. Khan.

Regueiro González JR, López Larrea C, González Rodríguez S, Martínez Naves E. *Inmunología, biología y patología del sistema inmune*. Editorial Medica Panamericana S.A, Tercera Edición, 2003. Madrid, España.

Rice, P., Lockhart, B., Barker, L., Adams, E., Ensley, H y Williams, D. (2004) Pharmacokinetics of fungal (1→3)-β-D-glucans following intravenous administration in rats. *Int. Immunopharm.* 4, 1209-1215.

Rostand, K.S. y Esko, J. D. (1997) Microbial adherence and invasion through proteoglycans. *Infect. Immunol.* 65, 1-8.

Saijo, S., Ikeda, S., Yamabe, K. et al. (2010) Dectin-2 recognition of α-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* 32, 681-691.

Saunders, G. W. y Hommersand, M. H. (2004) Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *Am. J. of Bot.* 91, 1494-1507.

Shea, E.M. y Carpita. N.C. (1988). Separation of partially methylated alditol acetates on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns. *J. Chromatogr.* 445, 424-428.

Schepetkin, I. A. y Quinn, M.T. (2006) Review: Botanical Polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int. Immunopharm.* 6, 317-333.

Schepetkin, I., Xie, G., Kirpotina, L., Klein, R., Jutila, M., Quinn, M. (2008) Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Opuntia polyacantha*. *Int. Immunopharm.* 8, 1455-1466.

Shuai, X., Hu, T., Liu, H., Su, Z., Zeng, Y., Li, Y. (2010) Immunomodulatory effect of a Sophora subprostrate polysaccharide in mice. *Int. J. of Biol. Macrom.* 46, 79-84.

Skoler-Karpoff, S., Ramjee, G., Ahmed, K. et al. (2008) Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 372, 1977-1987.

Spear, P.G. (1993) Entry of alphaherpesviruses into cells. *Semin. Virol.* 4, 167-180.

Spillmann, D. y Lindahl, U. (1994) Glycosaminoglycan-protein interactions – A question of specificity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4, 677-682.

Spillmann, D. Heparan sulfate: anchor for the viral intruders? (2001) *Biochimie* 83, 811-817. Editada por Société française de biochimie et biologie moléculaire, Elsevier

Stevenson, T.T. y Fourneaux, R.H. (1991) Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydr. Res.* 210, 277-298.

Stortz, C.A. y Cerezo, A. S. (2000) Novel findings in carrageenans, agaroids and “hybrids” red seaweed galactans. *Currents Topics in Phytochemistry* 4, 121-134.

Sun, H., Wang, H., Xu, H. y Ni, Y. (2009) Novel polysaccharide adjuvant from the roots of *Actinidia eriantha* with dual Th1 and Th2 potentiating activity. *Vaccine* 27, 3984-3991.

Sun, Z., Wei, K., Yan, Z., Zhu, X., Wang, X., Wang, H. Tang, Y., Sheng, P. y Zhu, R. (2011) Effect of immunological enhancement of aloe polysaccharides on chickens immunized with *Bordetella avium* inactivated vaccine. *Carbohydr. Polym.* 86, 684-690.

Takano, R., Yoshikawa, S., Ueda, T., Hayashi, K., Hirase, S. y Hara, S. (1996). Sulfation of polysaccharides with sulfuric acid mediated by dicyclohexylcarbodiimide. *J. Carbohydr. Chem.* 15 (4), 449-457.

Talarico, L., Pujol, C.A., Zibetti, R.G.M, Faría, P.C.S., Nosedá, M.D., Duarte, M.E.R. y Damonte, E.B. (2005) The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell. *Antiviral Res.* 66, 103-110.

Taylor, P., Gordon, S. y Martínez-Pomares, L. (2005). The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. *Trends Immunol.* 26, 104-110.

Thakur, M., Weng, A., Fuchs, H., Sharma, V. et al. (2012) Review: Rasayana properties of Ayurvedic herbs: Are polysaccharides a major contributor. *Carbohydr. Polym.* 87, 13-15

The Carraguard Phase II South Africa Study Team (2010) Expanded safety and acceptability of the candidate vaginal microbicide Carraguard® in South Africa. *Contraception* 82, 563-571.

Toffanin, R., Knutsen, S. H., Bertocchi, C., Rizzo, R. y Murano, E. (1994) Detection of cellulose in the cell wall of some red algae by ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 262, 167-171.

Turvey, J.R. y Williams, E.L. (1970) The structures of some xylans from red algae. *Phytochemistry* 9, 2383-2388.

Urbano, M. y Goñi, I. (2002) Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fibre. *Food Chem.* 76, 281-286.

Usov, A. (2011) Polysaccharides of the red algae. Review en *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* 65. Editorial Elsevier Inc.

Usov, A.I., Adamyants, K.S. y Yarotskii, S.V. (1975b). Polysaccharides of algae XVIII. Acetolysis of sulfated mannan from *Nemalion vermiculare* Sur. *Z. Obshch. Khim.* 45, 1377-1381.

Usov, A.I., Adamyants, K.S., Yarotsky, S.V., Anoshina, A.A. y Kochetkov, N.K., (1973). The isolation of a sulfated mannan and a neutral xylan from the red seaweed *Nemalion vermiculare* Sur. Carbohydr. Res. 26, 282-283.

Usov, A.I., Adamyants, K.S., Yarotskii, S.V. y Anoshina (1975a). Polysaccharides of algae XVI. Study of the structure of the sulfated mannan from the red alga *Nemalion vermiculare* Sur. Z. Obshch. Khim. 45, 916-921.

Usov, A.I., Bilan, M.I. y Shashkov, A.S. (1997). Structure of a sulfated xylogalactan from the calcareous red alga *Corallina pilulifera* P. et R. (Rhodophyta, Corallinaceae). Carbohydr. Res. 303, 93-102.

Usov, A.I. y Dobkina, I.M. (1988). Polysaccharides of algae XXXVIII. Polysaccharide composition of the red alga *Liagora* sp. and structure of the sulfated xylomannan. Bioorg.Khim. 14, 642-651.

Usov, A.I. y Dobkina, I.M. (1991). Polysaccharides of algae 43. A neutral xylan and a sulfated xylomannan from the red alga *Liagora valida*. Bioorg.Khim. 17, 1051-1058.

Usov, A.I., Yarotskii, S.V. y Vasyanina, L.K. (1975c). Synthesis and carbon-13 NMR spectra of methyl 3-O-methyl- α -D-mannopyranosidesulphates. Bioorg.Khim. 1, 1583-1588.

Usov, A. I., Yarotskii, S. V y Estévez, M. L. (1981) Polysaccharides of algae XXXII. Polysaccharides of the red seaweed *Galaxaura squalida* Kjellm. Bioorg. Khim 7, 1261-1268.

Usov, A. I., Yarotskii, S. V., Shashkov, A. S. y Tischenko, V. P. (1978) Polysaccharides of algae XXII. Polysaccharide composition of *Rhodymenia stenogona* Perest and the application of ^{13}C NMR spectroscopy to the determination of xylan structures. Bioorg. Khim. 4, 57-65.

Viana, A. G. (2005) Tesis Doctoral: Caracterização química de polissacarídeos neutros e sulfatados isolados de algas vermelhas e cinética química da reação de ciclização em falactanas sulfatadas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

Viana, A.G., Nosedá, M.D., Goncalves, A.G., Duarte, M.E.R., Yokoya, N., Matulewicz, M.C. y Cerezo, A.S. (2011) β -D-(1 \rightarrow 4), β -D-(1 \rightarrow 3) 'mixed linkage' xylans from red seaweeds of the order Nemaliales y Palmariales. *Carbohydr. Res.* 346, 1023-1028.

Vogl, H., Paper, D.H., Franz, G., 2000. Preparation of a sulfated linear (1 \rightarrow 4)- β -D-galactan with variable degrees of sulfation. *Carbohydr. Polym.* 41, 185-190.

Wasser, S. (2002) Review: Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microb. and Biotech.* 60, 258-274.

Wijesekara, I., Pangestuti, R. y Kim, S. (2011) Review : Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* 84, 14-21.

Witvrouw, M. y De Clercq, E. (1997) Review: Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmac.* 29, 497-511.

Xu, H., Wu, Y., Xu, S., Sun, H., Chen, F., Yao, L. (2009) Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the roots of *Actinidia eriantha*. *J. of Ethnopharm.* 125, 310-317.

Yang, T., Jia, M., Meng, J., Wu, H., Mei, Q. (2006) Immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Angelica sinensis*. *Int. J. of Biol. Macrom.* 39, 179-184.

Yoon, H.S., Muller, K.M., Seath, R.G., Ott, F.D. y Bhattacharya, D. (2004) Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *J of Phycol.* 42, 482-492.

Zhang, Y., Li, S., Wang, X., Zhang, L., Cheung, P. (2011) Review: Advances in lentinan: Isolation, structure, chain conformation and bioactivities. *Food Hydrocoll.* 25, 196-206.

Sitios Web consultados:

www.algaebase.org

www.unp.edu.ar/museovirtual/Algasmarinas/

www.soriano-sa.com.ar

<http://www.sbs.utexas.edu/utex/>

www.atlasdebuenosaires.gov.ar

www.fitomedicina.org