

Tesis Doctoral

# Polisacáridos del alga verde *Codium* vermilara: estructura fina, su ensamble en la pared celular. Actividad anticoagulante de un arabinano piranósico sulfatado

Fernández, Paula Virginia

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández, Paula Virginia. (2012). Polisacáridos del alga verde *Codium* vermilara: estructura fina, su ensamble en la pared celular. Actividad anticoagulante de un arabinano piranósico sulfatado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fernández, Paula Virginia. "Polisacáridos del alga verde *Codium* vermilara: estructura fina, su ensamble en la pared celular. Actividad anticoagulante de un arabinano piranósico sulfatado". 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 verde *Codium vermilara*:  
estructura fina, su ensamble en la pared celular.  
Actividad anticoagulante de un arabinano piranósico  
sulfatado.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el  
área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Paula Virginia Fernández**

Directores de tesis: Dra. Marina Ciancia  
Dr. José Manuel Estevez

Consejera de Estudios: Dra. Viviana Confalonieri

Lugar de trabajo: CIHIDECAR-CONICET, Departamento de Química Orgánica-FCEN;  
Cátedra de Biomoléculas-Departamento de Biología Aplicada y Alimentos-FAUBA.

Buenos Aires, 2012.

**Polisacáridos del alga verde *Codium vermilara*: Estructura fina, su ensamble en la pared celular. Actividad anticoagulante de un arabinano piranósico sulfatado.**

El alga verde cenocítica *Codium vermilara* desarrolla paredes celulares complejas, con una fase fibrilar compuesta por  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mananos que se ubican en una capa exterior y una interior de similar espesor, y una matriz central de polisacáridos sulfatados, incluyendo un arabinano y un galactano como componentes principales, y en menor medida un  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manano sulfatado que podría actuar como interfase con la parte neutra de la pared). El galactano es similar a los sintetizados por otras especies del género. Tienen enlaces  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3), grupos sulfato en C-4 y C-6 y acetales de ácido pirúvico en C-3 y C-4. El arabinano, altamente sulfatado y con uniones  $\beta$ -L-(1 $\rightarrow$ 3), constituye el primer reporte de un polisacárido compuesto por una cadena lineal de unidades de arabinopiranosas. Estos resultados permiten proponer un modelo completo de pared celular para esta macroalga verde.

El arabinano sulfatado presentó una importante actividad anticoagulante a través de al menos cuatro mecanismos: potenciación de antitrombina y de cofactor II de la heparina e inhibición directa de Factor Xa y de trombina. La inhibición directa de trombina involucra un mecanismo novedoso, donde la unión del polisacárido al exosítio 2 de la enzima provoca cambios en la geometría de su tríada catalítica.

Palabras clave: pared celular, alga verde, *Codium vermilara*, polisacáridos sulfatados, arabinano, galactano, manano, FTIR-Análisis de Componentes Principales, actividad anticoagulante, inhibición directa de trombina.

**Polysaccharides from green seaweed *Codium vermilara*: Fine structure, its arrangement in the cell wall. Anticoagulant activity of a pyranosic sulfated arabinan.**

Coenocytic green seaweed *Codium vermilara* develops complex cell walls, with a fibrillar phase composed by  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannans that form an outer and an inner layer of similar thickness, and a central matrix of sulfated polysaccharides, including arabinans and galactans as major components, and in minor quantities, a sulfated  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mannan that could act as an interphase with the neutral part of the wall). Galactans are similar to those synthesized by other *Codium* species. They present  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 3) linkages, sulfate groups on C-4 and C-6 and pyruvic acetals on C-3 and C-4. The highly sulfated arabinan, with  $\beta$ -L-(1 $\rightarrow$ 3) linkages, constitutes the first report of a polysaccharide built up by a linear chain of arabinopyranose units. These results allow us to postulate a complete model of cell wall arrangement for this green macroalga.

The sulfated arabinan showed important anticoagulant activity by at least four mechanisms of action: potentiation of antithrombin and heparin cofactor II and direct inhibition of Factor Xa and thrombin. Direct inhibition of thrombin takes place by an original mechanism involving binding of the polysaccharide to exosite 2 of the enzyme that promotes changes in the geometry of its catalytic triad.

Key words: cell wall, *Codium vermilara*, sulfated polysaccharides, arabinan, galactan, mannan, FTIR-Principal Component Analysis, anticoagulant activity, direct inhibition of thrombin.

## **Agradecimientos:**

A Marina Ciancia y José Estevez, por la oportunidad de aprender, la constancia, el empuje y la confianza.

A Irene Quintana, por el trabajo compartido, la generosidad y el entusiasmo.

A mis compañeros y compañeras de laboratorio: Cecilia Rodríguez, Florencia Basanta, Vanina Cosenza, Mercedes Pérez Recalde, Melissa Rabanal, Paula Arata, Juan Manuel Cabrera, Gloria Salato y Héctor Prado. Muy especialmente, a Andrea Ponce y Diego Navarro por la paciencia y la disposición a darme una mano siempre.

A Carlos Stortz, Cristina Matulewicz y Alberto Cerezo.

A Valeria Genoud, por toda su ayuda. A sus compañeras del Laboratorio de Hemostasia y Trombosis: Ana María Lauricella y María Julia Ugarriza.

A Martiniano Ricardi, Rodrigo González y Melina Velasquez, del Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, IFIByNE.

A Julio Caramelo, del IIBBA-Conicet/Fundación Instituto Leloir.

A Hugo Verli y Laercio Pol-Fachin, del Centro de Biotecnología, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

A mis compañeros y compañeras docentes de la Cátedra de Biomoléculas de la Facultad de Agronomía: Silvia Leicach, Hugo Chludil, Margarita Yaber-Grass, Norberto Sztarker, Beatriz Zuazo, Graciela Corbino, Elena Mongelli, Patricia Fernández, Celina Braccini, Mariano Paz. A los trabajadores no docentes de la cátedra: Lorena Lozada, Alberto Nigro, Luis Carrizo, Liliana González, Analía Dato y Lucía Barriga.

A Patricia Leonardi y Alicia Miravalles, de la Universidad Nacional del Sur.

A Eugenia Sar e Inés Sunesen, del Departamento de Ficología de la Universidad Nacional de La Plata, por la generosidad y el abrir puertas.

A mi familia, por el apoyo.

A Paula, por el amor. A Sabino, nuestro hijo.

A mi amiga Paula Pinkas, por crecer al lado mío. A mis amigos y amigas, por serlo.

A mis compañeras de la comparsa de candombe IyaKerere, porque compartiendo la alegría de la cultura popular en las calles siempre se olvida el cansancio del trabajo.

A los maestros y maestras comprometidos que tuve la suerte de tener en 30 años de Educación Pública.

## **Índice**

Resumen

Abstract

Agradecimientos

Introducción general	1
Publicaciones	2

### **1º PARTE – A. Pared celular de *Codium vermilara*. Estructura y componentes.**

Abreviaturas, siglas y expresiones	5
------------------------------------	---

#### **-Introducción**

##### **Capítulo 1 - Pared celular**

1.1. Generalidades: estructura y funciones, aspectos evolutivos	8
1.2. Aspectos químicos de la pared celular	9
1.3. Pared celular de algas	12

##### **Capítulo 2 - Algas verdes**

2.1. Características generales	14
2.2. Orden Bryopsidales	15
2.2.1. El género <i>Codium</i>	15

#### **-Experimental**

##### **Capítulo 3 - Estructura química de polisacáridos y glicoproteínas**

3.1. Obtención de los extractos y fraccionamiento de los polisacáridos de la pared celular de <i>Codium vermilara</i>	19
3.1.1. Origen y preparación del material	19
3.1.2. Obtención de los extractos	20
3.1.2.1. Extracción a temperatura ambiente	20
3.1.2.2. Extracción a 90 ° C	20
3.1.3. Fraccionamiento de los polisacáridos	20
3.1.3.1. Cromatografía de intercambio iónico	20
3.1.3.2. Precipitación por agitación en soluciones acuosas de cloruro de potasio	21
3.1.4. Tratamientos enzimáticos	21
3.1.4.1. Tratamiento con $\alpha$ -amilasa	21
3.1.4.2. Tratamiento con endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mananasa	22
3.1.4.2.1. Tratamiento enzimático sobre el residuo final RW2	22
3.1.4.2.1. Tratamiento enzimático <i>in situ</i>	22
3.2. Caracterización química	22
3.2.1. Determinación del contenido total de hidratos de carbono	22
3.2.1.1. Método de fenol-ácido sulfúrico	22
3.2.1.2. Adaptación para material insoluble	23
3.2.2. Determinación del contenido de sulfato	23
3.2.2.1. Método de Dodgson y Price	23

3.2.2.2. Cromatografía iónica isocrática	24
3.2.2.3. Microanálisis elemental	24
3.2.3. Determinación del contenido de proteínas	24
3.2.4. Determinación del contenido de ácidos urónicos	25
3.2.4.1. Método de Filisetti-Cozzi y Carpita; modificación al método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen	25
3.2.4.2. Adaptación para material insoluble	25
3.2.5. Determinación del contenido de ácido pirúvico	26
3.2.6. Determinación del contenido de aminoazúcares	26
3.2.7. Determinación del peso molecular	26
3.2.8. Cromatografía Gaseosa	27
3.2.8.1. Hidrólisis de los polisacáridos y reducción de monosacáridos a alditoles	28
3.2.8.1.1. Hidrólisis ácida total	28
3.2.8.1.2. Adaptación para material insoluble	28
3.2.8.1.3. Hidrólisis reductiva total	28
3.2.8.2. Obtención de acetatos de alditoles	29
3.2.8.2.1. Acetilación de los alditoles obtenidos por hidrólisis ácida total y posterior reducción	29
3.2.8.2.2. Acetilación de los alditoles obtenidos por hidrólisis reductiva total	29
3.2.9. Metilación de los polisacáridos	29
3.2.9.1. Hidrólisis y derivatización de los polisacáridos metilados	30
3.2.10. Desulfatación de los polisacáridos	30
3.3. Métodos espectroscópicos	31
3.3.1. Espectroscopía de masa acoplada a cromatografía gaseosa	31
3.3.2. Espectroscopía de infrarrojo FTIR	31
3.3.3. Espectroscopía de RMN	31
3.4. Determinación del poder rotatorio	32
<b>Capítulo 4 - Microscopía óptica y láser confocal: localización <i>in situ</i> de los componentes de la pared</b>	
4.1. Preparación del material	32
4.2. Tinciones histoquímicas	32
4.3. Inmunolocalización	33
4.4. Microespectroscopía SR-FTIR	34
<b><u>-Resultados</u></b>	
<b>Capítulo 5 - Pared celular de <i>Codium vermilara</i></b>	
5.1. Introducción	36
5.2. Consideraciones acerca del fraccionamiento	37
5.3. Fraccionamiento de los extractos y caracterización química de los componentes	38
5.3.1. Manano neutro (M).	38
5.3.2. Polisacáridos sulfatados	42
5.3.2.1. Introducción	42

5.3.2.2. Fraccionamiento de V1	42
5.3.2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico	43
5.3.2.2.2. Precipitación con cloruro de potasio	45
5.3.2.3. Fraccionamiento de W1	46
5.3.2.3.1. Cromatografía de intercambio iónico	46
5.3.2.3.2. Precipitación con cloruro de potasio	47
5.3.2.4. Galactano sulfatado (G1)	49
5.3.2.5. Arabinanos sulfatados	56
5.3.2.5.1. Arabinano sulfatado de V1 (A1)	56
5.3.2.5.2. Arabinano sulfatado de W1 (A2)	61
5.3.2.6. Manano sulfatado (MS)	63
5.4. Localización <i>in situ</i> de biomoléculas componentes de la pared	67
5.4.1. Manano neutro	67
5.4.2. Polisacáridos sulfatados	69
5.4.2.1. Tinción con Azul de <i>O</i> -Toluidina	69
5.4.2.2. Microespectroscopía SR-FTIR	70
5.4.3. Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs)	72
5.5. Modelo de pared propuesto	73
Resumen de los resultados 1º Parte-A	76

## **1º PARTE – B. Variabilidad de los componentes de la pared celular de *C.vermilara***

### **-Introducción**

#### **Capítulo 1 – Variabilidad de los componentes de la pared celular de *Codium vermilara***

1.1. Introducción	79
-------------------	----

### **-Experimental**

#### **Capítulo 2 – Caracterización de la pared celular y análisis de la variabilidad**

2.1. Recolección del material	83
2.2. Material utilizado para el análisis de la variabilidad química de la pared celular	83
2.3. Determinaciones químicas y espectroscopía de infrarrojo	84
2.3.1. Determinación del contenido de sulfato orgánico e inorgánico	84
2.3.2. Determinación del contenido de sulfato por microanálisis	85
2.4. Análisis estadístico	85
2.5. Espectroscopía de infrarrojo FTIR	85
2.6. Análisis de Componentes Principales (PCA)	85

### **-Resultados**

#### **Capítulo 3 - Variabilidad de la pared celular de *Codium vermilara***

3.1. Consideraciones generales	87
3.2. Validación del procedimiento	92
3.3. Variabilidad geográfica de la composición de la pared celular	98
3.4. Variabilidad temporal de la composición de la pared celular	101
3.4.1. Análisis de la pared celular total	101



3.4.2. Estimación del nivel de sulfato	104
3.4.3. Determinación total de sulfato	106
Resumen de los resultados 1° Parte-B	107
<b><u>-Discusión y Conclusiones (1° Parte A y B)</u></b>	109
<b><u>-Bibliografía (1° Parte A y B)</u></b>	122

## **2° PARTE. Actividad anticoagulante del arabinano piranósico de *C.vermilara***

Abreviaturas, siglas y expresiones	140
------------------------------------	-----

### **-Introducción**

#### **Capítulo 1 - Compuestos bioactivos de algas marinas**

1.1. Introducción	142
1.2. Actividad biológica de polisacáridos sulfatados	142
1.2.1. Aspectos generales	142
1.2.2. Polisacáridos sulfatados de algas verdes	144
1.2.3. Polisacáridos sulfatados del género <i>Codium</i>	144
1.2.3.1. Galactanos del género <i>Codium</i>	145
1.2.3.2. Arabinanos del género <i>Codium</i>	146
1.3. Generalidades sobre coagulación	146

### **-Experimental**

#### **Capítulo 2 – Análisis de la actividad anticoagulante del arabinano piranósico de *C.vermilara***

2.1. Ensayos generales de coagulación	157
2.1.1. Tiempo de Trombina (TT)	157
2.1.1.1. TT sobre plasma	157
2.1.1.2. TT sobre fibrinógeno	157
2.1.2. Tiempo de Protrombina (PT)	158
2.1.3. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (APTT)	158
2.1.4. Tiempo de Reptilasa (RT)	158
2.2. Ensayos amidolíticos	158
2.2.1. Inhibición directa de Trombina	158
2.2.2. Inhibición de Trombina mediada por AT	159
2.2.3. Inhibición de Trombina mediada por HCII	159
2.2.4. Inhibición directa de Factor Xa	159
2.3. Electroforesis	159
2.3.1. Geles de poliacrilamida, nativo	159
2.3.2. Geles de poliacrilamida, SDS	160
2.4. Espectroscopía	160
2.4.1 Espectroscopía de dicroísmo circular	160
2.4.2. Espectroscopía de fluorescencia	161
2.5. Acoplamiento molecular (docking) y simulación de la dinámica molecular	161
2.5.1. Acoplamiento molecular (docking)	161

2.5.2. Simulación de la dinámica molecular	162
<b><u>-Resultados</u></b>	
<b>Capítulo 3 - Actividad anticoagulante del arabinano piranósico de <i>C. vermilara</i>.</b>	
3.1. Introducción	165
3.2. Ensayos generales de coagulación	166
3.3. Ensayos amidolíticos con trombina para detectar inhibición directa	168
3.3.1. Trombina bovina	169
3.3.2. Trombina humana	170
3.4. Caracterización del complejo polisacárido-trombina humana	171
3.4.1. Espectroscopía de fluorescencia	171
3.4.2. Dicroísmo circular	173
3.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida	174
3.5. Acoplamiento molecular ( <i>docking</i> ) y modelado molecular	175
3.6. Ensayos amidolíticos en presencia de inhibidores fisiológicos de trombina	180
3.6.1. Inhibición de trombina mediada por AT	180
3.6.2. Inhibición de trombina mediada por HCII	181
3.7. Ensayos amidolíticos con Factor Xa para detectar inhibición directa	182
Resumen de los resultados 2º Parte	184
<b><u>-Discusión y Conclusiones (2º Parte)</u></b>	186
<b><u>-Bibliografía (2º Parte)</u></b>	199
<b>Conclusiones generales</b>	208
<b>Anexo I- FTIR</b>	210
<b>Anexo II- Secuencia extractiva y fraccionamiento</b>	211

## **Introducción general**

Este trabajo de Tesis se centra en la caracterización de las paredes celulares de macroalgas verdes marinas de la especie *Codium vermilara*, que crece sobre costas rocosas en aguas argentinas y de otras regiones templadas.

La 1° Parte se subdivide en:

A) Pared celular de *Codium vermilara*. Estructura y componentes: se describe el fraccionamiento y purificación de los componentes principales de la pared (manano fibrilar y polisacáridos sulfatados de matriz celular: galactano, arabinano y manano) y su caracterización química. Además, se presenta la localización *in situ* y el ensamble de esos componentes en la estructura de la pared. La metodología utilizada incluye: técnicas cromatográficas (intercambio iónico, gaseosa), precipitación con KCl, determinaciones químicas colorimétricas, espectroscopía de masa y FTIR, tratamientos enzimáticos, microscopía óptica y confocal con técnicas histoquímicas y de inmunomarcación y mapeo por microespectroscopía SR-FTIR, entre otras.

B) Variabilidad de los componentes de la pared celular de *Codium vermilara*: se analiza la variabilidad geográfica y temporal en los componentes de la pared celular, en base a muestras procedentes de tres localidades diferentes, y de ocho muestreos realizados en una de ellas a lo largo de dos años. La metodología involucrada en esta parte incluye determinaciones químicas y espectroscopía FTIR asociada a técnicas estadísticas de compresión de datos (Análisis de Componentes Principales).

La 2° Parte: Actividad anticoagulante de un polisacárido sulfatado de *Codium vermilara* describe la importante actividad anticoagulante del arabinano altamente sulfatado obtenido de las paredes celulares de *C. vermilara*. Se evaluó su actividad mediante pruebas globales de coagulación, para luego ahondar en sus mecanismos de acción y la interacción con distintas proteínas que forman parte de dicho proceso. Esto se realizó mediante ensayos amidolíticos, electroforesis en geles de poliacrilamida, espectroscopía de dicroísmo circular y de fluorescencia y simulación de la dinámica molecular.

Los resultados expuestos en esta Tesis dieron lugar a los siguientes artículos:

-“Cell wall polymers arrangements in the coencocytic seaweed *Codium vermilara*” **P.V.Fernández**, M.Ciancia, A.B.Miravalles, J.M.Estevez. *Journal of Phycology* 46: 456–465, 2010.

-“Cell wall variability in the green seaweed *Codium vermilara* (Bryopsidales, Chlorophyta) from Argentine coast.” **P.V.Fernández**, M.Ciancia, J.M.Estevez. *Journal of Phycology* 47:802-810, 2011.

-“A sulfated  $\beta$ -D-mannan from green seaweed *Codium vermilara*.” **P.V.Fernández**, J.M.Estevez, S.A.Cerezo, M.Ciancia. *Carbohydrate Polymers*. 87(1):916-919, 2012.

-“Anticoagulant activity of a unique sulfated pyranosic (1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -L-arabinan through direct interaction with thrombin” **P.V.Fernández**, I.Quintana, A.S.Cerezo, J.J.Caramelo, L.Pol-Fachin, H.Verli, J.M. Estevez, M.Ciancia. Enviado al *Journal of Biological Chemistry*, Febrero 2012.

Durante la realización de esta Tesis también se trabajó con el alga verde *Codium fragile*. Los resultados que se mencionan en este trabajo fueron publicados en el siguiente artículo:

-“Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the complex cell walls from the coenocitic green alga *Codium fragile*” J.M.Estevez, **P.V.Fernández**, L. Kasulin, P. Dupree, M.Ciancia. *Glycobiology* 19(3):212-228, 2009.

## 1° PARTE

**A) Pared celular de *Codium vermilara*.**

**Estructura y componentes.**

**B) Variabilidad de los componentes de la  
pared celular de *Codium vermilara***

1° PARTE - A

**Pared celular de *Codium vermilara*.**

**Estructura y componentes.**

## Abreviaturas, siglas y expresiones utilizadas en esta parte:

Ara: arabinosa

Man: manosa

Gal: galactosa

Ram: ramnosa

Fuc: fucosa

Glc: glucosa

Xil: xilosa

AT: azúcares totales

AT:SO<sub>3</sub>Na : relación molar entre azúcares totales y sulfato expresado como SO<sub>3</sub>Na

Gal:Ara: relación molar entre galactosa y arabinosa

HRGP: glicoproteína rica en hidroxiprolina

AGP: arabinogalactano proteína

IR: infrarrojo

FTIR: espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

DEAE: dietil amino etil

RMN: resonancia magnética nuclear

PCA: análisis de componentes principales

PC1: componente principal Nro 1

PC2: componente principal Nro 2

MWCO: corte de peso molecular

A1: arabinano sulfatado del extracto acuoso a temperatura ambiente de *Codium vermilara*

A1D: arabinano A1 desulfatado

A2: arabinano sulfatado del extracto acuoso a 90° C de *Codium vermilara*

G1: galactano sulfatado de *Codium vermilara*

G1D: galactano G1 desulfatado

M: manano fibrilar de *Codium vermilara*

MS: manano sulfatado de *Codium vermilara*

PS: polisacárido sulfatado

BA: Bahía Arredondo

SAO: San Antonio Oeste

LF: La Farola

DE: desvío estándar  
ST: sulfotransferasa  
SH: sulfhidrolasa  
GT: glicosiltransferasa  
GAG: glicosaminoglicano  
CesA: celulosa sintasa  
Csl: enzima tipo celulosa sintasa  
CAZy: enzimas activas hacia carbohidratos  
UDP: uridín difosfato  
UDP-GlcA: uridín difosfato-ácido glucurónico  
UDP-Xil: uridín difosfato-xilosa  
UDP-Arap: uridín difosfato-arabinopiranososa  
UDP-Araf: uridín difosfato-arabinofuranosa  
PAPS: 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato  
HG: homogalacturonano  
RGI: ramnogalacturonano de tipo I  
RGII: ramnogalacturonano de tipo II  
TFA: ácido trifluoroacético  
MMB: complejo metilmorfolina borano  
DMSO: dimetil sulfóxido  
FID: detector de ionización de llama  
SDS: dodecil sulfato de sodio  
CW: blanco de calcofluor



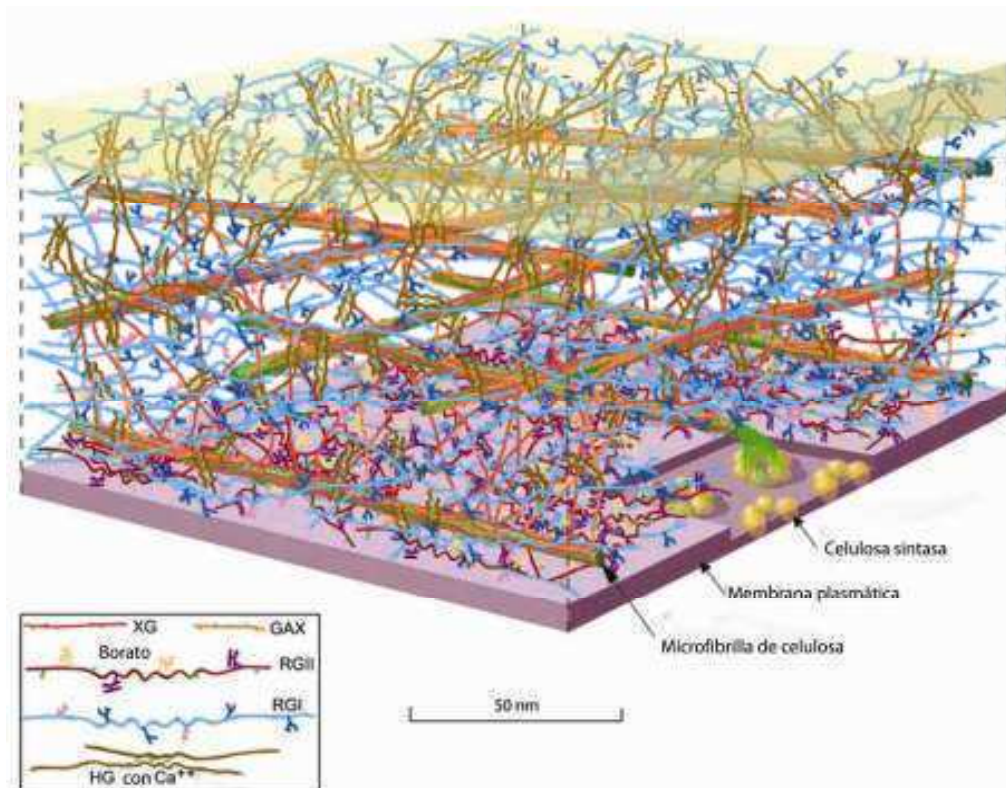
# **INTRODUCCIÓN**

## Capítulo 1 - Pared celular.

### 1.1. Generalidades: estructura y funciones, aspectos evolutivos

La pared celular es una estructura sumamente compleja y dinámica (Somerville et al., 2004; **Figura 1**). Sus principales funciones, las más reconocidas y estudiadas tradicionalmente, son el dar forma y sostén a las células, determinando así los distintos tipos celulares que conforman tejidos y órganos (Keegstra, 2010), y en parte también la morfología del organismo. A través de la pared, las células vegetales son capaces de afrontar las fuerzas de gravedad, tensión y compresión, así como la presión osmótica proveniente de su propio interior (Burton et al., 2010). Otros aspectos de su función estructural se relacionan con la adhesión celular y la porosidad o permeabilidad de las células. En algunos casos constituye además una fuente de energía metabolizable, y ha sido relacionada con numerosos procesos como la protección ante patógenos, reconocimiento, señalización (generalmente asociado a la pérdida de integridad de la pared), crecimiento y morfogénesis (Pilling y Höfte, 2003; Somerville et al., 2004; Cosgrove, 2005; Burton et al., 2010; Keegstra, 2010). Se cree que las paredes celulares de eucariotas habrían evolucionado por transferencia lateral a partir de organismos procariotas productores de pared (Niklas, 2004; Popper y Tuhoy, 2010)

Los principales componentes de la pared celular son polisacáridos, junto con glicoproteínas y lignina (Somerville et al., 2004). Si bien suelen distinguirse dos tipos de paredes (primaria y secundaria) la variabilidad en la composición entre tipos celulares es tal que entre estos extremos existe un continuo de paredes especializadas (Keegstra, 2010), y en la práctica es difícil establecer cuándo se pasa de un tipo de pared al otro (Burton et al., 2010). En términos generales, la pared primaria de las plantas superiores está formada por una estructura fibrilar de celulosa embebida en una matriz de polisacáridos que combina hemicelulosas y pectinas; mientras que la lignina es el polímero que caracteriza a las paredes secundarias, junto con grandes cantidades de celulosa. La pared primaria se encuentra en células en expansión (o que al menos conservan su capacidad de crecimiento), y la secundaria se desarrolla en células que pierden esa capacidad ya que se han diferenciado completamente y especialmente en ciertos tipos celulares con funciones estructurales como las fibras, y de transporte, como los elementos conductores del xilema.



**Figura 1-** Modelo molecular a escala de la pared celular de una hoja de *Arabidopsis*. La cantidad de cada polímero se basa en su razón respecto del contenido de celulosa. La cantidad de celulosa representada es menor a la real, para mayor claridad del esquema. XG: xiloglucanos, GAX: glucuronoarabinosilanos, RGII: ramnogalacturonano II, RGI: ramnogalacturonano I, HG: homogalacturonano. Tomado de Somerville et al., 2004.

## 1.2. Aspectos químicos de la pared celular

La celulosa, componente común a la pared de la mayoría de las plantas, consiste en acadenas lineales de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucanos que forman microfibrillas estableciendo interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno inter e intramoleculares. Si bien la estructura química fundamental es esencialmente la misma, se encuentra una cierta variabilidad en el largo de las cadenas de celulosa y en su grado de cristalinidad (Burton et al., 2010).

Por el contrario, los componentes no celulósicos de la pared (es decir, hemicelulosas y pectinas) son estructuralmente más complejos y presentan una gran heterogeneidad a

diferentes niveles (órgano, tejido, célula, molécula). Esta variabilidad estructural se vincula con una diversidad en las paredes celulares que es también evolutiva y ambiental, y está íntimamente relacionada con las funciones que cumplen esas paredes. De la diversidad encontrada en estos componentes puede interpretarse, siguiendo a Burton y colaboradores (2010), que se han desarrollado diferentes estrategias químicas para alcanzar las propiedades físico-químicas requeridas por la matriz de la pared para cumplir sus funciones. Estas estrategias consisten principalmente en la introducción de cierta “irregularidad controlada” sobre estructuras de polisacáridos regulares, con el fin de evitar su tendencia a la agregación. De este modo, con el agregado de mono u oligosacáridos como cadenas laterales sobre las cadenas principales, se generan zonas donde las interacciones intermoleculares se ven impedidas combinadas con otras zonas no sustituidas que permiten la unión a través de interacciones intermoleculares localizadas. Esto permite la formación de geles, es decir redes tridimensionales de polisacáridos con segmentos libres en solución y otros involucrados en estructuras del tipo cristalinas (Kloareg y Quatrano, 1988).

Los mecanismos biosintéticos que originan la diversidad observada en las paredes celulares son sólo parcialmente conocidos. En general, se cree que involucran enzimas, llamadas glicosiltransferasas (GT), que suman residuos glicosilo a partir de los correspondientes donores azúcar-nucleótido a una cadena polimérica en elongación (Burton et al., 2010). Las GT se han clasificado en la base de datos CAZY (*Carbohydrate active enzymes*, enzimas con actividad hacia carbohidratos) de acuerdo a las familias de genes que las codifican y a los productos de las reacciones que catalizan (Scheible y Pauly, 2004). Probablemente la clase de GT mejor conocida corresponda a las codificadas por la familia de genes CESA (por *cellulose synthase*), responsables de la síntesis de celulosa en la membrana plasmática. En Charophytas y plantas superiores estas enzimas se agrupan en complejos de treinta y seis unidades formando rosetas de donde surgen las microfibrillas de celulosa (Sarkar et al., 2009). Las enzimas GSL (*glucan synthase like*) responsables de la síntesis de calosa (un  $\beta$ -(1→3)-glucano) también actúan en la membrana plasmática. Por otro lado, la superfamilia Csl (por *cellulose synthase like*) agrupan las subfamilias de genes que codifican GT involucradas en la síntesis de los esqueletos de polisacáridos no celulósicos, que a diferencia de la celulosa se producen en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Algunas de estas subfamilias son comunes a todas las plantas, mientras que otras sólo se encuentran

en ciertos grupos (Lerouxel et al., 2006). La subfamilia CSLA se relaciona con la síntesis de mananos y glucomananos y CSLC lo hace con los xiloglucanos, mientras que en el caso de CSLF y más recientemente CSLH (Doblin et al., 2009), se las vincula con los  $\beta$ -(1→3)/ $\beta$ -(1→4) glucanos característicos de las gramíneas. Para las restantes subfamilias (CSLB, D, E y G), predichas por similitud de secuencias, aun no se han determinado funciones (Lerouxel et al., 2006). Por último, otro tipo de GT serían las responsables de la síntesis de pectinas, así como de agregar mono- u oligosacáridos como sustituyentes de las cadenas principales (Burton et al., 2010). Algunos aspectos clave del proceso de biosíntesis de los polisacáridos de pared celular son aun desconocidos, como por ejemplo los mecanismos de iniciación y terminación de la síntesis de una cadena, el rol de las hidrolasas que se encuentran presentes en sitios donde al mismo tiempo hay síntesis y deposición de polisacáridos de pared, o qué tan precisa es la adición de sustituyentes sobre el esqueleto de un polímero ramificado (Burton et al., 2010).

Las hemicelulosas, también llamadas glicanos de entrecruzamiento, son un grupo heterogéneo de polisacáridos no cristalinos, con una estructura básica del tipo  $\beta$ -(1→4). Se trata de polisacáridos que se extraen de la pared en medio alcalino, de menor peso molecular que la celulosa y alto grado de ramificación, que establecen puentes de hidrógeno con las microfibrillas de celulosa, manteniéndolas unidas entre sí. Las principales hemicelulosas son los xiloglucanos (en dicotiledóneas y gimnospermas), glucuronoarabinoxilanos (principalmente en gramíneas, aunque también en dicotiledóneas),  $\beta$ -(1→3)/ $\beta$ -(1→4)-glucanos (característicos de gramíneas) y galactomananos (en semillas de leguminosas).

Las pectinas incluyen polisacáridos muy ramificados y con la posibilidad de hidratarse gracias a la presencia de cargas negativas, aportadas por cantidades variables de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico. Se extraen de la pared con agua a alta temperatura o con agentes quelantes de  $\text{Ca}^{++}$ , y regulan la porosidad, el balance iónico y el pH de la pared, así como la adhesión entre células, dada su abundancia en la lámina media. Además se las relaciona con procesos de reconocimiento y detección de agentes patógenos y simbiontes. El componente más simple y abundante de las pectinas es el homogalacturonano (HG), polímero lineal de ácido  $\alpha$ -D-galacturónico unido por enlaces (1→4). El ramnogalacturonano I (RGI) consiste en una repetición del disacárido [→4)-

$\alpha$ -D-GalA-(1→2)- $\alpha$ -L-Rha-(1→)], con ramificaciones de unidades de arabinosa y/o galactosa sobre la ramnosa. El ramnogalacturanano II (RGII), componente minoritario y mucho más complejo, posee un esqueleto formado por unidades de  $\alpha$ -D-(1→4)-GalA al igual que HG, pero con patrones de sustitución muy complejos que incluyen hasta 12 monosacáridos diferentes y 22 tipos de uniones glicosídicas (Harholt et al., 2010). Además, suele estar presente como dímeros cuya formación está mediada por la presencia de iones borato. RGII no ha sido detectado en algas verdes y parece ser una innovación ocurrida en el linaje de las plantas terrestres, donde es ubicuo, y su estructura se encuentra muy conservada (Popper y Tuohy, 2010).

Las razones para abordar el estudio de la pared celular son variadas: desde el interés en los aspectos evolutivos de su diversidad y su rol fisiológico en los distintos grupos de organismos hasta las numerosas aplicaciones, actuales o potenciales, relacionadas con sus componentes: biomasa para la producción de etanol y otros biocombustibles, fibra dietaria debido a los beneficios que su consumo representa para la salud humana (Burton et al., 2010), y otras aplicaciones industriales como la producción de hidrocoloides. En el caso de las algas marinas, se suma la posibilidad de obtener compuestos bioactivos de variada aplicación a partir de polisacáridos sulfatados.

### 1.3. Pared celular de algas

Al igual que en las plantas y demás organismos que producen una pared celular, en las algas esta estructura está formada por una fase cristalina o fibrilar y una fase amorfa o matriz. De acuerdo a la literatura sobre el tema, la particularidad en las algas marinas es que la matriz predomina sobre la primera fase, y que los componentes aniónicos son más abundantes que los neutros (Kloareg y Quatrano, 1988). Sin embargo, esto no parece ser válido en el caso de las paredes celulares del género *Codium* (o al menos en las especies estudiadas por nuestro grupo de investigación: *C.vermilara* y *C.fragile*). De cualquier modo, resulta claro que los polisacáridos aniónicos de la matriz (principalmente sulfatados, aunque también carboxilados) deben cumplir algún rol específico de importancia relacionado con el entorno marino.

La fase cristalina se compone de polisacáridos neutros lineales. Las Chlorophyta presentan la mayor diversidad en esta porción de la pared, a nivel de subclase, género,

especie y también de generaciones, debido al fenómeno llamado “alternancia bioquímica de generaciones”, por el cual las fases esporofítica y gametofítica de algunas algas sintetizan paredes de composición completamente diferente. En unos pocos grupos de algas verdes (Siphonocladales, Cladophorales, Chlorococcales) se encuentra verdadera celulosa, en proporciones similares a las que se observan en plantas superiores. En la mayoría de los grupos que producen polisacáridos tipo celulosa como componente fibrilar de pared, su porcentaje es menor y su hidrólisis da además otros monosacáridos, como xilosa (Kloareg y Quatrano, 1988). Las microfibrillas de celulosa de algas pueden alcanzar dimensiones mayores que las de plantas (30 nm de ancho contra 4-10 nm) y ser más cristalinas (Cosgrove, 1997). Otros órdenes, como las Caulerpales, sintetizan  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-xilanos muy cristalinos. Por último, las células adultas de Codiales y Dasycladales producen  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-mananos. También las algas rojas tienen como componentes fibrilares mananos y xilanos, mientras que en algas pardas sólo se encuentra celulosa.

En la matriz de las paredes celulares de las Rhodophyta predominan los galactanos sulfatados (carragenanos o agar, según la configuración y naturaleza de los residuos y enlaces), y en las algas pardas los fucanos y el alginato (que alterna unidades de ácidos manurónico y gularónico). También en el caso de la matriz se encuentran numerosos casos de diferencias bioquímicas en la pared entre las generaciones de una misma especie. La fase amorfa de las algas verdes, compuesta por heteropolisacáridos sulfatados ramificados con un rango de peso molecular de  $10^5$ - $10^6$ , presenta una variabilidad similar a la que se encuentra en las pectinas y hemicelulosas de plantas (Kloareg y Quatrano, 1988), y fue clasificada en dos grupos principales (Percival y McDowell, 1981): glucuronoxiloramnanos y glucuronoxiloramnogalactanos por un lado, y xiloarabinogalactanos por el otro. Los polisacáridos del género *Codium* se ubican en este último grupo. La **Tabla 1** resume los resultados de los principales trabajos que han encarado el estudio de los polisacáridos componentes de la pared celular de algas del género *Codium*, realizando la caracterización estructural de los mismos.

**Tabla 1.** Caracterización estructural de componentes presentes en extractos y fracciones de pared celular de algas del género *Codium*

Especie - Referencia	Procedimiento de obtención	Características químicas
<i>C. fragile</i> Love y Percival, 1964	Extracción con agua a T ambiente y 90° C; tratamiento con $\alpha$ -amilasa, cromatografía de intercambio iónico; hidrólisis ácida parcial.	Arabinogalactano sulfatado; Galp enlazadas por C-3, con sulfato en C-4 y/o C-6; Arap con sulfato en C-2 o C-3; ácidos urónicos y proteínas.
<i>C. fragile</i> Nika et al., 2003	Extracción con agua fría ; cromatografía de intercambio iónico.	Polisacárido de bajo peso molecular, $\beta$ -Galp parcialmente sulfatado en C-6; presencia de Arap y ácido pirúvico.
<i>C. fragile</i> Ohta et al., 2009	Extracción con agua a 100° C; cromatografías de intercambio iónico y permeación de geles.	Galactano piruvilado parcialmente sulfatado en C-4, con unidades enlazadas por C-3 y ramificaciones en C-6 con unidades de 3,4-Pir Galp.
<i>C. fragile</i> var. <i>novae-zelandiae</i> Ciancia et al., 2007	Extracción con agua T ambiente y 90° C; cromatografía de intercambio iónico.	Arabinogalactano sulfatado piruvilado con unidades de Galp unidas por C-3 y también por C-6; sulfato en C-4 y también en C-6; piruvato en C-3 y C-4 de unidades Galp terminales. Unidades de Arap sulfatadas en C-2 y/o C-4; proteínas.
<i>C. vermilara</i> Ciancia et al., 2007	Extracción con agua a T ambiente y 90° C	Similar a <i>C. fragile</i> var. <i>novae-zelandiae</i> , pero con mayores cantidades de arabinosa y sulfato.
<i>C. yezoense</i> Bilan et al., 2007	Extracción con agua a T ambiente; cromatografía de intercambio iónico	Galactano piruvilado sulfatado con unidades enlazadas por C-3 y también por C-6; sulfato en C-4 y C-6; piruvato en C-3 y C-4 de unidades de Galp terminales.
<i>C. isthmocladum</i> Farias et al., 2008	Extracción a pH 8 y 60° C; digestión proteolítica; precipitación con acetona; cromatografía de intercambio iónico.	Galactano piruvilado sulfatado, unidades enlazadas por C-3, sulfato en C-4, predominantemente lineal; presencia de unidades enlazadas por C-6 con sulfato en C-4, otras disulfatadas en C-4 y C-6 y terminales piruviladas en C-3 y C-4.

Adaptado de Ciancia et al., 2010.

## Capítulo 2 - Algas verdes

### 2.1. Características generales

Según Lewis y McCourt (2004) el término *alga* carece de sentido filogenético por sí mismo, y tanto este concepto general como el más particular de *alga verde* son difíciles



de definir de forma tal que se excluyan otros organismos filogenéticamente relacionados pero que no son algas verdes. No obstante, suele delimitarse a las algas verdes, agrupadas en la división Chlorophyta, por la presencia de clorofila a y b en cloroplastos rodeados por una doble membrana y almidón como polisacárido de reserva, que se almacena en plástidos. Estas dos características son compartidas con las embriofitas (McCourt, 1995). Se trata de uno de los grupos de eucariotas más diverso desde el punto de vista morfológico, incluyendo algas unicelulares flageladas o cocoides, filamentosas simples o ramificadas y macroalgas de gran complejidad y tamaño. Se las encuentra principalmente en aguas dulces, también en ambientes marinos, así como en suelos y formando parte de asociaciones simbióticas o como epifitas. Se estima que abarca unas 10000 especies, agrupadas en 600 géneros. La clasificación de las algas verdes ha sido revisada siguiendo criterios morfológicos, bioquímicos y más recientemente desde el enfoque de la sistemática molecular (Lewis y McCourt, 2004).

Entre las algas verdes marinas bentónicas, Boraso de Zaixso (2004) menciona sesenta y siete especies que se encuentran en el litoral argentino, incluidas en las clases Chlorophyceae y Ulvophyceae.

## **2.2. Orden Bryopsidales**

El orden Bryopsidales (que también puede encontrarse descripto bajo los nombres de Siphonales, Caulerpales o Codiales) reúne algas con talos filamentosos cenocíticos, es decir, multinucleados. Los filamentos, que pueden ser fotosintéticos o no, contienen un volumen de citoplasma sin subdivisiones, donde se encuentran gran cantidad de núcleos y organelas. Además de *Codium*, otros géneros representativos del orden en nuestras costas son *Bryopsis*, *Derbesia* y *Lambia* (Boraso de Zaixso, 2004).

### **2.2.1. El género *Codium***

El género *Codium*, con unas 150 especies, fue descrito originalmente por Stackhouse en el año 1797. Se caracteriza por talos multiaxiales formados por numerosos filamentos cenocíticos, con una médula incolora y una empalizada externa de ramas de crecimiento determinado, o utrículos (Boraso de Zaixso, 2004). Estos talos pueden adquirir distintas morfologías (erectos, cerebroides o pulvinados). Los gametofitos son dioicos, llevando

sobre los utrículos gametangios fusiformes o cilíndricos, en cuya base se forman engrosamientos anulares de la pared. Producen meiogametas biflageladas, anisógamas, y la cigota se desarrolla directamente en un nuevo gametofito. En la Argentina, este género está representado por cuatro especies: *C. vermilara*, *C. fragile*, *C. decortdatum* y *C. subantarcticum*.

Especies del género han sido usadas como modelo en estudios de fisiología, ecofisiología y acumulación de metales pesados (Trowbridge, 1998). Se lo considera además un género con potencial como modelo en estudios de evolución y especiación marina, debido a su amplia distribución, en todo el mundo y en ambientes muy diversos donde se lo encuentra en variadas formas (Verbruggen et al., 2007). En particular, *Codium fragile* ssp *tomentosoides* ha sido foco de atención en las últimas dos décadas debido a que se la considera la principal alga invasiva a nivel mundial, cuya dispersión se vincula con actividades de acuicultura.

La sistemática del género, donde se reconocen dos subgéneros y cinco secciones, ha sido revisada en varias ocasiones, en relación a problemas de delimitación entre especies. Recientemente, Verbruggen y colaboradores (2007) determinaron mediante un estudio filogenético molecular la existencia de 74 “unidades evolutivas significativas”, que no necesariamente coinciden con las especies delimitadas a partir de criterios morfológicos.

En la especie *Codium vermilara* (Olivi) Chiaje los talos son erectos, ramificados hasta ocho veces y más pequeños que los de otras especies del género (hasta 16 cm). Los utrículos, sin mucrón, presentan pelos de hasta 3 mm de largo (**Figura 1**). También sobre los utrículos se desarrollan los gametangios fusiformes, generalmente uno por utrículo (Boraso de Zaixso, 2004). En cuanto al ciclo de vida, los talos maduros son haploides; los gametangios producen gametas femeninas que generan nuevos talos haploides en forma partenogenética (Miravalles, 2008).



**Figura 1-** Izquierda: aspecto general de un talo de *C. vermilara*, de ~ 9 cm de longitud .  
Derecha: utrículo del talo de *C. vermilara*. Escala: 150  $\mu$ m.

## **EXPERIMENTAL**

### **Capítulo 3 - Estructura química de polisacáridos y glicoproteínas**

Tanto la preparación del material como las extracciones acuosas a temperatura ambiente y a 90° C fueron realizadas por colaboradores del grupo de investigación, anteriormente al comienzo de este trabajo de Tesis. La información correspondiente a estos pasos se incluye con el fin de facilitar la comprensión de tareas posteriores.

#### **3.1. Obtención de los extractos y fraccionamiento de los polisacáridos de la pared celular de *Codium vermilara***

##### **3.1.1. Origen y preparación del material**

Talos de *Codium vermilara* fueron colectadas en San Antonio Oeste, Provincia de Río Negro, Argentina. El material se lavó con agua de mar y los epífitos presentes se eliminaron mediante limpieza exhaustiva para evitar contaminación. Algunos ejemplares se depositaron en el herbario del Museo Bernardino Rivadavia, Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Argentina), bajo el número de colección 40466.

Las algas se secaron a temperatura ambiente y se molieron en un molinillo General Electric 5K438PG 16 5E, utilizando un tamiz de malla 20. Para eliminar los pigmentos, el material molido (100 g) se extrajo con etanol (1000 ml) durante 3 horas a temperatura ambiente, agitando en forma continua en un balón de vidrio con paleta de acero inoxidable. Posteriormente, se centrifugó durante 30 minutos a 10° C y 8000 g. La fracción soluble se descartó y se repitió la extracción sobre el residuo utilizando 500 ml de etanol. El precipitado así obtenido se secó por intercambio de solventes. En primer lugar se agregó acetona y se centrifugó durante 15 minutos (10° C, 8000 g). Se descartó el sobrenadante y al residuo se agregó éter etílico, centrifugando en las mismas condiciones, y llevando el nuevo residuo a desecador de vidrio durante 20 minutos. El secado se repitió hasta lograr la eliminación del solvente, verificada al lograr un peso constante. Finalmente, las muestras se liofilizaron en un equipo Virtis 10-324, a presiones inferiores a 0,1 mm Hg (100 mTorr), y a temperaturas del condensador cercanas a -45° C, siendo éste el equipo utilizado en todos los casos mencionados a lo largo de esta tesis.

### **3.1.2. Obtención de los extractos**

#### **3.1.2.1. Extracción a temperatura ambiente**

El residuo final de la extracción con etanol se suspendió en agua destilada (20 g de material en 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada) y se extrajo con agitación continua en un balón de vidrio con paleta de acero inoxidable, durante 18 horas a temperatura ambiente. Las fracciones se separaron por centrifugación (40 minutos, 5° C, 8000 g). El residuo (RV1) se liofilizó y se pesó. Tras ser dializado, el sobrenadante (V1) se concentró en un evaporador rotatorio Büchi 10566 a presión reducida, con temperaturas del baño de agua inferiores a 45° C y liofilizó. Se realizó una segunda extracción siguiendo el mismo protocolo, obteniéndose el extracto V2 y el residuo RV2. Durante la agitación se agregaron unas gotas de *m*-toluidina para evitar la contaminación con microorganismos que pudieran echar a perder el material.

#### **3.1.2.2. Extracción a 90 ° C**

El residuo RV2 se disolvió en agua destilada (20 g de material en 1000 ml) y se agitó en forma continua durante 3 horas a 90° C. Luego de llevar a temperatura ambiente, se centrifugó (25 minutos, 10° C, 8000 g) para separar la fracción soluble (W1) y el residuo (RW1). Siguiendo este protocolo, se realizó una segunda extracción con agua caliente, obteniendo W2 y RW2.

### **3.1.3. Fraccionamiento de los polisacáridos**

#### **3.1.3.1. Cromatografía de intercambio iónico**

Con el objetivo de fraccionar los polisacáridos presentes en los extractos V1 (temperatura ambiente) y W1 (90° C) se realizaron cromatografías en escala analítica y preparativa, utilizando DEAE-Sephadex A-25 (Sigma-Aldrich). En el caso de la cromatografía analítica, se utilizaron columnas de 16 ml de capacidad y se sembraron 100 mg de muestra. Las columnas utilizadas en escala preparativa fueron de 160 ml y se sembraron 1000 mg. La muestra fue disuelta en agua destilada y eluida con soluciones de cloruro de sodio de concentración creciente (0M-4M). La presencia de azúcares se

verificó por el método de fenol-ácido sulfúrico. Las fracciones obtenidas se dializaron y liofilizaron. Estas diálisis y todas las mencionadas a lo largo de esta tesis se realizaron utilizando tubos de celulosa (Spectra/Por) seleccionando el diámetro según el volumen a dializar. El corte de peso molecular empleado (MWCO) se detalla en cada caso (3500, 6000-8000 u otros). Las diálisis se efectuaron durante 48 horas en sistema abierto contra agua corriente y 24 a 48 horas más en sistema cerrado contra agua destilada, renovando el agua dos o tres veces.

### **3.1.3.2. Precipitación por agitación en soluciones acuosas de cloruro de potasio**

Aproximadamente 0,5 g de los extractos se disolvieron en 250 ml de agua destilada (0,25 % p/v). Tras centrifugar (20 minutos, 10° C, 9000 g) y separar el precipitado, fue agregándose cloruro de potasio hasta alcanzar una concentración de 0,1 M, con agitación magnética. Los agregados de KCl se repitieron llegando hasta una concentración de 2M. Después de cada aumento de la molaridad se mantuvo la agitación durante 3 a 4 horas, se tomó una alícuota de solución, y se centrifugó para observar si formaba un precipitado. En caso de obtenerse, el precipitado fue separado para su posterior diálisis y liofilización, y con la solución restante se continuó el procedimiento descripto. La solución obtenida al final del proceso fue asimismo dializada y liofilizada.

A modo de control, el mismo procedimiento se realizó remplazando el cloruro de potasio por cloruro de sodio, para descartar la posibilidad de algún tipo de precipitación inespecífica.

### **3.1.4. Tratamientos enzimáticos**

#### **3.1.4.1. Tratamiento con $\alpha$ -amilasa**

El tratamiento con  $\alpha$ -amilasa se realizó en aquellos casos donde una fracción presentaba un alto contenido de glucosa y se presumía que dicho azúcar correspondía a polisacáridos de reserva (almidón, fundamentalmente) extraídos conjuntamente con los polisacáridos estructurales. La muestra fue disuelta en buffer fosfato 0,1 M (pH 6,9) y la enzima ( $\alpha$ -amilasa tipo VI-B, origen: páncreas bovino; Sigma) se incorporó en tres

agregados a lo largo de 24 horas de agitación a temperatura ambiente. La cantidad de  $\alpha$ -amilasa necesaria fue determinada de acuerdo al contenido de glucosa de la muestra y los datos de actividad de la enzima provistos por el fabricante. La muestra fue luego dializada (MWCO 3500) y liofilizada.

### **3.1.4.2. Tratamiento con endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mananasa**

#### **3.1.4.2.1. Tratamiento enzimático sobre el residuo final RW2**

El residuo final de la secuencia extractiva de la pared de *C. vermilara* (RW2) fue suspendido en buffer acetato 50mM pH 5,5 con la enzima endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mananasa (AN3358.2; Bauer et al., 2006) a 37° C durante una noche con agitación continua. El residuo tratado fue dializado (MWCO 6000-8000) y liofilizado.

#### **3.1.4.2.1. Tratamiento enzimático *in situ***

Secciones semifinas del alga fueron incubadas con endo- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mananasa (AN3358.2; Bauer et al., 2006) tras remover la resina Paraplast. La incubación se realizó en buffer acetato 50 mM pH 5,5, a 37° C durante una noche. Como control se incubaron los cortes con buffer sin enzima. Se recuperó la solución de incubación de 40 secciones, y la cantidad de manosa liberada por el tratamiento fue determinada por derivatización de alditoles a acetatos y posterior cromatografía gaseosa como se describe más adelante (3.2.8.), y expresada como cantidad de manosa liberada por área de la sección (ng.mm<sup>2</sup>). El área de las secciones se midió usando el software Image J 1.30.

## **3.2. Caracterización química**

### **3.2.1. Determinación del contenido total de hidratos de carbono**

#### **3.2.1.1. Método de fenol-ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956)**



La muestra (2 mg) se disolvió en 5 ml de agua destilada. Se tomaron alícuotas de entre 50 y 150  $\mu$ l, en tubos de ensayo, llevando a 0,5 ml con agua destilada. A cada alícuota se agregaron 0,5 ml de solución de fenol 5% y se mezcló. Se adicionaron en forma rápida y por medio de un dispensador 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Tras agitar utilizando un mezclador de vórtice y dejar que los tubos alcancen temperatura ambiente se midió la absorbancia a 490 nm. Todas las determinaciones colorimétricas mencionadas en esta tesis se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Spectronic 20D (Milton Roy Company) empleando celdas de 1 cm de recorrido óptico. La cantidad de azúcar presente en la muestra se determinó por referencia a una curva patrón obtenida a partir de soluciones de galactosa (15 a 70  $\mu$ g/ml, aproximadamente).

### **3.2.1.2. Adaptación para material insoluble (Ahmed y Labavitch, 1977)**

En un vial cilíndrico de 5 ml en baño de hielo, se colocaron 2,5 mg de muestra a los que se adicionó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. El material se agitó magnéticamente durante 10 minutos. Luego se fue agregando gota a gota 1 ml de agua destilada, manteniendo la agitación y el baño de hielo el tiempo necesario para lograr la disolución completa del material. Se trasvasó a un matraz de 5 ml y se completó el volumen con agua destilada. Se tomaron alícuotas de esta solución (50-500  $\mu$ l) y se cuantificó el contenido de hidratos de carbono de acuerdo al método descrito en el punto anterior.

### **3.2.2. Determinación del contenido de sulfato**

#### **3.2.2.1. Método de Dodgson y Price (1962)**

Esta técnica requiere la preparación previa del cloruro de bario-gelatina, que se obtuvo disolviendo 200 mg de gelatina (Oxoid, exenta de sulfato) en 40 ml de agua destilada a 60-70° C y dejando reposar en heladera durante 6 horas al menos. Luego, se agregaron 200 mg de cloruro de bario (grado analítico), volviendo a heladera durante 3 horas como mínimo.

Entre 1 y 2 mg de muestra se hidrolizaron en 1 ml de ácido clorhídrico 1 M, a 110° C durante 4 a 5 horas. Se tomaron alícuotas de 250  $\mu$ l, se llevó a 0,5 ml con HCl 1M y a esta solución se sumaron 3,5 ml de TCA 30 % (p/v). Luego se agitó utilizando un

mezclador de vórtice. Se agregó 1 ml de cloruro de bario-gelatina, y luego de agitar nuevamente se dejó a temperatura ambiente por 10 minutos. Se midió la absorbancia a 360 nm contra un blanco de 0,5 ml de HCl 1 M sometido a las mismas condiciones. El color obtenido permanece estable por aproximadamente una hora, ya que luego el sulfato de bario tiende a precipitar. La cantidad de sulfato se determinó por referencia a una curva patrón obtenida a partir de soluciones de sulfato de sodio anhidro en ácido clorhídrico 1M (40-400 µg/ml de SO<sub>4</sub>).

### **3.2.2.2. Cromatografía iónica isocrática**

Alrededor de 1 mg de la muestra se hidrolizó en TFA 2M durante 2 horas a 120° C. El contenido de sulfato se determinó por cromatografía iónica isocrática en un equipo Dionex DX-100 con una columna Dionex AS4A, utilizando una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,8 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1,7 mM como eluyente. Estas determinaciones fueron realizadas en el Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE- FCEN-CONICET).

### **3.2.2.3. Microanálisis elemental**

Los análisis se realizaron en el INQUIMAE (CONICET; FCEN-UBA), en un equipo Carlo Erba EA 1108. La técnica está basada en la oxidación de la muestra mediante combustión con oxígeno en un tubo reactor. Los diferentes productos de combustión (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O N<sub>2</sub> y SO<sub>2</sub>) son separados por cromatografía gaseosa y se cuantifican posteriormente mediante un detector de conductividad térmica.

### **3.2.3. Determinación del contenido de proteínas**

Siguiendo el método de Lowry *et al.* (1951), se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: carbonato de sodio 2 % en NaOH 0,1 N
- Solución B: sulfato cúprico pentahidratado 0,5 % en tartrato de sodio y potasio 1 %.
- Solución C: 1 ml de solución B en 50 ml de solución A.

Se diluyó la muestra en agua obteniendo una solución de no más de 500 µg de proteína/ml. Se tomaron alícuotas de 0,4ml a las que se agregaron 2 ml de la solución C. Luego se mezcló y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 0,2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (Anedra), diluido a la mitad antes de ser usado, y agitando inmediatamente, tras lo cual se esperó durante 30 minutos antes de medir la absorbancia a 500 nm contra un blanco de agua destilada. Se utilizaron como referencia soluciones de albúmina de suero bovino de concentración creciente (50-500 µg/ml).

### **3.2.4. Determinación del contenido de ácidos urónicos**

#### **3.2.4.1. Método de Filisetti-Cozzi y Carpita (1991); modificación al método de Blumenkrantz y Asboe-Hansen (1973).**

Se prepararon las siguientes soluciones:

-Solución A (buffer pH 1,6): ácido sulfámico/sulfamato de potasio 4 M. Se disolvieron, con agitación, 38,8 g de ácido sulfámico en agua, agregando luego KOH gota a gota hasta lograr la disolución. El pH de la solución se ajustó con HCl y se llevó a 100 ml con agua.

-Solución B: ácido sulfúrico/tetraborato de sodio 0,0125 M.

-Solución C: *m*-hidroxifenilo 0,15 % en NaOH 0,5 %.

Se disolvieron 4-5 mg de muestra en 2 ml de agua. Se tomaron alícuotas de 0,5 ml a las que se adicionaron 40 µl de solución A. Luego de agitar, se llevó a baño de hielo y se agregaron 2,4 ml de solución B. Tras agitar nuevamente, los tubos se taparon y se colocaron en un baño de agua a 100° C durante 20 minutos. Se llevó a temperatura ambiente en baño de hielo, tras lo cual se agregaron 80 µl de solución C. Luego de un reposo de 10 minutos se midió la absorbancia a 52 5nm contra un blanco de agua destilada y utilizando como referencia soluciones de D-glucuronolactona de concentraciones crecientes (10-80 µg/ml).

#### **3.2.4.2. Adaptación para material insoluble**

Se siguió el procedimiento de Ahmed y Labavitch (1977) descrito en el punto **3.2.1.2**.

### **3.2.5. Determinación del contenido de ácido pirúvico**

Siguiendo el método de Koepsell y Sharpe (1952), 4 mg de muestra se hidrolizaron en ácido oxálico 0,02 M, durante 2 horas a 120° C. Se tomaron alícuotas del hidrolizado de 0,5 ml y se les agregó 2 ml de ácido sulfúrico 0,75 N y 1 ml de solución de 2,4-dinitrofenilhidracina al 0,1 % en HCl 2 N, llevando luego a un baño de 30° C durante 15 minutos. A continuación se agregaron 10ml de acetato de etilo, se mezcló y se descartó la fase acuosa (inferior) que contenía las hidrazinas. A la fase restante se sumaron 6 ml de solución de carbonato de sodio 10 %, se mezcló y se descartó la fase orgánica (superior). Se leyó la absorbancia de la fase acuosa a 380 nm, contra un blanco de agua destilada, utilizando como referencia soluciones de ácido pirúvico (5-50 µg/ml).

### **3.2.6. Determinación del contenido de aminoazúcares**

De acuerdo al método de Smith y Gilkerson (1979), entre 1 y 2 mg de muestra se hidrolizaron a 110°C en ácido clorhídrico 0,5M durante 2 horas. Se tomaron alícuotas de entre 0,1 y 0,25 ml, llevando el volumen a 0,5 ml con HCl 0,5 M. Se agregó 1 ml de nitrito de sodio 2,5 % y tras agitar se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se agregaron 0,5 ml de sulfamato de amonio 12,5 % y se dejó actuar durante 5 minutos a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de nitrito de sodio. Se sumaron 0,5 ml de solución de clorhidrato de hidrazona de 3-metil-2-benzotiazona (MTBH) 0,25 %, llevando a 37° C durante 30 minutos. Finalmente se agregaron 0,5 ml de cloruro férrico 0,5 %, volviendo a 37° C, por 5 minutos. La coloración obtenida se mantiene estable durante 72 horas. Se leyó la absorbancia a 650 nm contra un blanco de HCl 0,5 M, y usando como referencia soluciones de D-glucosamina (5-30 µg/ml) preparadas en el momento.

### **3.2.7. Determinación del peso molecular**

Se utilizó el método de dosaje de extremos reductores (Park y Johnson, 1949). Se prepararon las siguientes soluciones:

- Solución A: ferricianuro de potasio (500 mg/ml)
- Solución B: cianuro de potasio (650 mg/ml), en solución de carbonato de sodio (5,3 g/l)
- Solución C: 1,5 g de sulfato amónico-férrico hidratado y 1 g de dodecilsulfato de sodio (SDS) en 1l de ácido sulfúrico 0,025 M. Esta solución debe filtrarse antes de usar.

A 0,5 ml de una solución del polisacárido (1-10 ug/ml) se agregaron 0,5 ml de la solución A y 0,5 ml de la solución B. Después de agitar y tapar se llevó 15 minutos a un baño a 100° C. Luego de dejar enfriar los tubos, se sumaron 2,5 ml de la solución C y se dejó reposar durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 690 nm contra un blanco de agua destilada, usando como referencia soluciones de D-galactosa (1-10 µg/ml). El peso molecular se obtiene de la siguiente ecuación:

$$PM = \frac{m \text{ muestra}}{R} \cdot PM \text{ unidad} \cdot Fd$$

donde m muestra= mg totales de la muestra en solución; R=poder reductor (µg de galactosa terminal según la absorbancia obtenida); PM unidad= peso molecular promedio de la unidad de monosacárido que conforma el polisacárido y Fd= factor de dilución de la muestra.

### 3.2.8. Cromatografía Gaseosa

Se trabajó con un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890A, con detector de ionización de llama (FID), con una relación de *split* de 80:1 y usando nitrógeno como gas portador. Se utilizó un integrador Hewlett-Packard 3395. Los análisis se realizaron con una columna capilar SP-2330 (Supelco), de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro interno y 0,20 µm de espesor de la fase líquida, con un flujo de gas portar de 1 ml/min y una presión de cabeza de 15 psi. La temperatura del inyector y del detector fue 240° C.

Las condiciones cromatográficas para los alditoles peracetilados obtenidos por hidrólisis ácida total o hidrólisis reductiva total fueron las siguientes: 200°C→(1°C/min)→230°C. En el caso de los alditoles acetilados obtenidos a partir de la hidrólisis de polisacáridos parcialmente metilados las condiciones fueron: 160°C → (1°C/min) → 210°C → (2°C/min) → 230°C.

A partir de los cromatogramas obtenidos, se realizó la conversión de la información de áreas de pico a porcentajes molares de cada unidad, siguiendo el criterio de la teoría de respuesta efectiva (*effective carbon response theory*) (Sweet *et al.*, 1975).

### **3.2.8.1. Hidrólisis de los polisacáridos y reducción de monosacáridos a alditoles**

#### **3.2.8.1.1. Hidrólisis ácida total (Morrison, 1988)**

Entre 1 y 2 mg de muestra se hidrolizaron en 1 ml de TFA 2 M, a 121° C durante 2 horas. Se evaporó el TFA llevando a seco tras sucesivos agregados de agua. Se agregó 1ml de NH<sub>3</sub> 1 M y una punta de espátula de borohidruro de sodio, dejando al menos 2 horas a temperatura ambiente para permitir la reducción de los azúcares a alditoles. Se llevó a pH 6 con ácido acético 50 %. Posteriormente, la muestra se pasó por una columna cromatográfica con resina Amberlite IR-120 (H<sup>+</sup>). Los alditoles se eluyeron con agua destilada, verificando su presencia mediante reacción con fenol-ácido sulfúrico. Se eliminó el exceso de reactivo resultante agregando 0,5 ml de metanol y llevando a seco, repitiendo este paso tres veces.

#### **3.2.8.1.2. Adaptación para material insoluble (Morrison, 1988)**

Unos 3 mg de muestra se llevaron a 37° C durante 60 minutos en 0,2 ml de TFA concentrado. Luego se agregaron 25 µl de agua destilada y se completó la hidrólisis a 100° C durante 60 minutos. Finalmente, se agregaron 1,054 ml de agua para alcanzar una concentración de TFA de 2 M y se procedió según lo descrito en la sección anterior.

#### **3.2.8.1.3. Hidrólisis reductiva total**

Siguiendo el método desarrollado por Stevenson y Furneaux (1991) para evitar la degradación de las unidades de 3,6-anhidrogalactosa, 1 a 3mg de muestra se colocaron en 0,4 ml de TFA 3 M y 0,1 ml de solución acuosa de complejo 4-metilmorfolina borano (MMB) (80 mg/ml). Se llevó a 80° C durante 10 a 20 minutos, hasta observar que el material se encontrara disuelto. Luego se adicionó nuevamente 0,1 ml de la

solución de MMB y se calentó a 120° C durante 2 horas. Se dejó enfriar, se agregaron 0,2 ml de la solución de MMB y se llevó a seco hasta eliminar el exceso de TFA.

### **3.2.8.2. Obtención de acetatos de alditoles**

#### **3.2.8.2.1. Acetilación de los alditoles obtenidos por hidrólisis ácida total y posterior reducción**

La mezcla de alditoles se acetiló con 0,5 ml anhídrido acético y 0,5 ml de piridina, a 100° C durante 45 minutos. La solución se dejó enfriar y se extrajo con 1ml de cloroformo/ agua (1:1). Se agitó y se descartó la fase acuosa con pipeta Pasteur. Se realizó una segunda extracción idéntica a la primera. La fase clorofórmica se lavó con 0,5 ml de solución saturada de bicarbonato de sodio (3 lavados) y agua destilada (2 lavados). En cada paso se agitó después del agregado y se descartó la fase acuosa. Luego se agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua presente en la fase clorofórmica. El sobrenadante se pasó a un vial donde fue llevado a seco. Las muestras se mantuvieron a -20° C hasta ser analizadas por CG.

#### **3.2.8.2.2. Acetilación de los alditoles obtenidos por hidrólisis reductiva total**

La mezcla de alditoles se acetiló con 0,2 ml anhídrido acético y 0,2 ml de TFA concentrado, a 50° C durante 20 minutos. La solución se dejó enfriar y se extrajo siguiendo el procedimiento descrito para el caso de la hidrólisis ácida total.

### **3.2.9. Metilación de los polisacáridos (Ciucanu y Kerek 1984).**

Con el fin de lograr una mejor solubilidad en dimetilsulfóxido (DMSO), se preparó una sal de trietilamonio a partir de la muestra (5-15 mg), de acuerdo a lo descrito por Stevenson y Furneaux (1991) para polisacáridos sulfatados. Para ello se utilizó una columna de intercambio catiónico de resina Amberlite IR-120 plus con trietilamonio como contraión, que se preparó con una solución de clorhidrato de trietilamonio 20 %. Se lavó con abundante agua hasta que la prueba con solución de AgNO<sub>3</sub> 5 % diera precipitación negativa. Luego se sembró la muestra disuelta en el menor volumen de

agua posible. Las sales de trietilamonio de los polisacáridos se eluyeron de la columna con agua destilada y se liofilizaron.

Las sales liofilizadas se suspendieron en 1 ml de DMSO agitando hasta observar su disolución; de ser necesario la muestra se mantuvo en agitación de un día para el otro, ya que la correcta disolución es crucial para lograr la metilación del polisacárido, al igual que el carácter anhidro del medio de reacción. Se agregó una punta de espátula de hidróxido de sodio en lentejas pulverizado y se dejó reaccionar con agitación magnética durante una hora. Posteriormente, y en baño de hielo, se agregaron 0,5 ml de yoduro de metilo, colocando una aguja en la tapa del recipiente para evitar el exceso de presión por los gases generados. Se llevó a temperatura ambiente y se dejó agitando 1 hora más. Los pasos de agregado de NaOH y CH<sub>3</sub>I se repitieron una vez más. Finalmente se interrumpió la reacción agregando 4 ml de agua y se dializó (MWCO 3500), para luego liofilizar.

### **3.2.9.1. Hidrólisis y derivatización de los polisacáridos metilados**

Los polisacáridos permetilados se hidrolizaron y derivatizaron a los correspondientes alditoles acetilados en las condiciones ya descritas (3.2.8.1 y 3.2.8.2). Las asignaciones de picos se hicieron siguiendo a Shea y Carpita (1988).

### **3.2.10. Desulfatación de los polisacáridos**

El procedimiento se realizó siguiendo el método desarrollado por Navarro y Stortz, (2007). En primer lugar se obtuvieron las sales de piridinio de los polisacáridos, de forma similar a la descrita para las sales de trietilamonio en el caso de la metilación, utilizando en este caso una solución de cloruro de piridinio al 10 % p/v para preparar la columna. Luego de eluir con agua, se ajustó el pH con piridina a un valor de 6,5-7.

Una vez obtenidas las sales, a partir de 10 a 20 mg de muestra, éstas se disolvieron en una mezcla de 10 ml de DMSO y 0,2 ml de piridina. La solución se llevó a un recipiente de teflón de 50 ml de capacidad y paredes de 5 mm de grosor, capaz de resistir la temperatura y presión generadas durante la reacción. Se utilizó un horno de microondas doméstico marca Sharp, modelo R353EA de 1200 W de potencia y 2450 MHz de



frecuencia de irradiación. La muestra se sometió a 6 pulsos de 10 segundos de duración a la máxima potencia, dejando enfriar en baño de hielo tras cada uno de ellos hasta 50-60°C. Una alícuota de la muestra fue metilada siguiendo el procedimiento ya descrito, y el resto se dializó (MWCO 3500) y liofilizó.

### **3.3. Métodos espectroscópicos**

#### **3.3.1. Espectroscopía de masa acoplada a cromatografía gaseosa**

Se trabajó con un espectrómetro de masa acoplado a un cromatógrafo gaseoso GCMS-QP5050A (Shimadzu), a un potencial de ionización de 70eV y con He como gas portador. Las cromatografías fueron realizadas en las mismas condiciones descriptas para los análisis por cromatografía gas-líquido.

#### **3.3.2. Espectroscopía de infrarrojo FTIR**

Los espectros de FTIR (espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier) se realizaron usando muestras de algas secas o fracciones liofilizadas pulverizadas. La muestra se mezcló con bromuro de potasio en una relación de aproximadamente 1:20 y se prepararon pastillas utilizando una prensa manual. Los espectros se registraron entre 4,000 y 250  $\text{cm}^{-1}$  en un espectrofotómetro 510P Nicolet (Madison WI, USA), tomando 32 pulsos con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Los datos se recolectaron y procesaron con el software OMNIC 7.2 (Thermo-Nicolet, Madison, WI, USA). Se realizó la corrección por sustracción automática del ruido de fondo, se obtuvieron los espectros promedio y se guardaron en formato JCAMP.DX para análisis posteriores.

#### **3.3.3. Espectroscopía de RMN**

Los espectros se realizaron en un espectrómetro Bruker AM 500 y un espectrómetro Bruker Avance II 500 a 500.13 ( $^1\text{H}$ ) y 125.77 ( $^{13}\text{C}$ ) MHz, a temperatura ambiente. Se utilizó acetona como estándar interno (referido a  $\text{Me}_4\text{Si}$ ), el grupo metilo de la acetona se calibró en 31.1 ppm en  $^{13}\text{C}$  y en 2.22 ppm en  $^1\text{H}$ . Las muestras (10-30mg) se disolvieron en 0,5 ml de agua deuterada y se liofilizaron, a fin de intercambiar los protones de sus oxhidrilos. Luego se disolvieron en  $\text{D}_2\text{O}$  (0,5 ml) y tras centrifugar se

dispusieron en tubos de 5 mm de diámetro. En el caso de los espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , los parámetros utilizados fueron los siguientes: tiempo de relajación máximo, ángulo de pulso de  $90^\circ$  y unos 40000 pulsos, sin tiempo entre pulsos. Para los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , se acumularon 300 pulsos, y para eliminar el pico de HOD se efectuó la secuencia de pulso  $180^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ$ . Los experimentos en 2D se realizaron utilizando los parámetros estándar del software de Bruker.

### **3.4. Determinación del poder rotatorio**

Los poderes rotatorios se determinaron a temperatura ambiente en un polarímetro Perkin-Elmer 343, provisto de una lámpara de sodio (589 nm), una celda de 1 dm de camino óptico y aproximadamente 1,0 ml de volumen interno, utilizando soluciones acuosas 0,1-0,4% del polisacárido.

## **Capítulo 4 - Microscopía óptica y láser confocal: localización *in situ* de los componentes de la pared**

### **4.1. Preparación del material**

El material fue preparado en el Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur (Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires). Fragmentos de talos de *Codium vermilara* fueron fijados en formaldehído 4 %, deshidratados con una serie etanol en concentración creciente y embebidos en paraplast (Fisher, Pittsburgh, PA, USA). Se cortaron secciones transversales de 10  $\mu\text{m}$  en un micrótomotario Reichert Jung con cuchillas de metal, que se recogieron sobre portaobjetos (Fisher); luego de remover la resina con disolvente histológico Histo-Clear, los cortes fueron bloqueados durante 30 minutos con una solución de PBS con 5 % (p/v) de leche en polvo descremada (buffer fosfato-salino modificado 5 %, MPBS por sus siglas en inglés).

### **4.2. Tinciones histoquímicas**

Para microscopía óptica, secciones de  $\sim 10 \mu\text{m}$  fueron montadas sobre portaobjetos de vidrio y observadas en un microscopio Carl Zeiss Axiolab (Carl Seizz, Jena, Alemania).

Las tinciones histoquímicas se hicieron siguiendo a Krishnamurthy (1999). Las muestras fijadas como se describió anteriormente se tiñeron con:

-Azul de *O*-Toluidina 0,05 % p/v en HCl 0,1M (pH 1,0), que tiñe específicamente polisacáridos sulfatados dando coloración ente rojiza y violeta ( $\gamma$  metacromasia). Como control negativo se realizó la misma tinción sobre secciones preextraídas con agua (90° C, 2 horas) para remover los polisacáridos sulfatados.

-Calcofluor White 0,1% p/v en solución acuosa, para detección de polisacáridos con estructura  $\beta$ -(1→3) y  $\beta$ -(1→4).

### **4.3. Inmunolocalización**

Para localizar las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para epitopes de hidratos de carbono: arabinósidos de tipo extensina (JIM11 y JIM20, Smallwood et al. 1994) y glicanos de tipo AGP (JIM16, Knox et al. 1991; MAC207, Yates et al. 1996). Los cortes se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario, en una dilución 1:50-1:500, y se lavaron luego con PBS 2X. Se usó un anticuerpo secundario anti-Rata IgG acoplado a Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) (1:1000) en MPBS 5 %, incubando durante una hora a temperatura ambiente.

En el caso de las unidades  $\beta$ -(1→4)-D-Man<sub>p</sub> se utilizó un anticuerpo policlonal específico antimanano (Mab) desarrollado por Handford et al. (2003), en una dilución 1:100. Se usó un anticuerpo secundario anti-Conejo IgG acoplado con Alexa Fluor 565 (Molecular Probes) (1:250). En todos los casos, tras la incubación con el anticuerpo secundario se lavó 5 minutos con PBS 2X.

Se observaron los cortes mediante microscopía láser confocal. El equipo usado consta de un cabezal confocal de escaneado láser, MCR 1024 (Bio-Rad, Hércules, CA), montado sobre un microscopio invertido Diaphot 200 (Nikon, Tokio, Japón), un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss 510 y TCS SP2 AOBS Leica. Se realizó una construcción tridimensional en el programa Image J ver.1.30. Todas las imágenes fueron procesadas en el Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA).

Como un primer control de cada prueba de inmunolocalización, se omitieron los anticuerpos primarios, siguiendo el resto del procedimiento descripto. Un control adicional se obtuvo utilizando secciones previamente extraídas donde las AGPs y extensinas solubles habían sido removidas. Por último, secciones no extraídas y sin marcar marcadas fueron visualizadas en las mismas condiciones para evaluar la autofluorescencia intrínseca del material.

#### **4.4. Microespectroscopía SR-FTIR**

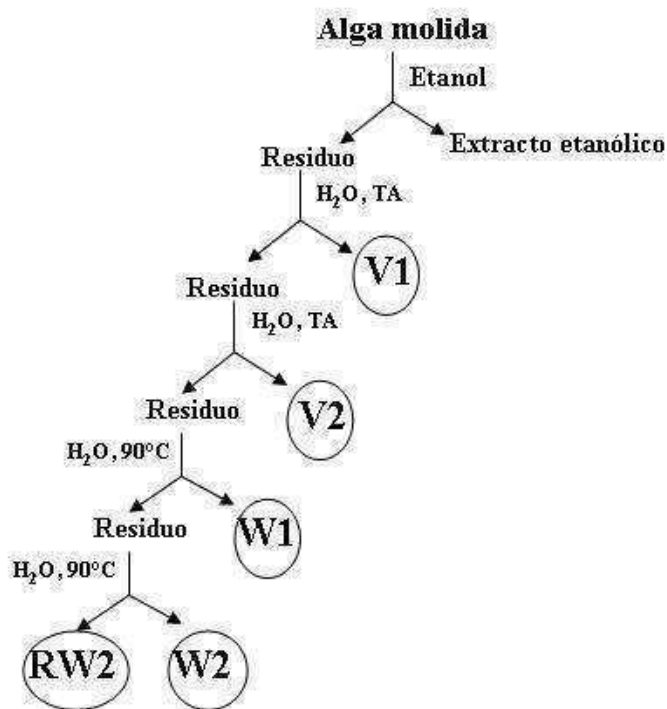
Los datos correspondientes a esta técnica fueron recogidos por el Dr. José M. Estevez en *Advance Light Source* (ALS, Berkeley, Estados Unidos). La espectroscopía de infrarrojo basada en radiación de sincrotrón (SR-FTIR) acoplada a microscopía permite el mapeo de componentes sobre cortes de material, usando diferentes longitudes de onda asociadas a grupos funcionales determinados. Para este análisis, las muestras se embebieron en paraplast, se cortaron con micrótopo en secciones de  $\sim 10 \mu\text{m}$  y luego la resina fue removida usando *histoclear*. Las secciones se llevaron a portaobjetos *low e* (MirrIR, Kevley Tech, Chesterland, Estados Unidos) y los espectros FTIR de reflexión (también llamado “modo de doble absorción”) se adquirieron con el haz 1.4.3 de ALS. La radiación de sincrotrón se usó como fuente externa, con un equipo FTIR Nicolet 760 y un microscopio Nic-Plan<sup>TM</sup>. Para el mapeo de la pared celular se recolectaron 96 espectros en la región de  $650$  a  $4000 \text{ cm}^{-1}$ , con una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ , apodización de Happ-Genzel y 64 pulsos. Se recolectó una imagen espectroscópica del *background* a partir de un área libre de muestra. La recolección y procesamiento de se realizaron en el programa OMNIC 7.2 (Thermo-Nicolet, Madison, Estados Unidos), junto con Win-Das software (Wiley, New York, NY, USA). Se corrigió la línea de base de los espectros y se normalizó el área para compensar cualquier cambio en el espesor a lo largo de la sección.

# **RESULTADOS**

## Capítulo 5 - Pared celular de *Codium vermilara*

### 5.1. Introducción

La **Figura 1** muestra la secuencia extractiva realizada sobre el material de *Codium vermilara*. Los extractos acuosos a temperatura ambiente (V1, V2) y a 90° C (W1, W2) fueron analizados y caracterizados con anterioridad al comienzo de esta Tesis (**Tabla 1**) (Ciancia et al., 2007). A partir de este análisis pudo calcularse que globalmente las paredes celulares de *Codium vermilara* están constituidas por ~32 % de manano y ~12 % de polisacáridos sulfatados, esto es, arabinano y galactano fundamentalmente, sin tener en cuenta un manano sulfatado que representa una proporción muy pequeña de la pared (ver más adelante). Estos porcentajes de manano y polisacáridos sulfatados son similares a los reportados para *Codium fragile* de aguas argentinas (alrededor de 31 y 9 %, respectivamente; Ciancia et al., 2007). Por otro lado, la cantidad estimada de material correspondiente a la pared celular también es similar en ambas especies (40 % p/p en *C. fragile* y 44 % p/p en *C. vermilara*).



**Figura 1-** Secuencia extractiva aplicada sobre el material molido de *Codium vermilara*.

**Tabla 1.** Caracterización de los extractos y el residuo RW2 de *Codium vermilara*.

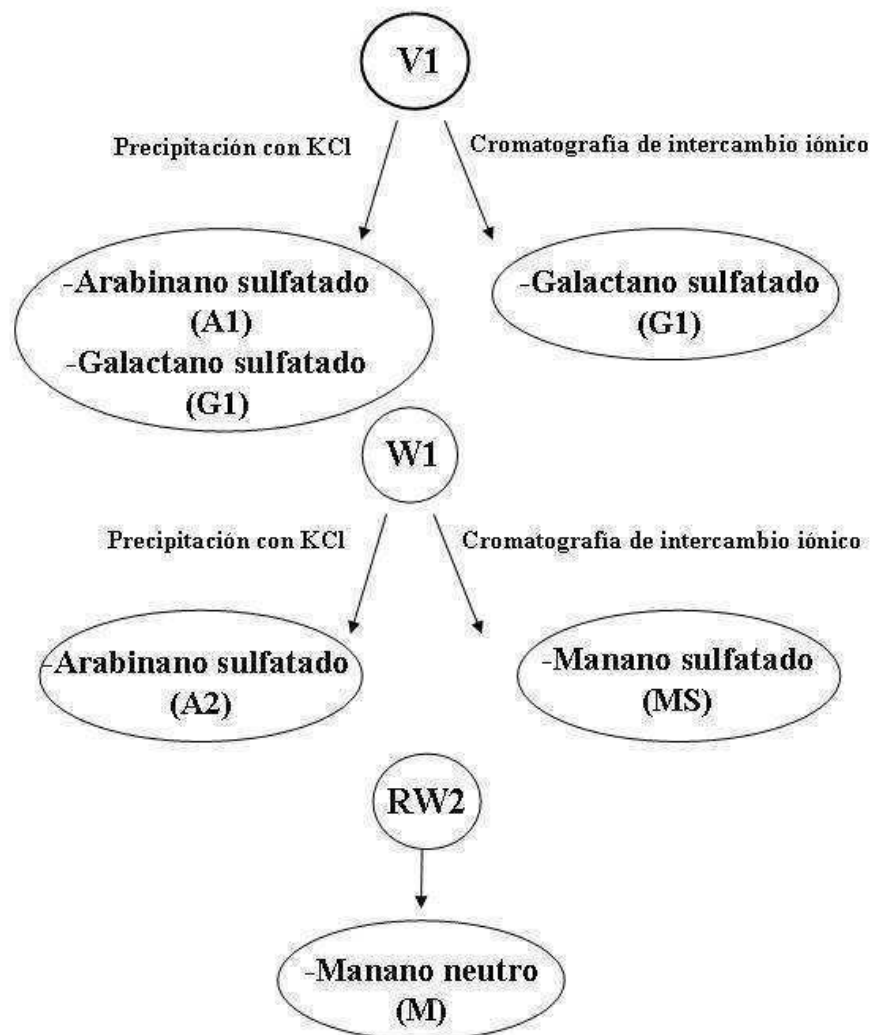
	Rendi miento	AT %	Monosacáridos (mol%)			Ácido pirúvico %	Sulfato %	Polímeros de la pared	
			Gal	Ara	Man			Manano	PS %
V1	7	48	50	45	4	1,4	30	0,1	5,0
V2	2	51	32	36	28	1,2	30	0,2	1,0
W1	4	58	26	20	31	-	22	1,0	2,0
W2	2	63	18	13	61	-	22	0,7	1,0
RW2	50	69	4	6	87	nd	4	30,0	3,0
							Σ	~ 32,0	~ 12,0

AT: Azúcares neutros totales; PS: polisacáridos sulfatados.nd: no determinado. El rendimiento se calculó en base al contenido de AT y sulfato de cada extracto o residuo, y expresado como porcentaje del peso seco del alga. El porcentaje de manano se calculó teniendo en cuenta el contenido de azúcares totales corregido en base al % de manosa. En el caso de los PS, tomando % AT + % sulfato + % ácido pirúvico, con %AT corregido en base al contenido de Gal y Ara.

Durante este trabajo de tesis, se analizó el residuo final (RW2) y los extractos V1 y W1 se fraccionaron mediante distintos procedimientos para aislar sus componentes y poder realizar la caracterización estructural de cada uno de ellos. El fraccionamiento de extractos complejos que contienen una mezcla de polisacáridos permite aislar componentes de la pared celular con una estructura homogénea.

## 5.2. Consideraciones acerca del fraccionamiento

Se usaron diferentes técnicas de fraccionamiento y para cada uno de los tipos de polisacáridos presentes en la pared celular, la fracción a estudiar en detalle fue definida en función de la eficacia del fraccionamiento para la obtención de ese polisacárido en particular. Algunos de los polímeros componentes de la pared fueron aislados para su caracterización mediante cromatografía de intercambio iónico: el manano sulfatado a partir del extracto acuoso a 90° C (W1), y el galactano sulfatado a partir del extracto acuoso a temperatura ambiente (V1). En el caso de los arabinanos sulfatados resultó más efectiva la precipitación con cloruro de potasio a partir de V1 y W1. Por otro lado, el manano fibrilar se caracterizó a partir del residuo final de la secuencia extractiva (RW2), del cual es el componente mayoritario (**Figura 2**).



**Figura 2-** Esquema del fraccionamiento de los extractos acuosos V1 y W1 y del residuo RW2, mostrando el origen de las fracciones elegidas para su posterior caracterización.

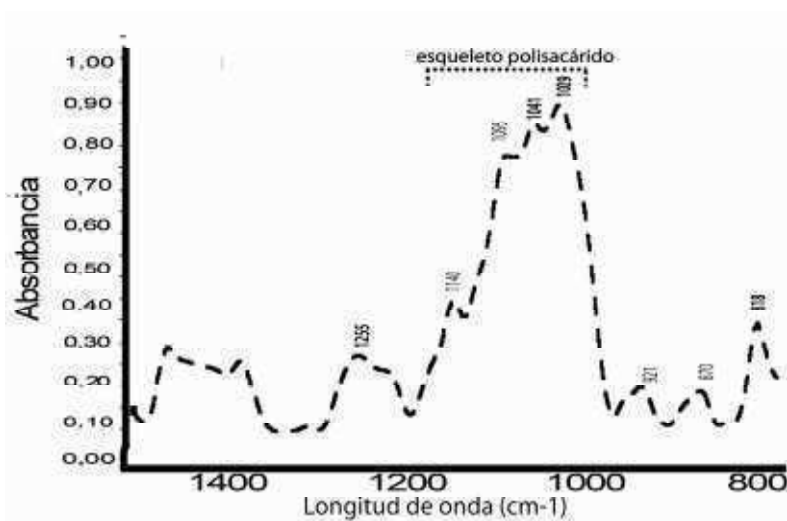
### 5.3. Fraccionamiento de los extractos y caracterización química de los componentes

#### 5.3.1. Manano neutro (M).

El manano neutro (M) se caracterizó a partir de RW2, el residuo obtenido tras la secuencia extractiva aplicada al material de *Codium vermilara* (Figura 1). Al tratarse de la porción de pared insoluble en agua tanto a temperatura ambiente como a 90° C puede asumirse que en este residuo, que representa el 50% del peso seco del alga, se encuentra



el componente fibrilar de la misma. Su análisis (**Tabla 2**) muestra que está compuesto mayoritariamente por manosa, aunque se encuentra aún un pequeño porcentaje de arabinosa y galactosa (~10 %). Este porcentaje, junto con la presencia del manano sulfatado (ver más adelante), podrían ser la causa del 4-5 % de sulfato detectado, así como de los picos correspondientes a las longitudes de onda asociadas a la presencia de grupos sulfato que se observan en el espectro de FTIR del residuo (regiones 1220-1250 y 820-930  $\text{cm}^{-1}$ ) (**Figura 3**).



**Figura 3-** Espectro de FTIR de RW2 en la región 800-1500  $\text{cm}^{-1}$ .

**Tabla 2.** Caracterización de RW2

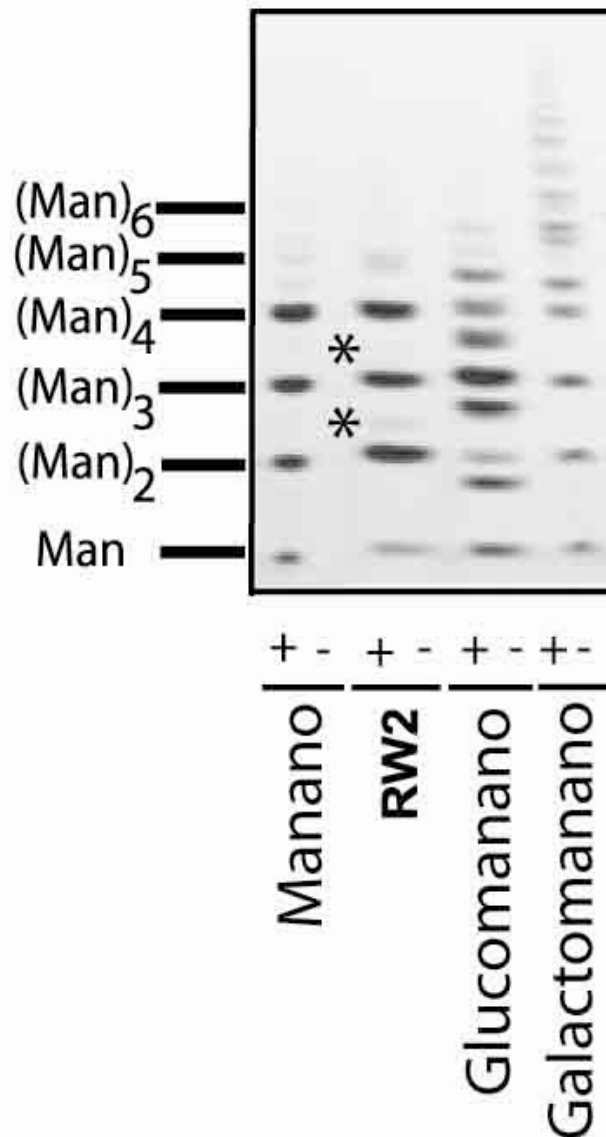
AT %	Sulfato %	Proteínas %	Monosacáridos (moles %)			
			Gal	Ara	Man	Glc
69	4-5	20	4	6	87	4

Los valores de contenido de sulfato corresponden a determinaciones por análisis elemental (4 %) y cromatografía iónica isocrática (5%).

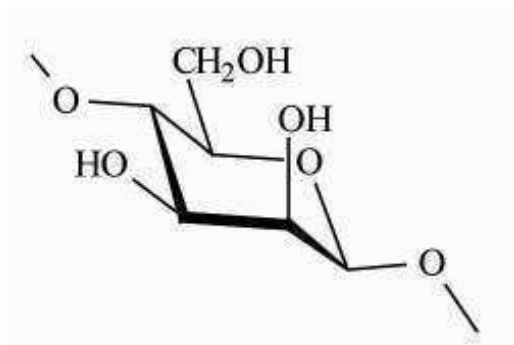
Sulfato como  $\text{SO}_3\text{Na}$ .

La naturaleza insoluble de este residuo inhabilita la aplicación de las técnicas con que habitualmente se analiza la estructura de los polisacáridos de pared (análisis por metilación, espectroscopía de RMN). En este caso, se recurrió a un tratamiento con una enzima endomananasa seguido de electroforesis en gel de agarosa de los productos de

digestión, lo que permitió caracterizar a la porción fibrilar de la pared. De este modo pudieron separarse por su peso molecular los fragmentos obtenidos tras el tratamiento enzimático de RW2 y compararse con los obtenidos a partir de los compuestos usados como patrón. La endomananasa Man5A hidroliza enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1→4) entre unidades de D-manosa. La acción de esta enzima sobre RW2 produjo manosa, manobiosa, manotriosa y manotetraosa como productos principales (**Figura 4**). Como estándares se usaron mananos, glucomananos y galactomananos comerciales, sometidos al mismo tratamiento enzimático. Los productos de digestión del residuo de la pared celular migraron igual que los del  $\beta$ -(1→4)-D-manano usados como estándar, lo que indica que el manano insoluble de *Codium vermilara* está formado por la secuencia repetitiva [ $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-manosil-(1→], aunque un cierto grado de sustitución podría haber, como lo sugiere la presencia de dos bandas menores en el análisis de electroforesis. Por otra lado, estas bandas de baja intensidad podrían también corresponder a fragmentos del manano sulfatado, componente minoritario de la pared celular de estas algas (ver más adelante). El principal componente de RW2, de acuerdo a lo observado, es un polímero neutro de unidades de D-manopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -(1→4) (**Figura 5**), lo que indica una estructura similar a la de otros  $\beta$ -(1→4)-glicanos, como la celulosa o los xilanos que cumplen una función fibrilar en paredes de plantas y otros organismos. Además, la localización *in situ* también permitió confirmar que se trata de este tipo de compuestos (ver más adelante).



**Figura 4-** Electroforesis en gel de agarosa de M tratado con  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) endomananasa. Como controles se usaron manano, glucomanano y galactomanano comerciales, para comparar los oligosacáridos liberados por cada uno de los polisacáridos. En cada caso se sembró una alícuota de polisacárido tratado (+) y una alícuota sin tratar (-). Los oligosacáridos que se observan provienen de la digestión de 1,25  $\mu$ g en el caso de RW2 y 0,5  $\mu$ g en el caso de los polisacáridos comerciales. La posición de las dos bandas menores se indica con asteriscos. A la izquierda del gel se indica la cantidad de unidades de manosa que contiene cada oligosacárido.



**Figura 5-** Unidad de  $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-manopiranososa-(1 $\rightarrow$ ), componente del manano fibrilar de las paredes celulares de *C. vermilara*.

### 5.3.2. Polisacáridos sulfatados

#### 5.3.2.1. Introducción

Los polisacáridos sulfatados representan alrededor de 12% de la pared celular de *Codium vermilara*. Al analizar los extractos V1 y W1, no había elementos suficientes para definir si se trataba de arabinogalactanos o de una mezcla de arabinanos y galactanos. Los fraccionamientos realizados permitieron obtener tanto fracciones casi puras de arabinanos y de galactanos como otras de composición mixta. Adicionalmente, un manano con bajo grado de sulfatación fue aislado a partir de W1.

A continuación se presentan los resultados de los fraccionamientos de V1 y W1 realizados por cromatografía de intercambio iónico y por precipitación con cloruro de potasio. Algunas de las fracciones así obtenidas fueron seleccionadas para posteriores análisis estructurales, por considerarse de mayor interés y/o representatividad por su abundancia en la pared celular de *Codium vermilara*. En las secciones subsiguientes se detallan los resultados obtenidos en esos análisis para un galactano, un arabinano y un manano sulfatados.

#### 5.3.2.2. Fraccionamiento de V1

El primer extracto obtenido con agua a temperatura ambiente (V1) representa el 6,8% (p/p) del peso seco del alga y está compuesto fundamentalmente por galactosa y arabinosa (~50 y 45%, respectivamente). Su composición se muestra en la **Tabla 1**.

### 5.3.2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio aniónico permite la separación o purificación de polisacáridos ácidos en base a la retención de los grupos cargados negativamente por parte de grupos catiónicos que se encuentran unidos covalentemente a un soporte (Matsuhira, 1995). En el caso del DEAE-Sephadex, el ion de intercambio es un grupo dietilaminoetilo (DEAE, de estructura  $[-CH_2CH_2NH^+(CH_2CH_3)_2]$ ) unido a una fase de dextrano. Al pasar a través de la columna cromatográfica, los polisacáridos cargados negativamente quedan retenidos, mientras que los neutros son eluidos. Los polisacáridos retenidos pueden eluirse usando soluciones de creciente fuerza iónica (cuanto más grupos cargados negativamente posea el compuesto será retenido más fuertemente y se necesitarán soluciones de mayor fuerza iónica para lograr su elución).

El extracto V1 fue sometido a fraccionamiento usando como fase DEAE-Sephadex A-25. Una primera columna analítica dio como resultado las fracciones que se describen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Fraccionamiento de V1 por cromatografía de intercambio iónico

Fracción	NaCl M	Rendimiento %	Sulfato %	Monosacáridos (moles %)						
				Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Ram	Fuc
F1	0	40	16	43	47	3	1	4	2	-
F2	0,75	8	19	77	8	3	-	10	2	-
F3	1,5	7	38	20	62	4	2	3	5	3
F4	2,0	7	38	5	90	1	2	1	-	1
F5	4,0	tr	nd	78	15	3	1	3	0	0
F6	4,0*	4	38	35	50	1	5	4	3	3

Rendimiento: % de la masa original (100mg)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na

\*Obtenida al llevar a ebullición la fase en solución NaCl 4M para recuperar la muestra restante.

La segunda columna se realizó partiendo de una masa mayor de V1 (500 mg) a fin de obtener mayor cantidad de cada fracción para poder hacer análisis más detallados de cada una de ellas (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Segundo fraccionamiento de V1 por cromatografía de intercambio iónico

Fracción	NaCl M	Rendimiento %	AT %	Sulfato %	AT:SO <sub>3</sub> Na %	Proteínas %	Aminoazúcares %	Ácido Pirúvico %	Monosacáridos (moles %)									
									Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Ram	Fuc			
Precipitado		5	2,5	18*	nd	29*	nd	nd	46	40	5	6	1	3	-	-		
F1	0	tr	nd	nd	nd	nd	nd	nd	11	-	76	13	-	-	-	-		
F2	0,1	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	20	17	37	17	4	2	2	2		
F3	0,5	3	26	21	1:1,3	49	6	nd	23	2	47	13	4	5	5	5		
F4	0,75	7	62	12	1:0,3	13	8	3	86	2	1	3	5	2	1	1		
F5	1,5	24	38	30	1:1,1	3	4	5	30	65	1	-	3	-	-	-		
F6	2,0	6	19	12	1:0,8	5	1	1	16	82	tr	1	1	tr	-	-		
F7	4,0	3	23	22	1:1,5	5	1	nd	80	11	3	2	3	tr	-	-		
F8	4,0**	2	47	17	1:0,5	9	nd	nd	47	39	3	3	5	1	1	1		

\*Determinado por microanálisis elemental

Rendimiento: % de la masa original (1g)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na

\*\*Obtenida al llevar a ebullición la fase en solución NaCl 4M para recuperar la muestra restante

En ambas columnas se observa que se obtuvieron fracciones similares en cuanto a su composición (básicamente, dos fracciones ricas en arabinosa, dos ricas en galactosa, y varias de composición mixta), aunque las mismas eluyeron a diferentes concentraciones de NaCl y con diferentes rendimientos. Este comportamiento, que muestra un cierto grado de falta de reproducibilidad, podría deberse a la formación de agregados entre los componentes iónicos del extracto, lo que dificultaría su correcta separación. La formación de estos agregados podría depender de diversas variables como la temperatura, la concentración de la solución de siembra, etc.

#### 5.3.2.2.2. Precipitación con cloruro de potasio

El método de precipitación con cloruro de potasio fue aplicado fundamentalmente en la purificación carragenanos, para la obtención de fracciones homogéneas. La base del mismo es la propiedad de galactanos sulfatados que contienen 3,6-anhidrogalactosa de formar geles en presencia de iones potasio (Matsuhira, 1995). No obstante, algunos polisacáridos de composición diferente también muestran este comportamiento, por lo que pueden ser purificados mediante esta técnica.

El fraccionamiento de V1 con cloruro de potasio produjo un precipitado muy evidente a una concentración de la sal de 0,115 M y una fracción soluble en KCl 2 M, no observándose precipitación alguna en las concentraciones intermedias utilizadas (**Tabla 5**). El mismo procedimiento se repitió reemplazando el cloruro de potasio por cloruro de sodio en el mismo rango de concentraciones (0 M-2 M) para determinar si se producía precipitación inespecífica dependiente de la concentración salina del medio. En este caso no se produjo precipitación de material con ninguna de las concentraciones de cloruro de sodio usadas.

El producto precipitado a KCl 0,115 M resultó ser un arabinano altamente sulfatado (A1, en adelante), mientras que en el material que quedó soluble en KCl 2 M predomina la galactosa (77 %). Esta fracción soluble fue sometida a un nuevo paso de precipitación con cloruro de potasio (**Tabla 6**) que permitió obtener una nueva fracción soluble enriquecida en galactosa (83 %) y con menor contenido de sulfato. Ninguna de las fracciones obtenidas por este procedimiento presentó porcentajes significativos de ácidos urónicos.

**Tabla 5.** Fraccionamiento de VI por precipitación con KCl

Fracción KCl	Rendimiento %	AT %	Sulfato %	AT:SO <sub>3</sub> Na %	Proteínas %	Monosacáridos (moles %)					
						Gal	Ara	Man	Xil	Ram	Fuc
0,115 M	29	35	47	1:1,8	1	3	97	-	-	-	-
2 M soluble	34	47	28	1:0,9	9	77	7	5	8	2	2

Rendimiento: % de la masa original (0,5 g)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na**Tabla 6.** Nuevo fraccionamiento con KCl de la fracción soluble en KCl 2M

Fracción KCl	Rendimiento %	AT %	Sulfato %	AT:SO <sub>3</sub> Na %	Proteínas %	Monosacáridos (moles %)						
						Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Rha	Fuc
2M	8	41	25	1:0,9	9	74	7	6	7	2	3	1
2M soluble	92	51	16	1:0,5	7	83	4	4	2	5	1	1

Rendimiento: % de la masa original (133 g)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na

### 5.3.2.3. Fraccionamiento de W1

El primer extracto con agua a 90° C (W1) de *Codium vermilara* representa el 4,3 % (p/p) del peso seco del alga y su principal componente es la manosa (~30 %). Su composición se muestra en la **Tabla 1**.

#### 5.3.2.3.1. Cromatografía de intercambio iónico

Este procedimiento fue el que permitió obtener las fracciones más ricas en manosa, aunque con bajo rendimiento. Las primeras tres fracciones eluidas (**Tabla 7**) presentaron contenido mayoritario de manosa. Se eligió la fracción con mayor contenido de manosa (94 %), obtenida con NaCl 0,5 M, para análisis estructurales adicionales que permitieron caracterizar al manano sulfatado de *Codium vermilara*. En adelante, se mencionará a esta fracción como MS.



**Tabla 7.** Fraccionamiento de W1 por cromatografía de intercambio iónico

Fracción	NaCl	Rendimiento	AT	Sulfato	AT:SO <sub>3</sub> Na	Proteínas	Monosacáridos (moles %)						
	M	%	%	%		%	Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Ram	Fuc
F1	0,1	2	29	31	1:1,6	3	3	1	84	7	2	3	tr
F2	0,5	2	67	12	1:0,3	2	2	tr	94	3	tr	1	tr
F3	1,0	2	32	23	1:1,1	28	15	2	56	14	5	5	3
F4	2,0	7	50	38	1:1,2	34	67	-	33	-	-	-	-
F5	4,0	12	44	48	1:1,5	4	33	47	16	2	2	tr	tr
F6	4,0*	2	54	18	1:0,5	2	17	3	7	67	2	3	1

Rendimiento: % de la masa original (1g)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na

\*Obtenida al llevar a ebullición la fase en solución NaCl 4M para recuperar la muestra restante

### 5.3.2.3.2. Precipitación con cloruro de potasio

Este procedimiento permitió obtener una fracción mayoritaria enriquecida en arabinosa (W1 KCl 0,1 M) (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Fraccionamiento de W1 por precipitación con KCl

Fracción	Rendimiento	AT	Sulfato	AT:SO <sub>3</sub> Na	Proteínas	Monosacáridos (moles %)						
	KCl	%	%	%	%	Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Rha	Fuc
0,1 M	32	33	15	1:0,6	27	7	41	12	38	-	2	-
0,5 M	6	47	29	1:0,8	5	5	67	11	16	-	-	-
1,5M	4	63	13	1:0,3	2	4	17	77	2	-	-	-
2M soluble	21	47	13	1:0,4	11	57	3	26	6	4	3	1

Rendimiento: % de la masa original (0,5g)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na

La fracción W1 KCl 0,1 M fue sometida a tratamiento con  $\alpha$ -amilasa (**Tabla 9**), y debido a la importante disminución observada en el contenido de glucosa, puede asegurarse que ésta provenía de glucanos de reserva, con enlaces  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), y no era parte de la pared celular. El contenido de arabinosa de W1 KCl 0,1 M se incrementó entonces de 41 % a 62 %, a la par que aumentaba el contenido de sulfato (relación molar azúcares:sulfato de 1:0,6 a 1:0,8).

**Tabla 9.** Caracterización de W1 KCl 0,1M tras el tratamiento con  $\alpha$ -amilasa

Rendimiento %	AT %	Sulfato %	AT:SO <sub>3</sub> Na 1:0,8	Monosacáridos (moles %)						
				Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Ram	Fuc
63	26	15		13	62	14	7	-	5	-

Rendimiento: % de la masa original (100 mg)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na

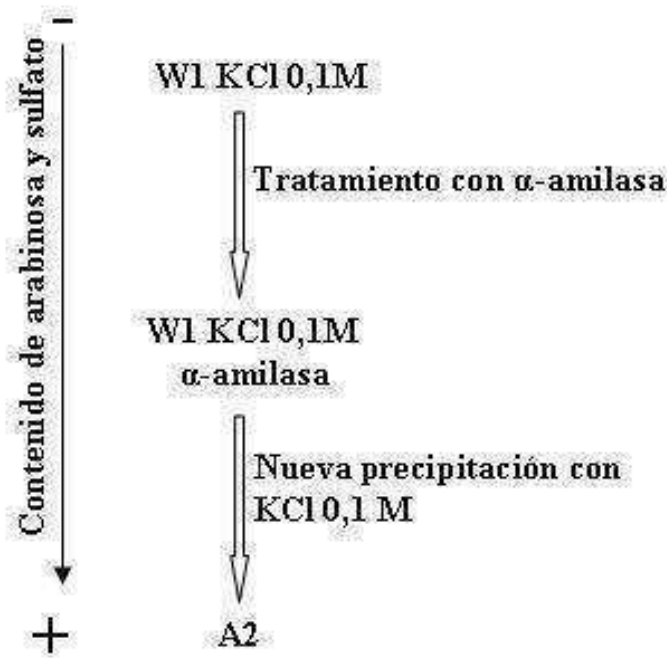
Un nuevo paso de precipitación con cloruro de potasio sobre la fracción tratada con amilasa permitió una mayor purificación, hasta obtener una fracción con 96 % de arabinosa y una relación molar azúcares: sulfato más alta (**Tabla 10**, ver esquema en la **Figura 6**), que nuevamente precipitó con una concentración de cloruro de potasio de 0,1 M. Esta fracción será llamada A2 de aquí en adelante, para distinguirla del arabinano A1 obtenido a partir de V1.

**Tabla 10.** Nuevo fraccionamiento con KCl a partir de la fracción W1 KCl 0,1M tratada con  $\alpha$ -amilasa

Fracción KCl	Rendimiento %	AT %	Sulfato %	AT:SO <sub>3</sub> Na	Monosacáridos (moles%)						
					Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Ram	Fuc
0 M	40	nd	nd	nd	24	29	22	20		6	-
0,1 M	23	33	38	1: 1,5	2	96	1	-	-	1	1
0,5 M	4	nd	nd	nd				nd			
2 M soluble	9	nd	nd	nd	35	7	39	10	5	4	-

Rendimiento: % de la masa original (60 mg)

Sulfato como SO<sub>3</sub>Na



**Figura 6-** Esquema de obtención de A2 mediante tratamiento con  $\alpha$ -amilasa y nueva precipitación con KCl a partir de la fracción rica en arabinosa original.

#### 5.3.2.4. Galactano sulfatado (G1)

Como se desprende de la descripción de los fraccionamientos realizados, se obtuvieron varias fracciones ricas en galactosa, con características similares y cierta variabilidad en el grado de sulfatación. Dos de ellas, obtenidas por diferentes procedimientos, se eligieron para realizar análisis adicionales (**Tabla 11**), y debido a su similitud estructural se las considera equivalentes. Se trata de la fracción eluida con NaCl 0,75 M en cromatografía de intercambio iónico y del producto soluble en KCl 2 M que resta tras la precipitación de la fracción rica en arabinosa a concentraciones menores. De aquí en adelante, se mencionarán indistintamente como G1. Por otro lado, tanto por cromatografía de intercambio iónico como por nueva precipitación de V1 KCl 2M soluble se obtuvieron, con menor rendimiento, fracciones ricas en galactosa pero con mayores niveles de sulfatación. Las diferencias entre estas fracciones podrían atribuirse tanto a la variabilidad propia de los polisacáridos de la pared celular como a la influencia de las técnicas y condiciones de obtención de cada una de ellas.

**Tabla 11.** Resumen de las fracciones ricas en galactosa de VI elegidas para análisis adicionales (G1)

Procedimiento	Condiciones	AT:SO <sub>3</sub> Na	Proteínas %	Ácido Pirúvico %	Monosacáridos (moles %)						
					Gal	Ara	Man	Glc	Xil	Ram	Fuc
Cromatografía de intercambio iónico	Elución con NaCl 0,75 M	1:0,3	13	3	86	2	1	3	5	2	1
Precipitación con KCl	Soluble en KCl 2M	1:0,5	7	2	83	4	4	2	5	1	1

La determinación del signo y valor del poder rotatorio de un polisacárido con aquellos reportados en la literatura es una de las formas de determinar la configuración de las unidades presentes en el polímero (Matsuhiro, 1995). Para G1 se determinó un poder rotatorio específico de  $[\alpha]_D = +12,9^\circ$ , más cercano al reportado para el metil- $\beta$ -galactopiranosido ( $[\alpha]_D = -2/0$ , valor calculado y observado, respectivamente) que para el metil- $\alpha$ -galactopiranosido ( $[\alpha]_D = +386/380$ , valor calculado y observado, respectivamente) (Stroyan y Stevens, 2000).

El análisis por metilación es una herramienta de uso muy habitual en el estudio estructural de polisacáridos, ya que permite obtener información acerca de las uniones y sustituciones presentes sobre la cadena de carbohidrato (Matulewicz, 1995). El método consiste en la metilación exhaustiva de la muestra (todos los hidroxilos libres dan éteres metílicos), su hidrólisis y finalmente su derivatización para ser analizada mediante cromatografía gaseosa. Las uniones glicosídicas son estables en el medio alcalino donde se desarrolla la metilación, mientras que los metil ésteres formados en ella son estables en el medio ácido diluido en que ocurre la hidrólisis. De este modo, la posición de los grupos hidroxilo (derivatizados según el método usado) en los monosacáridos parcialmente metilados indica las uniones presentes en el polisacárido original. Y por el contrario, la posición de los grupos metoxilo indica qué hidroxilos se encontraban libres. Por último, la metilación en C-4 o en C-5 informa acerca del tipo de anillo presente (piranosico o furanosico, respectivamente).

En el caso de los polisacáridos sulfatados, el análisis por metilación suele complementarse con la desulfatación del polímero seguida de metilación, para precisar la posición de los grupos éster sulfato y de los enlaces glicosídicos (Matulewicz, 1995).

Al comparar los resultados del análisis por metilación de un polisacárido sulfatado y del producto de su desulfatación, si se observa que una posición que no se metilaba en el compuesto original sí lo hace en el polisacárido desulfatado, puede inferirse la presencia de un grupo éster sulfato en dicha ubicación.

Los resultados del análisis por metilación de G1 se muestran en la **Tabla 12**. Las asignaciones de los picos de cromatografía gaseosa correspondientes a los alditoles peracetilados parcialmente metilados se confirmaron por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa en los casos en que fue necesario.

**Tabla 12.** Análisis de metilación de G1

Monosacárido*	Unidad**	%
2,3,4,6-Gal	Gal <sub>p</sub> (1→	2
2,4,6-Gal	→3)Gal <sub>p</sub> (1→	23
2,6-Gal	3,4PirGal <sub>p</sub> (1→ o →3)Gal <sub>p</sub> 4S(1→	24
2,4-Gal	→3)Gal <sub>p</sub> 6S(1→	7
2-Gal	→3)Gal <sub>p</sub> 4,6S(1→	37
4Gal+Gal	?	7

\*Los números indican la posición de los grupos metilo.

\*\*Los números indican posición de sustitución en la unidad original

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica no degradativa que se basa en un fenómeno que ocurre en el núcleo de ciertos átomos en presencia de un campo magnético intenso y homogéneo (Stortz, 1995). Estos átomos se caracterizan por poseer un número atómico impar (es decir, espín nuclear no nulo), como es el caso de isótopo de  $^1\text{H}$  y del carbono  $^{13}\text{C}$ . En estos casos se produce la alineación del espín nuclear a favor o en contra del campo magnético. A determinada frecuencia de irradiación (en el rango de las ondas de radio), combinada con un campo magnético de cierta intensidad, se produce la inversión del espín en los núcleos que constituye el fenómeno de resonancia magnética. Las condiciones en que se produce ese fenómeno varían en función del entorno químico y electrónico en que se encuentra un núcleo. Este es el fundamento de las técnicas de RMN. Los espectros de RMN se toman aplicando un campo magnético de intensidad creciente, a una dada frecuencia, y

registrando la intensidad de campo a la cual se produce la resonancia. De este modo se obtienen espectros donde la posición de las señales o picos corresponde a unidades  $\sigma$  de desplazamiento químico respecto de un compuesto de referencia. El desplazamiento químico, expresado como partes por millón (ppm), es dependiente del entorno del átomo, que puede estar “protegido” o “desprotegido” del campo aplicado por efecto de los átomos y electrones vecinos, de forma tal que el desplazamiento se produzca hacia campos más altos o más bajos, respectivamente.

La RMN protónica tiene una complejidad adicional debido a que cada protón recibe la influencia no sólo del campo magnético aplicado sino también del espín de los protones de los carbonos adyacentes, en un fenómeno conocido como acoplamiento espín-espín. Esto produce un desdoblamiento de las señales que se observan en los espectros. El número de picos en que se desdobra una señal y la separación entre ellos da una idea del entorno en que se encuentra un protón (Stortz, 1995). La constante de acoplamiento (J) expresa la magnitud de la separación entre señales desdobladas.

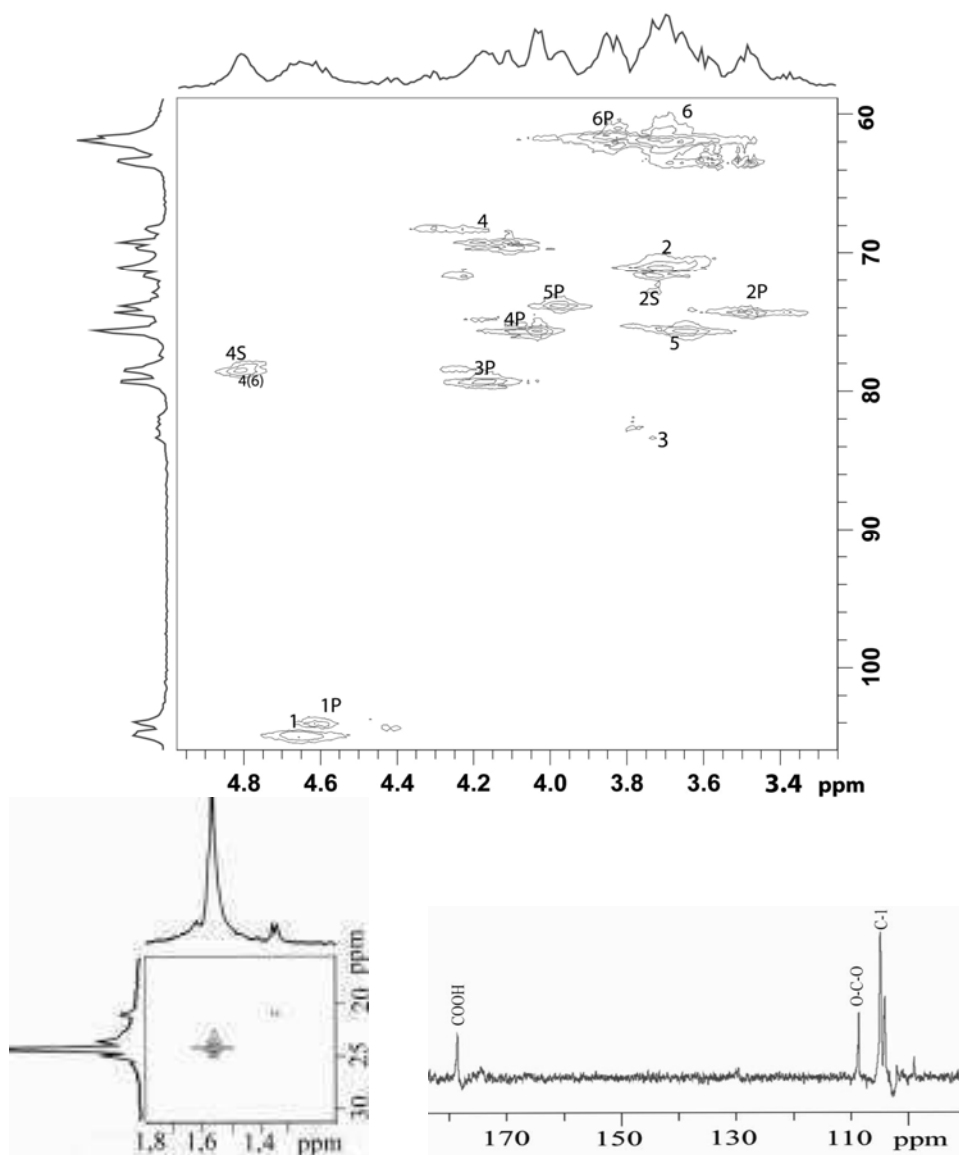
En el análisis de polisacáridos mediante RMN aporta información respecto de la configuración de las unidades presentes, la posición y el tipo de enlaces y la sustitución y modificaciones sobre los monosacáridos (sulfatación, metilación, desoxiazúcares, etc.). Se usan tanto técnicas unidimensionales de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) como bidimensionales (HMQC, HMBC, COSY) que combinan ambos tipos de espectros.

Junto con los espectros de resonancia magnética nuclear de G1 que se muestran a continuación (**Figura 7, Tabla 13**), los resultados del análisis por metilación confirman que se trata de un polímero donde las unidades de D-galactopiranososa se enlazan por C-3. Predominan las unidades de galactopiranososa disustituidas en C-4 y C-6 (37 %). Las sustituciones en C-6 podrían corresponder tanto a ramificaciones con unidades de galactosa como a grupos sulfato. Le siguen en importancia el conjunto de unidades no sustituidas de cadena (23 %) y aquellas que presentan sustituciones con sulfato en C-4 y/o unidades terminales con ácido pirúvico en C-3 y C-4. Las unidades metiladas en C-4 y sin metilar se explican probablemente por cierto nivel de submetilación de la muestra. Finalmente, las unidades metiladas en C-2 podrían corresponder tanto a unidades disulfatadas en C-4 y C-6 como a unidades piruviladas en esas posiciones y enlazadas por C-3.

**Tabla 13.** Asignación de las señales del espectro HMQC de G1

Unidad estructural	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5/C5	H6/C6
→3)β-D-Galp(1→	4,66/104,9	3,71/71,1	3,74/82,9	4,11/69,2	3,64/75,6	3,69/61,8
3,4-Pir β-D-Galp(1→	4,61/104,1	3,48/74,3	4,17/79,3	4,11/75,6	3,97/73,9	3,82/61,7
→3)β-D-Galp 4S(1→	4,67/104,9	3,71/71,8	nd/78,6	4,81/78,4	3,64/75,6	3,69/61,9
→3,6)β-D-Galp(1→	4,67/104,9	3,72/71,8	nd/79,6	4,81/78,8	3,64/74,5	3,69/nd

nd: no determinado



**Figura 7-** Arriba: espectro bidimensional HMQC de G1. Los números corresponden al carbono y protón asignado; *P* indica unidades 3,4 piruviladas; *S* indica unidades sulfatadas en C-4; (6) indica unidades sustituidas en C-6. Abajo, izquierda: sector del espectro HMQC de G1 con las

señales asignadas al CH<sub>3</sub> de las unidades piruviladas; derecha: fragmento del espectro <sup>13</sup>C de G1 donde se muestran las señales asignadas a los grupos COOH y O-C-O del ácido pirúvico (178,8 y 108,8, respectivamente).

Los espectros de RMN de G1 fueron analizados en base a las asignaciones reportadas anteriormente para los galactanos piruvilados sulfatados de *C. yezoenze* y *C. isthmocladum* (Bilan et al., 2007; Farias et al., 2008). La estructura de estos polímeros es muy similar a la que surge de la caracterización química de G1 y la mayor parte de las señales observadas en los espectros de este último polisacárido pudieron relacionarse con las reportadas en los trabajos mencionados. En todos los casos, se trata de polisacáridos formados por unidades de β-D-galactopiranosas unidas por C-3 con sustituciones en C-4 y/o C-6 atribuidas tanto a grupos sulfato como a acetales de ácido pirúvico y ramificaciones.

También se observaron las señales correspondientes a las unidades piruviladas (CH<sub>3</sub>: 1,55/24,2, O-C-O: 108,8 y COOH: 178,8) asignadas de acuerdo a los valores reportados por Bilan y colaboradores (2007) (**Figura 7**).

La fracción G1 fue sometida a desulfatación asistida por horno de microondas (Navarro y Stortz, 2007), obteniéndose un galactano desulfatado (G1D, **Tabla 14**) con un rendimiento de 51%. Este polímero aún presentó un cierto contenido de sulfato (< 3%), y un contenido de hidratos de carbono de 75%. Las diferencias en el análisis por metilación respecto del compuesto original permiten confirmar las inferencias hechas sobre el patrón de sulfatación y las demás sustituciones. En este caso se registra un incremento de sustitución con grupos metilo en las posiciones C-4 y C-6 (las unidades 2,4,6-Gal pasan de 23 a 61 %), debido a la pérdida de grupos sulfato. Por otro lado, desaparecen las unidades correspondientes a monosacáridos disulfatados en C-4 y C-6 (2-Gal) y monosulfatados en C-6 (2,4-Gal). En las condiciones en las que se realizó la desulfatación se produjo también una pérdida de las unidades piruviladas. Esto se observa en el incremento de las unidades de 2,3,4,6-Gal y la disminución de las unidades 2-Gal y 2,6-Gal (aunque en este último caso la pérdida también se debe a la desulfatación de la posición 4).



**Tabla 14.** Análisis de metilación de G1 y G1D

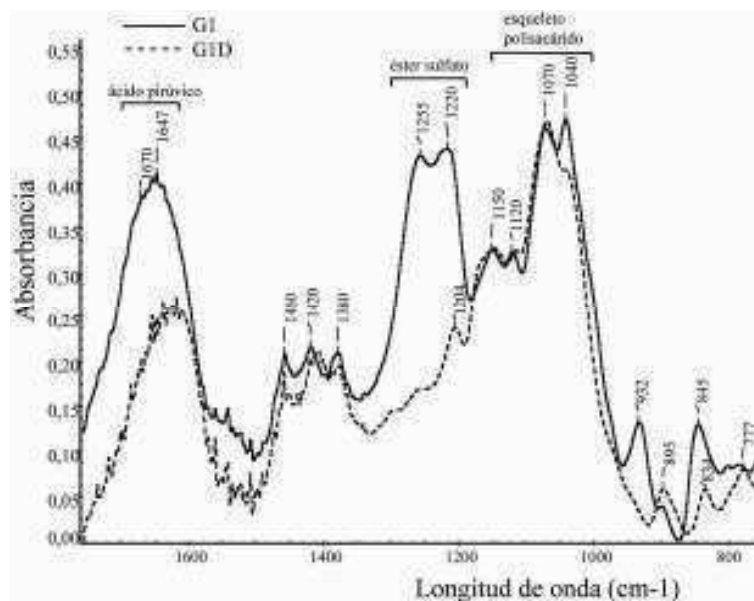
Monosacárido*	Unidad**	G1	G1D
		%	%
2,3,4,6-Gal	Gal <sub>p</sub> (1→	2	36
2,4,6-Gal	→3)Gal <sub>p</sub> (1→	23	61
2,3,4- o 2,3,6-Gal	?	-	2
2,6-Gal	3,4PirGal <sub>p</sub> (1→ o →3)Gal <sub>p</sub> 4S(1→	24	1
2,4-Gal	→3)Gal <sub>p</sub> 6S(1→	7	-
2-Gal	→3)Gal <sub>p</sub> 4,6S(1→	37	-
4Gal+Gal	?	7	-

Los datos de G1 se incluyen a fin de facilitar la interpretación de los resultados.

\*Los números indican la posición de los grupos metilo.

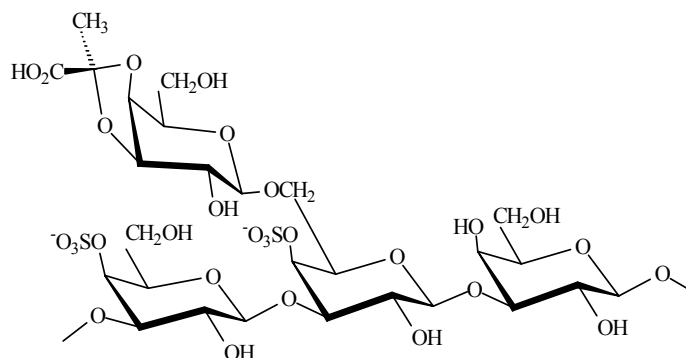
\*\*Los números indican posición de sustitución en la unidad original.

Los espectros de FTIR de G1 y G1D (**Figura 8**) difieren fundamentalmente en la absorbancia a longitudes de onda relacionadas con los grupos sulfato (regiones 1220-1260, 830-930 $\text{cm}^{-1}$ ), mientras que la zona correspondiente a la “huella dactilar” del esqueleto del polisacárido es muy similar. Por otro lado, hay también diferencias en la zona de 1650 a 1715  $\text{cm}^{-1}$ , donde aparecen bandas características de los grupos funcionales presentes en el ácido pirúvico, confirmando la pérdida de unidades piruviladas observada en el análisis por metilación.



**Figura 8-** Espectros de FTIR de G1 y G1D.

En base a los resultados obtenidos en los diferentes análisis, se propone una posible secuencia para un fragmento de G1 (**Figura 9**), en la que aparecen las unidades mayoritarias.



**Figura 9-** Posible estructura de un fragmento de G1.

### 5.3.2.5. Arabinanos sulfatados

#### 5.3.2.5.1. Arabinano sulfatado de V1 (A1)

Un arabinano de gran pureza (A1, 97 % de arabinosa) y altamente sulfatado, se obtuvo por precipitación con cloruro de potasio a partir de V1. Este producto representa cerca del 30% (p/p) de V1, y se determinó para él un peso molecular promedio numérico de 180 kDa por dosaje de extremos reductores. El análisis por metilación de A1 (**Tabla 15**) muestra que los residuos de L-arabinosa se encuentran unidos por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), con predominio de unidades disustituidas por grupos sulfato en C-2 y C-4, lo cual coincide con el alto grado de sulfatación determinado a partir de la razón molar azúcares totales:sulfato (1:1,8). No obstante, es posible que durante el proceso de metilación haya habido un cierto grado de pérdida selectiva de las unidades disulfatadas, ya que el porcentaje de las mismas debería haber sido un poco mayor de 50 %, como se desprende del análisis inicial de la muestra y los espectros de RMN.

**Tabla 15.** Análisis de metilación de A1

Monosacárido*	Unidad**	%
2,3,4-Ara	Ara <sub>p</sub> (1→	1
2,4-Ara	→3)Ara <sub>p</sub> (1→	13
2-Ara	→3)Ara <sub>p</sub> 4S(1→	26
4-Ara	→3)Ara <sub>p</sub> 2S(1→	10
Ara	→3)Ara <sub>p</sub> 2,4S(1	50

\*Los números indican la posición de los grupos metilo.

\*\*Los números indican posición de sustitución en la unidad original.

Adicionalmente, se realizó la desulfatación asistida por microondas de este polisacárido obteniendo A1D (rendimiento 65%), cuyo análisis por metilación permitió confirmar las características estructurales propuestas para el compuesto original, tanto el tipo de enlace presente como la forma piranósica de las unidades de arabinosa y la posición de los grupos sulfato (**Tabla 16**). En el arabinano desulfatado (4,5 % de sulfato, poder rotatorio específico  $[\alpha]_D^{25} = + 50.3^\circ$ ) las unidades de cadena y terminales sin sustituir suman el 91 % del total, encontrándose bajos porcentajes de residuos monosulfatados que resistieron el proceso de desulfatación, y sólo un 1 % de residuos disulfatados en C-2 y C-4 (mientras que el porcentaje en A1 era de 50% de unidades con dos grupos sulfato).

**Tabla 16.** Análisis de metilación de A1 y A1D

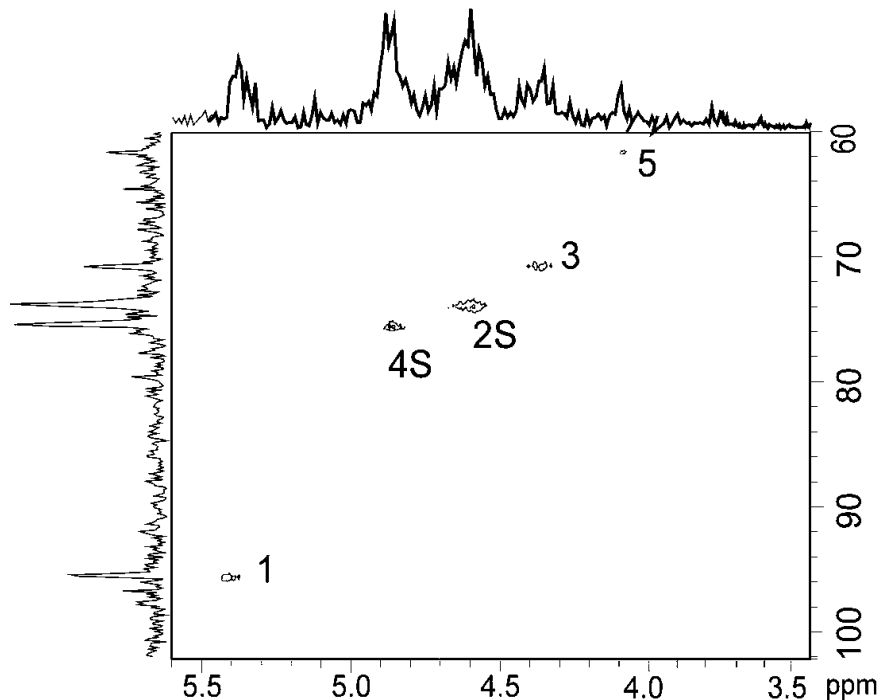
Monosacárido*	Unidad**	A1	A1D
		%	%
2,3,4-Ara	Ara <sub>p</sub> (1→	1	3
2,4-Ara	→3)Ara <sub>p</sub> (1→	13	88
2-Ara	→3)Ara <sub>p</sub> 4S(1→	26	5
4-Ara	→3)Ara <sub>p</sub> 2S(1→	10	3
Ara	→3)Ara <sub>p</sub> 2,4S(1→	50	1

Los datos de A1 se incluyen a fin de facilitar la interpretación de los resultados.

\*Los números indican la posición de los grupos metilo.

\*\*Los números indican posición de sustitución en la unidad original.

El espectro bidimensional HMQC de A1 muestra sólo cinco picos principales (**Figura 10, Tabla 17**). La configuración  $\beta$ -L de las unidades de arabinosa se infirió a partir del espectro de A1D (**Figura 11, Tabla 17**) y del poder rotatorio específico de A1 ( $[\alpha]_D = +167.5^\circ$ ) (Il'in et al., 1985; Paradowska et al., 2008).



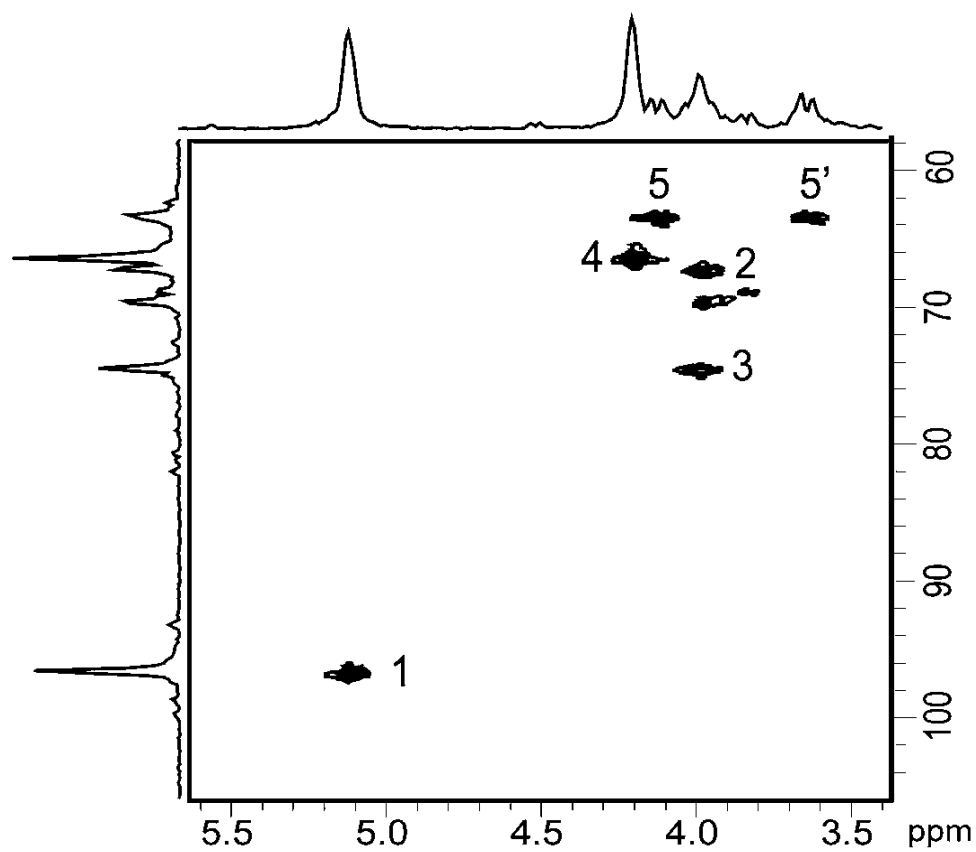
**Figura 10-** Espectro bidimensional HMQC de A1.

**Tabla 17.** Asignación de las señales de los espectros HMQC de A1 y A1D

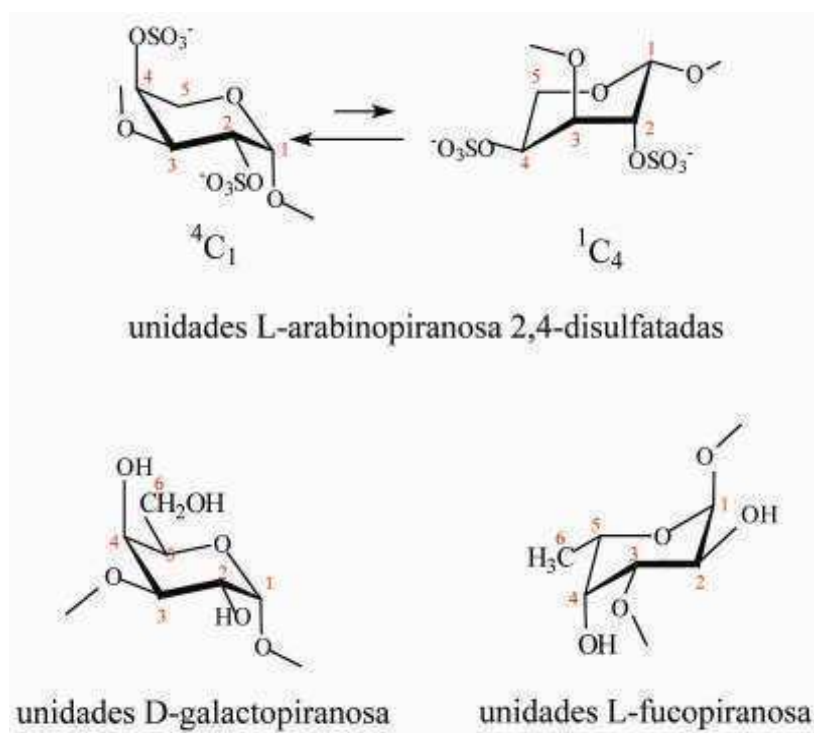
Polisacárido	Desplazamiento químico (ppm)				
	H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5,H5'/C5
A1D	5,12/97,0	3,96/67,6	3,98/74,8	4,19/66,7	4,09-3,63/63,7
A1	5,37/95,5	4,59/78,8	4,36/70,8	4,87/75,4	4,07/61,6

El desplazamiento hacia campos mayores de C-1 se debe a la influencia del grupo sulfato en C-2 (Stortz y Cerezo, 1992; Nosedá y Cerezo, 1993), lo mismo puede decirse acerca de C-5 y la influencia del sulfato en C-4. Un  $\alpha$ -L-galactano sulfatado (Cinelli et al., 2010) y un  $\alpha$ -L-fucano sulfatado (Pereira et al., 2002), cuya configuración es similar a la del arabinano de *Codium vermilara* (**Figura 12**) mostraron resultados semejantes en sus espectros. Además, las constantes de acoplamiento  $J_{H,H}$  experimental y calculada inicialmente para H1-H2 y H2-H3 para galactanos y fucanos con similar configuración

confirman una conformación preferencial  ${}^4C_1$  para el ciclo de arabinosa piranósica (Becker et al., 2007).



**Figura 11-** Espectro bidimensional HMQC de AID.



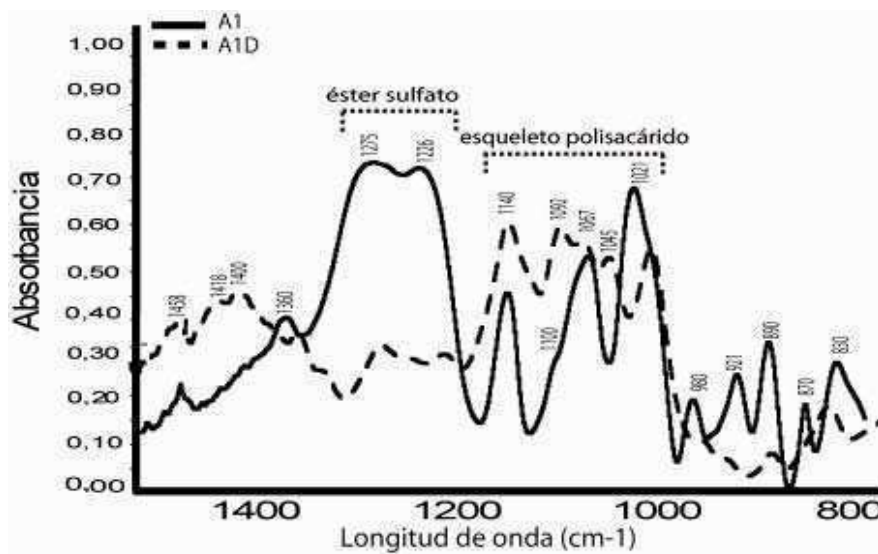
**Figura 12-** Conformación preferencial de unidades  $\beta$ -L-arabinopiranososa comparada con la de  $\alpha$ -D-galactopiranososa y  $\alpha$ -L-fucopiranososa enlazadas por C-3. Los números en rojo indican la posición de los carbonos C-1, C-2, etc.

Por otro lado, la señal de 61,6 ppm correspondiente al C-5 de estas unidades (Bock y Pedersen, 1983) confirma esta asignación, teniendo en cuenta que un sulfato axial sobre C-4 provoca un desplazamiento hacia campos más altos en la señal de dicho carbono (Stortz y Cerezo, 1992). Los desplazamientos observados para C-2 y C-4 son los esperables dada la sustitución por grupos sulfato, e igualmente para C-3 por la influencia de la unión glicosídica.

El espectro de HMQC de A1D (**Figura 11**, **Tabla 17**) presenta cinco picos principales asignados a unidades arabinopiranososa considerando los valores reportados para los metil  $\beta$ -D-( $\beta$ -L)- y  $\alpha$ -D-( $\alpha$ -L)-arabinopiranosidos (Bock y Pedersen, 1983; Zhuo et al., 2008), la 3-O-L-arabinopiranosil-L-arabinosa (Odonmažig et al., 1994), el residuo L-arabinopiranosil terminal no reductor, unido a C-3 de una Ara $\beta$ , de un oligosacárido (Ishii et al., 2005), y los efectos de glicosilación en disacáridos con una aglicona piranósica con el protón ecuatorial en uno de los carbonos  $\beta$  (Shashkov et al., 1988).

Las señales anoméricas en ambos espectros  $^1\text{H}$  NMR (5,37 y 5,12 ppm, en A1 y A1D, respectivamente) concuerdan con la conformación propuesta (unidades de  $\beta$ -L-arabinopiranososa en forma de silla  $^4\text{C}_1$ ), mientras que el desplazamiento a campos más bajos del protón anomérico del polímero original respecto del de su desulfatado apoya la propuesta de una sulfatación en C-2.

Asimismo, los espectros de FTIR de A1 y A1D se compararon, observándose diferencias importantes en la intensidad de la absorbancia a longitudes de onda características de la sustitución con grupos sulfato: región 1220-1250  $\text{cm}^{-1}$  y picos a 830, 870, 890, 920 y 980  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que la región correspondiente a la “huella dactilar” del esqueleto de ambos polisacáridos es similar (**Figura 13**, ver **Tabla Anexa FTIR**).



**Figura 13-** Espectros FTIR del arabinano sulfatado de A1 y A1D.

### 5.3.2.5.2. Arabinano sulfatado de W1 (A2)

Una vez lograda la purificación del arabinano sulfatado presente en este extracto a través de los sucesivos pasos aplicados (tratamiento con  $\alpha$ -amilasa y nueva precipitación con KCl 0,1 M, lo que permitió pasar de 41 a 95 % arabinosa), la fracción obtenida (A2) se analizó por metilación (**Tabla 18**). A diferencia de A1 (50 % de unidades

disulfatadas en C-2 y C4), en el de A2 predominan las unidades monosulfatadas (~37 %, principalmente en C-4 y en menor medida en C-2), seguidas por los residuos sin sustituir (35%) y disulfatados (22%). Esto se corresponde con el menor grado de sulfatación estimado a partir de la relación molar azúcares totales:sulfato (1:1,8 en el caso de A1 y 1:1,5 en el de A2).

**Tabla 18.** Análisis de metilación de A2

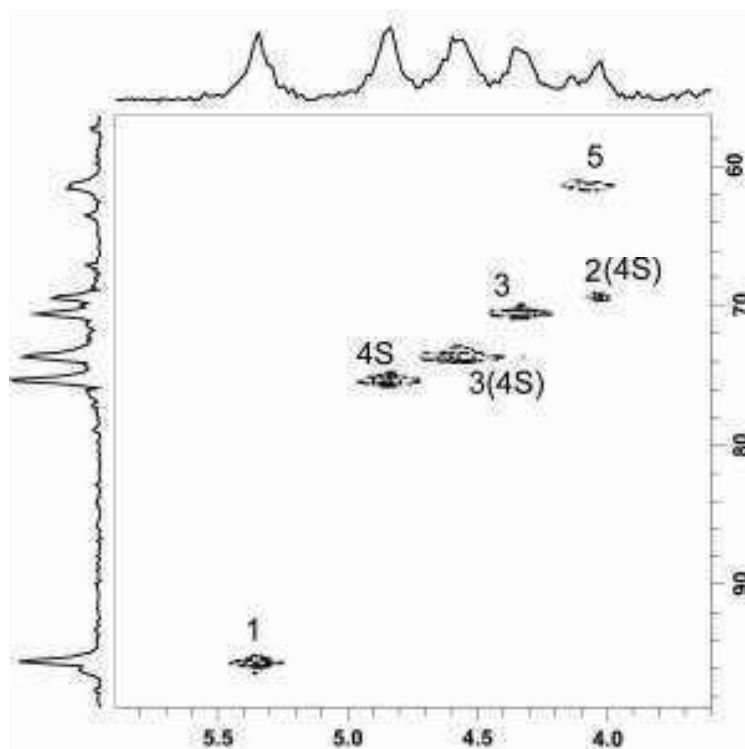
Monosacárido*	Unidad**	%
2,3,4-Ara	Arap (1→	6
2,4-Ara	→3)Arap (1→	35
2-Ara	→3)Arap 4S(1→	30
4-Ara	→3)Arap 2S(1→	7
Ara	→3)Arap 2,4S(1→	22

\*Los números indican la posición de los grupos metilo.

\*\*Los números indican posición de sustitución en la unidad original.

En los espectros de resonancia magnética nuclear de A2 (**Figura 14**) se observan las mismas señales principales que en el caso de A1, pero además hay dos señales a 4,03/69,5 y 4,57/73,7 ppm que fueron tentativamente asignadas a H2/C2 y H3/C3, respectivamente, de unidades de arabinopiranosas monosulfatadas en C-4 (**Tabla 19**).





**Figura 14** - Espectro bidimensional HMQC de A2. 4S: H4/C4 correspondiente a C-4 sulfatado; 3(4S): H3/C3 de unidades sulfatadas en C-4; 2(4S): H2/C2 de unidades sulfatadas en C-4.

**Tabla 19.** Asignación de las señales del espectro HMQC de A2

Desplazamiento químico (ppm)				
H1/C1	H2/C2	H3/C3	H4/C4	H5,H5'/C5
5,37/95,5	4,03/69,5	4,36/70,8 4,57/73,7	4,87/75,4	4,07/61,6

### 5.3.2.6. Manano sulfatado (MS)

La fracción MS, eluida con NaCl 0,5M en una columna de cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Sephadex A-25 se eligió para caracterizar el manano sulfatado sintetizado por *Codium vermilara*. Por el método de Park y Johnson (1949) se determinó un peso molecular promedio numérico <10 kDa. El análisis por metilación de MS (**Tabla 20**) mostró que se trata de un polímero con una estructura básica similar a la del manano fibrilar, formado principalmente por unidades de  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-manopiranososa

no sustituidas (unidades 2,3,6-trimetiladas), seguidas por un porcentaje importante de unidades sustituidas con grupos sulfato en posición C-2.

**Tabla 20.** Análisis de metilación de MS.

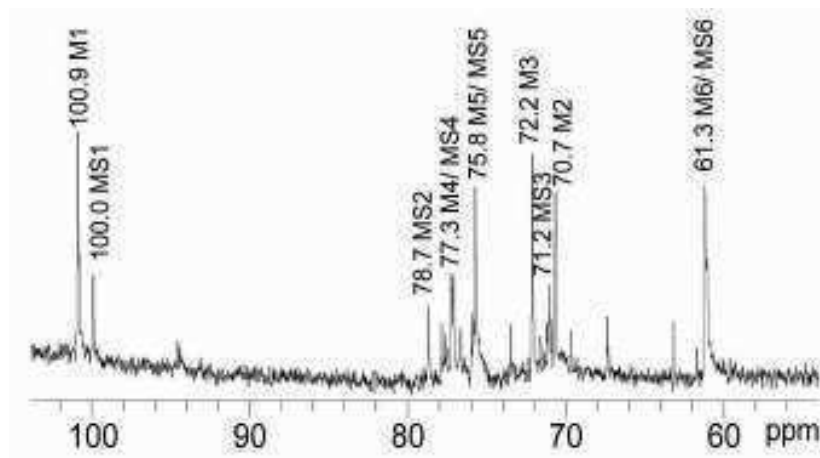
Monosacárido*	Unidad**	%
2,3,4,6-Man	Man <sub>p</sub> (1→	3
2,4,6-Man	-	1
2,3,6-Man	→4)Man <sub>p</sub> (1→	63
3,6-Man	→4)Man <sub>p</sub> 2S(1→	23
2,3-Man	→4)Man <sub>p</sub> 6S(1→	2
3-Man	-	1
Man	-	1
2,3,6-Glc	-	2
2,6-Gal	-	2
Glc	-	2

\*Los números indican la posición de los grupos metilo.

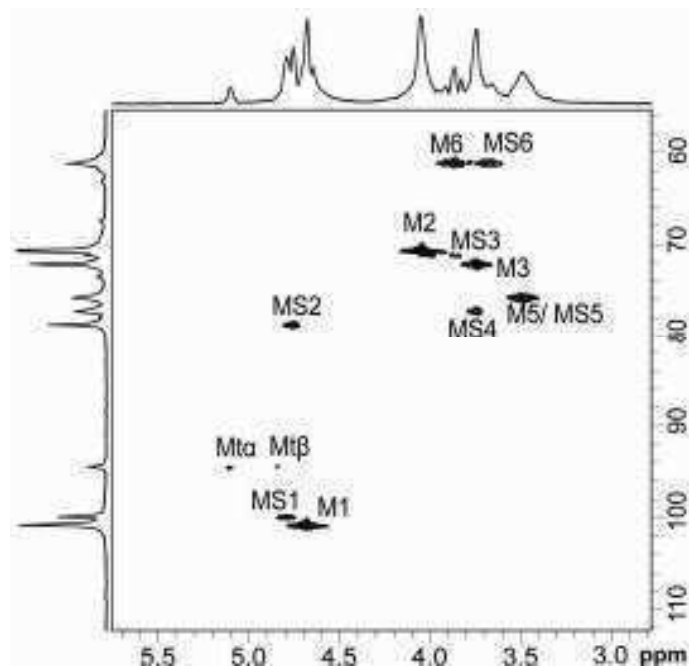
\*\*Los números indican posición de sustitución en la unidad original.

La ausencia de un porcentaje significativo de unidades terminales no reductoras (es decir, tetrametiladas, con un 3%) confirma la estructura lineal de este manano y la sustitución por grupos sulfato (y no por ramificaciones con unidades de manosa). También se encontraron pequeñas cantidades de unidades enlazadas por C-4 sustituidas en C-6, que podría corresponder a sustituciones con sulfato tanto como a ramificaciones simples de  $\beta$ -D-manosa. Previamente, se detectaron cantidades significativas de unidades de 2,3-di-*O*-metilmanosa (6,5%) en el análisis por metilación del extracto W1 (Ciancia et al., 2007). Las diferencias observadas en el porcentaje de estas unidades en ambas muestras (el extracto W1 y la fracción MS) puede explicarse por el hecho de que esta última sólo representa alrededor de un tercio del manano total presente en el extracto original, y el fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico realizado pudo haber arrojado como resultado mananos con ciertas variaciones en sus patrones de sustitución. Las restantes unidades presentes (Man, 3-Man y 2,4,6-Man), todas ellas con porcentajes de ~1%, podrían atribuirse a submetilación de la muestra.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de esta fracción (**Figuras 15 y 16, Tabla 21**) se analizaron teniendo en cuenta la información previamente publicada (Cardoso et al., 2007), y confirmaron la estructura propuesta a partir del análisis por metilación, con sustituciones de sulfato en C-2. Pudieron detectarse además pequeñas señales correspondientes a las unidades de los extremos terminales reductores y no reductores (Davis et al., 1995).



**Figura 15-** Espectro  $^{13}\text{C}$  de MS. M1-6: unidades de manosa no sulfatadas, MS1-6: unidades de manosa sulfatadas en C-2.



**Figura 16-** Espectro HMQC de MS. M1-6: unidades de manosa no sulfatadas, MS1-6: unidades de manosa sulfatadas en C-2, M1a-β: unidades terminales de manosa.

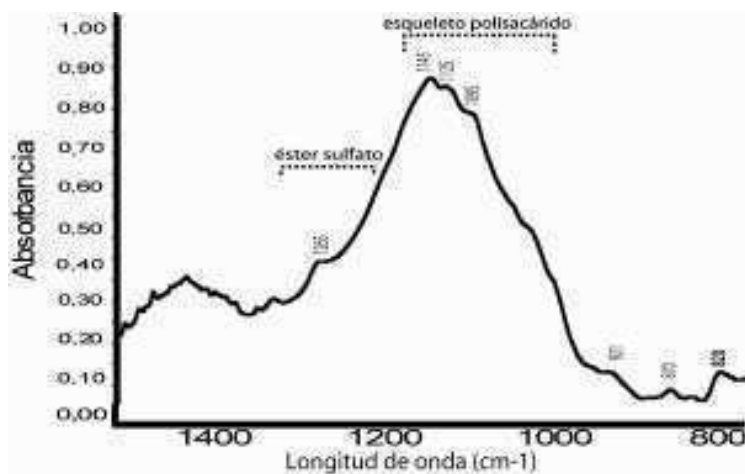
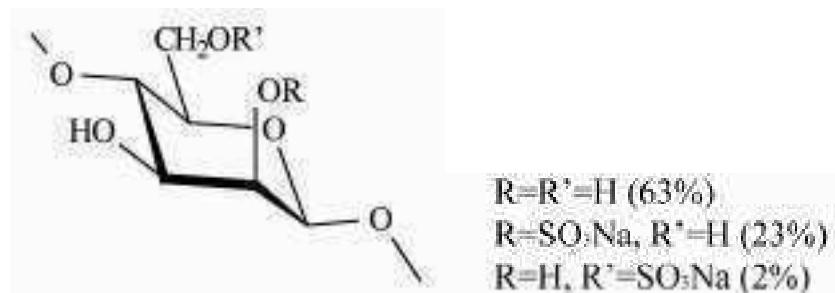
**Tabla 21.** Asignación de las señales del espectro HMQC de MS

Unidad estructural	C-1/H-1	C-2/H-2	C-3/H-3	C-4/H-4	C-5/H-5	C-6/H6,6'
→4) β-D-Man	100,9/4,69	70,7/4,02	72,1/3,74	77,3/3,76	75,7/3,48	61,2/3,66-3,60
→4) β-D-Man 2S	99,9/4,78	78,7/4,75	71,1/3,88	77,1/3,36	75,9	61,1/3,38-3,85
→4) β-D-Man red	94,2/4,82					
→4) α-D-Man red	94,3/5,09		69,6/3,92			
→4) β-D-Man no			73,4/3,59	67,3/3,49	76,7	61,7

red: Extremo reductor

no red: Extremo no reductor

La **Figura 17** muestra el espectro de FTIR de MS, donde se observan, aunque poco definidos, algunos picos a longitudes de onda correspondientes a sustitución con grupos sulfato, además de aquellas que constituyen la zona de la huella dactilar del polímero. En la **Figura 18** se muestra la estructura de las unidades de β-D-manopiranososa que componen MS.

**Figura 17-** Espectro de FTIR de MS.**Figura 18-** Unidad de →4)-β-D-manopiranososa-(1→ que componen MS.

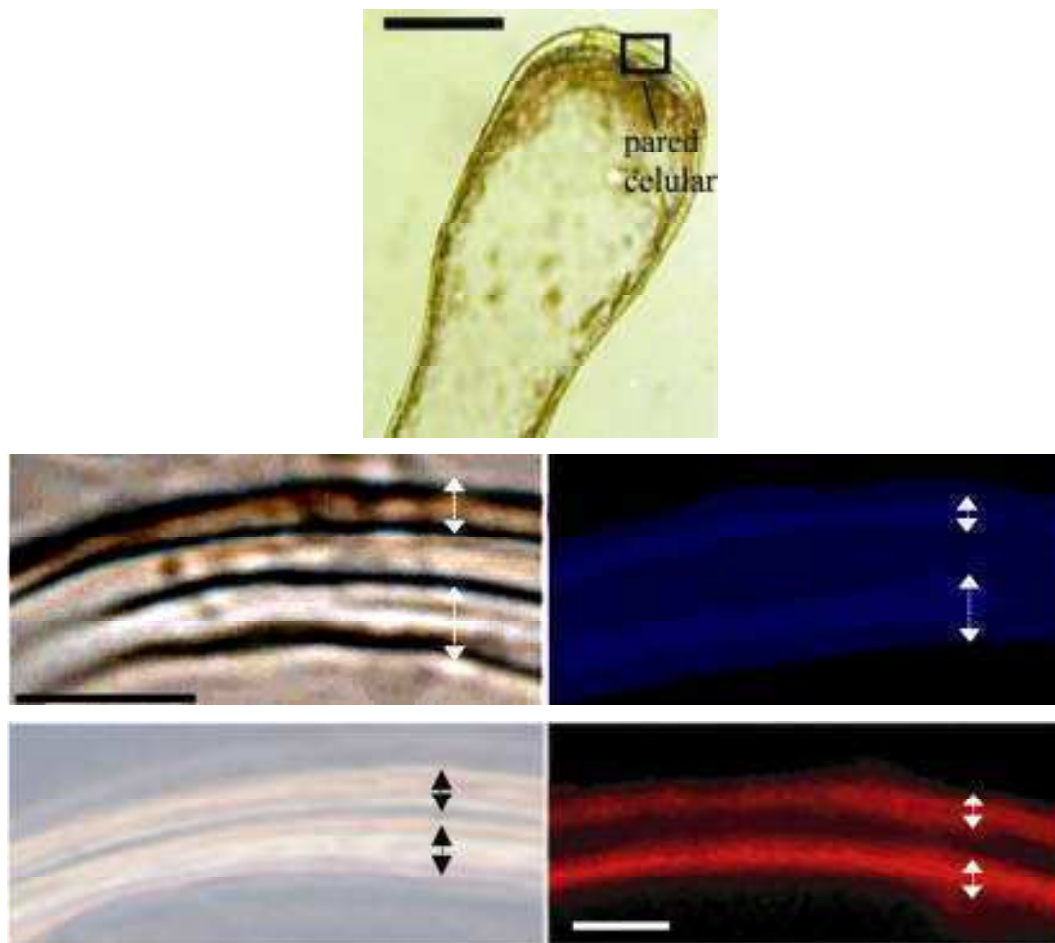
#### 5.4. Localización *in situ* de biomoléculas componentes de la pared

Una vez identificados y caracterizados los principales componentes de las paredes celulares de *Codium vermilara*, las técnicas de localización *in situ*, combinando microscopía óptica y confocal con técnicas de tinción e inmunomarcación, permitieron analizar la forma en la que los mismos se disponen para dar origen a la compleja estructura que forman.

La microscopía láser confocal, en particular, es un tipo de microscopía de fluorescencia que permite la obtención de imágenes de gran nitidez a partir de material de cierto espesor. Un haz de láser con luz focalizada ilumina distintos planos focales, barriendo punto por punto (en sentido horizontal – ejes  $x$  e  $y$  - y también vertical – eje  $z$ ). En esta técnica se genera una imagen compuesta a partir la fluorescencia emitida por cada punto (eliminando el ruido que genera la emisión por fuera del plano focal).

##### 5.4.1. Manano neutro

Inicialmente, la tinción con Calcofluor White (CW) permitió determinar la ubicación de polisacáridos fibrilares en la pared celular de *Codium vermilara*. La marcación con anticuerpos que detectan específicamente la presencia de unidades  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manosilo permitió caracterizar la fracción fibrilar del alga. La birrefringencia de la pared celular (es decir, la propiedad de desdoblar la luz incidente en dos haces polarizados perpendiculares entre sí) fue observada con microscopía de contraste de fases, y la inmunomarcación con microscopía confocal gracias al uso de un anticuerpo secundario acoplado con Alexa Fluor 488. Se usó un anticuerpo policlonal (Mab) desarrollado por Handford y colaboradores (2003) Se encontró que estos polímeros se ubican en dos capas bien definidas separadas por una zona central no reactiva (**Figura 19**).



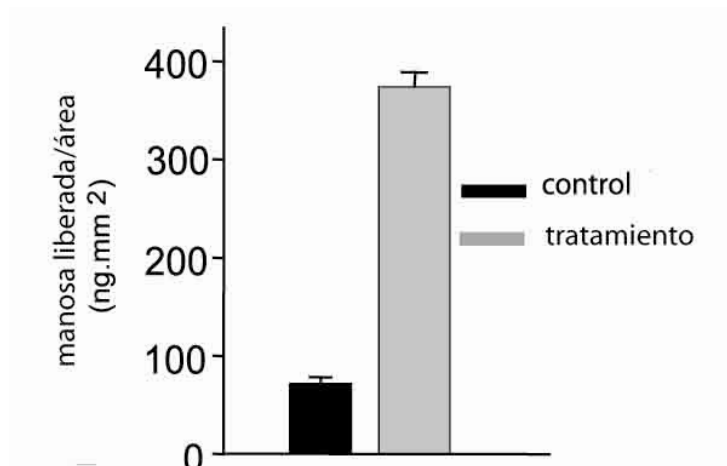
**Figura 19-** Localización *in situ* del  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manano fibrilar de *Codium vermilara* en secciones longitudinales de la pared del utrículo. Arriba: utrículo de *C. vermilara*. Centro, izquierda: vista con luz directa; derecha: tinción con Calcofluor White observada con microscopía láser confocal. Abajo, izquierda: vista con contraste de fases; derecha: inmunomarcación con anticuerpo antimanano observada con microscopía láser confocal. Las flechas indican las capas fibrilares externa e interna de la pared. Escala: 20  $\mu$ m.

El tratamiento de los cortes con una endomananasa que hidroliza específicamente unidades de manosa enlazadas por medio de uniones  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)- produjo una considerable disminución en la tinción con CW (**Figura 20**), además de la aparente pérdida de la estructura fibrilar y el daño de zonas de la pared, lo que conlleva una pérdida de parte de la birrefringencia observada en el material sin tratar (**Figura 19**). Esto confirmaría un rol estructural fundamental para el manano neutro de *Codium vermilara*.



**Figura 20-** Secciones longitudinales de la pared del utrículo de *Codium vermilara* tratadas con endomananasa. Izquierda: imagen de microscopía de contraste de fases donde se observa la pérdida de la estructura fibrilar. Derecha: imagen de microscopía láser confocal donde se observa la pérdida de tinción con Calcofluor White del material tratado (indicado con \*). Escala: 40  $\mu\text{m}$ .

Por otro lado, se estimó la cantidad de manosa liberada a partir de los cortes tratados con la enzima, siendo considerablemente más alta que en el control ( $480 \pm 10$  ng de manosa. $\text{mm}^{-2}$  y  $80 \pm 5$  ng de manosa. $\text{mm}^{-2}$ , respectivamente. **Figura 21**).



**Figura 21-** Cantidad de manosa liberada por unidad de área de secciones del talo tratadas con la enzima (ng de manosa. $\text{mm}^{-2}$ ), comparada con el control negativo.

#### 5.4.2. Polisacáridos sulfatados

##### 5.4.2.1. Tinción con Azul de *O*-Toluidina

La presencia de polisacáridos sulfatados se detectó mediante tinción con Azul de *O*-Toluidina. Esta tinción permite detectar polisacáridos aniónicos (sulfatados y carboxilados) al usarse a un pH de 6,8 y si se usa a pH 1, como en este caso, detecta específicamente las cargas negativas correspondientes a grupos sulfato, ya que los grupos carboxilato se encuentran protonados en esas condiciones. Se observó de este modo la existencia de una capa central que concentra este tipo de compuestos (**Figura 22**), delimitada por las capas que reaccionaron con la tinción y los anticuerpos para manano fibrilar. A modo de control negativo, secciones preextraídas con agua (90°C, 2 horas) se trataron con la misma tinción, observándose una coloración significativamente menor debido a la remoción de los polisacáridos sulfatados.



**Figura 22-** Secciones longitudinales de las paredes del utrículo de *Codium vermilara*. Izquierda: tinción con Azul de *O*-Toluidina (pH =1). Derecha: la misma tinción aplicada a un corte previamente extraído con agua para remover los polisacáridos sulfatados solubles en agua. Escala: 30  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4.2.2. Microespectroscopía SR-FTIR

La espectroscopía de infrarrojo medio basada en radiación de sincrotrón (SR-FTIR) acoplada a microscopía permite el mapeo de componentes sobre cortes de material, usando distintas longitudes de onda que se relacionan con determinados grupos funcionales. Un sincrotrón actúa como un acelerador de partículas que transforma electrones en luz (Yu, 2004). El uso de una fuente de luz de tipo sincrotrón, extremadamente brillante, permite incrementar la relación señal:ruido y aumenta la resolución en forma muy significativa respecto de otras fuentes (Yu, 2004).



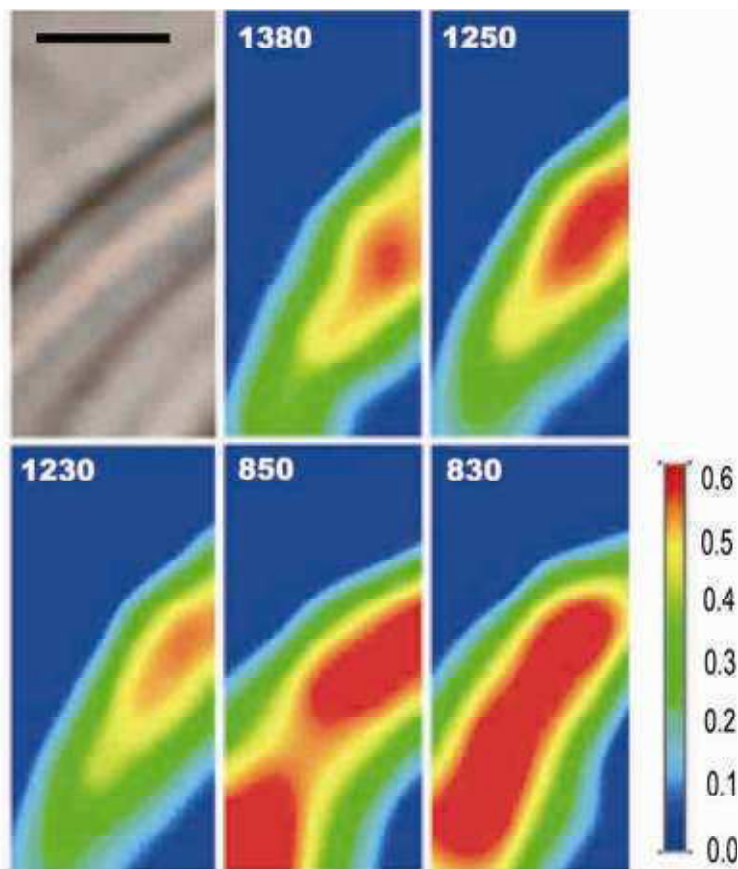
Se analizaron cortes longitudinales de los utrículos de *C. vermilara*, estimando la intensidad de absorción en las siguientes longitudes de onda:

1380, 1250 y 1230  $\text{cm}^{-1}$  → grupos éster sulfato

850  $\text{cm}^{-1}$  → C-O-SO<sub>3</sub> axial (sulfato axial secundario)

820-830  $\text{cm}^{-1}$  → C-O-SO<sub>3</sub> (sulfato primario)

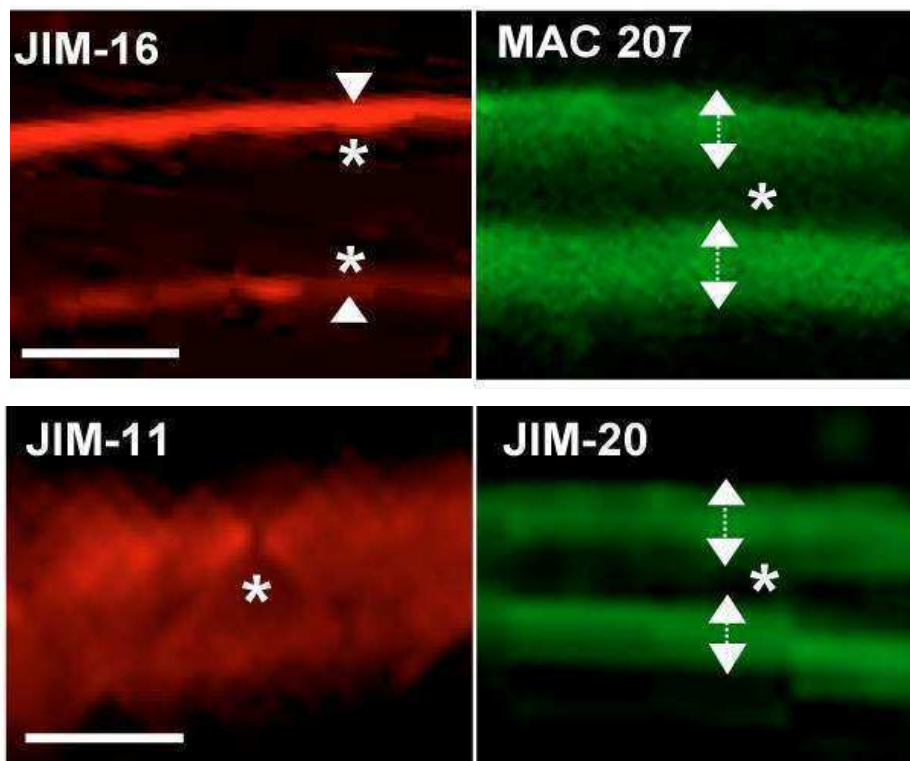
La **Figura 23** muestra los resultados del mapeo, de donde surge un patrón de distribución similar al obtenido por el análisis citoquímico. Las máximas absorbancias en las longitudes de onda asociadas a grupos sulfato se registraron en la zona central de la pared, es decir que es esa la región que concentra los polisacáridos sulfatados que constituyen la matriz de la pared celular de *Codium vermilara*.



**Figura 23-** Análisis por microespectroscopía SR-FTIR de secciones longitudinales de la pared del utrículo de *Codium vermilara*. Las longitudes de onda indicadas en cada caso corresponden a grupos éster sulfato (1380, 1250 y 1230  $\text{cm}^{-1}$ ) sulfato axial secundario (850  $\text{cm}^{-1}$ ) y primario (820-830  $\text{cm}^{-1}$ ). La escala de colores a la derecha representa la intensidad relativa de la absorción para la frecuencia de onda indicada. Escala: 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.4.3. Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs)

Dado que previamente se habían detectado HRGPs en las paredes de *Codium fragile* (Ciancia et al., 2007), se intentó determinar si epitopes de estas glicoproteínas se encuentran también presentes en *C. vermilara*. Varios anticuerpos contra HRGPs de plantas fueron usados sobre cortes de *C. vermilara* para indagar la localización de epitopes de estos compuestos en las paredes celulares del alga. Mediante microscopía confocal se detectaron arabinogalactano proteínas (AGPs) con JIM16 y MAC207, y epitopes de HRGPs del tipo extensinas con JIM11 y JIM20 (**Figura 24**). JIM16 y MAC207 reconocen la porción de hidratos de carbono de las AGPs (Knox et al, 1991).

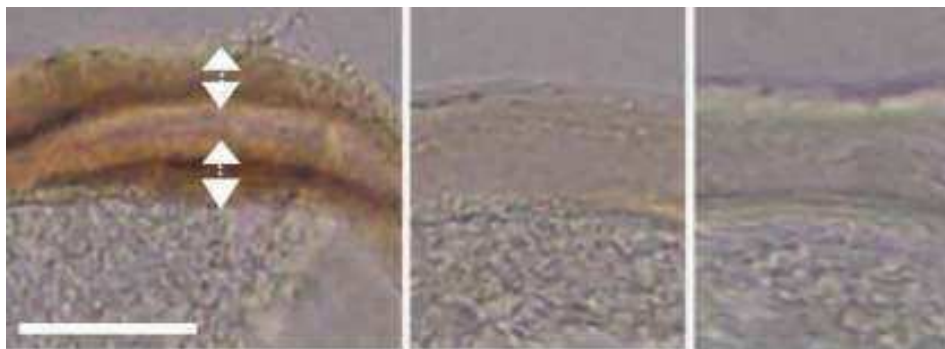


**Figura 24-** Secciones longitudinales de la pared del utrículo de *Codium vermilara* inmunomarcadas con anticuerpos que reconocen epitopes de AGPs (JIM16 y MAC207) y de HRGPs tipo extensinas (JIM11 y JIM20). Las flechas señalan las regiones con marcación, \* indica su ausencia. Escala: 20  $\mu$ m.

Bajo el nombre de reactivo de Yariv se agrupa una serie de compuestos sintéticos que comparten la estructura general 1,3,5-tri-( $\beta$ -glicosiloxifenilazo)-2,4,5-trihidroxibenceno (Seifert y Roberts, 2007). El reactivo de  $\beta$ -glucosil Yariv se utiliza para detectar AGPs

en forma específica, ya que se une de forma no covalente a las AGPs y produce una coloración rojiza. Si bien no se conoce en detalle el mecanismo de unión del reactivo de Yariv, se sabe que dicha unión requiere de la presencia de la fracción de carbohidratos tanto como de la de proteínas en la molécula de AGP (Ellis et al., 2010). Por el contrario, el  $\alpha$ -manosil Yariv, no se une a las AGPs, por lo cual es usado como control negativo en la detección de este tipo de HRGPs mediante el reactivo de Yariv.

Se usó  $\beta$ -glucosil Yariv para detectar la presencia de AGPs en la pared celular de *Codium vermilara* (**Figura 25**), y como control negativo se usaron secciones tratadas con  $\alpha$ -manosil Yariv, y otras secciones previamente extraídas (para eliminar las AGPs) tratadas con  $\beta$ -glucosil Yariv. Ambos controles resultaron no reactivos. Tanto estos ensayos como los de inmunolocalización mostraron una distribución en dos capas, similar a la que se observó en el caso del manano fibrilar.

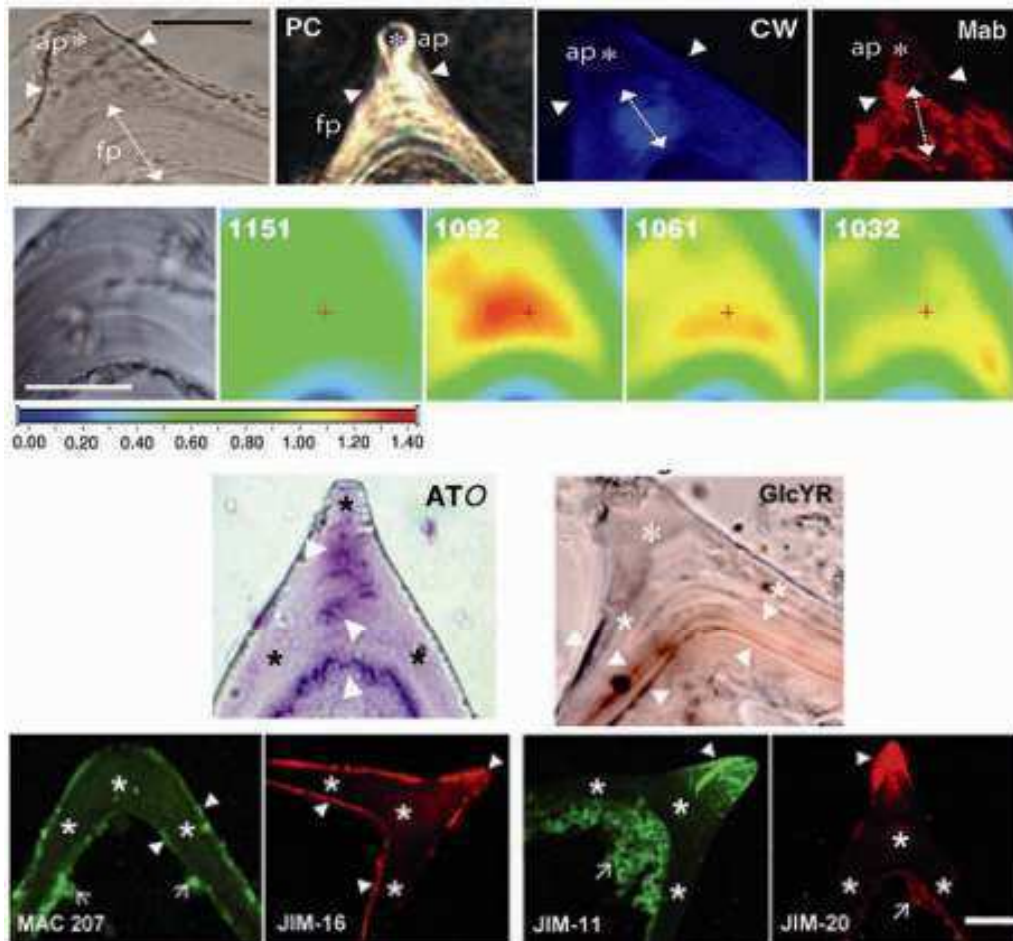


**Figura 25-** Izquierda: Tinción con reactivo de  $\beta$ -glucosil Yariv, que reconoce AGPs. Como control, se usó el mismo reactivo sobre cortes sometidos a extracción de los AGPs (centro), y el reactivo  $\alpha$ -manosil Yariv sobre cortes sin extraer (derecha). Escala: 30  $\mu$ m.

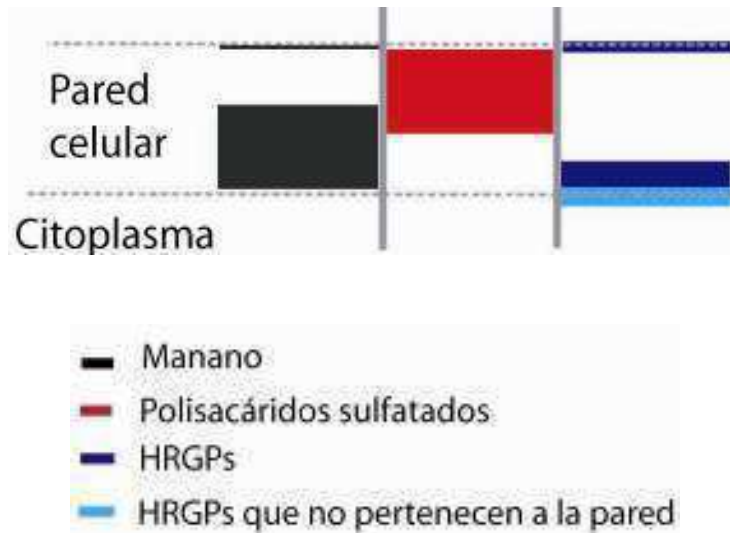
### 5.5. Modelo de pared propuesto

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (Estevez et al., 2009) se mostró la localización *in situ* de los componentes de la pared celular de *Codium fragile* (un resumen de los resultados se muestra en la **Figura 26**). A partir de este análisis se elaboró un modelo tentativo para la pared celular esta especie (**Figura 27**). En base a los resultados detallados en esta sección, junto con la caracterización química de los componentes, se propone un modelo de pared para el alga cenocítica *Codium vermilara* (**Figura 28**), que permite la comparación con la especie *C. fragile*, anteriormente

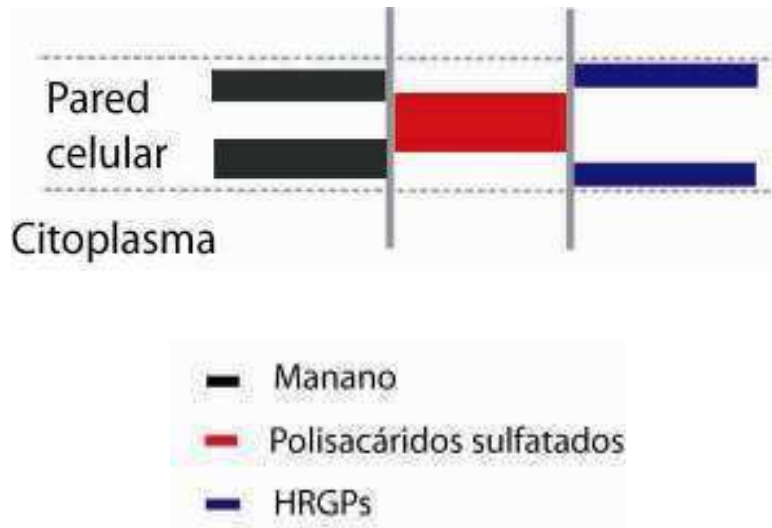
estudiada (Estevez et al., 2009. **Figuras 26 y 27**). Los utrículos de *C. vermilara* presentan una estructura tipo sándwich, con dos capas de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-mananos y HRGPs (tipo AGPs y extensinas) que limitan una zona central rica en polisacáridos sulfatados. En el mucrón de *C. fragile* (una prominencia que se forma en el ápice de los utrículos de esta especie), mananos y HRGPs están distribuidos en una amplia capa interna y otra externa mucho más delgada, mientras que los polisacáridos sulfatados también forman una capa media amorfa.



**Figura 26-** Localización *in situ* de los componentes de la pared celular de *Codium fragile*, en secciones longitudinales del mucrón. Arriba: localización del manano con Calcofluor White (CW) y el anticuerpo específico (Mab). Segunda línea: mapeo por SR-FTIR; se muestran las longitudes de onda correspondientes a la absorción del  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-manano. Tercera línea: tinción de polisacáridos sulfatados con azul de *O*-Toluidina (izquierda) y localización de AGPs con reactivo de  $\beta$ -glucosil Yariv (derecha). Abajo: inmunolocalización de epitopes de HRGPs con anticuerpos monoclonales.



**Figura 27-** Modelo de pared celular de *Codium fragile*, con dos capas fibrilares desiguales compuestas por  $\beta$ -(1→4)-D-mananos y una zona central de matriz que concentra los polisacáridos sulfatados. Además, hay epitopes de HRGPs de pared del tipo AGPs y extensinas que colocalizan con las capas interna y externa de manano, y otras que no forman parte de la pared.



**Figura 28-** Modelo de “sándwich” propuesto para la pared celular de *Codium vermilara*, con dos capas fibrilares compuestas por  $\beta$ -(1→4)-D-mananos y una zona central de matriz que concentra los polisacáridos sulfatados. Además, los epitopes de HRGPs del tipo AGPs y extensinas colocalizan con las capas interna y externa de manano.

## **Resumen de los resultados 1° Parte -A:**

-El alga verde marina *Codium vermilara* sintetiza paredes celulares que constituyen sistemas complejos formados por una porción fibrilar y una matriz de polisacáridos sulfatados.

-La porción fibrilar de la pared está formada por un  $\beta$ -(1→4)-D-manano lineal insoluble en agua.

-Los principales polisacáridos sulfatados son:

-galactanos ramificados sustituidos con grupos sulfato y ácido pirúvico, con un esqueleto básico formado por unidades  $\beta$ -(1→3)-D-Galp. Estos compuestos son muy similares a otros galactanos descritos para varias especies del género *Codium*.

-arabinanos lineales altamente sulfatados, formados por unidades  $\beta$ -(1→3)-L-Arap, lo cual constituye una novedad ya que en los arabinanos de distinto origen descritos hasta el presente la arabinosa se encuentra en forma furanósica.

-Por último, se aisló con bajo rendimiento un manano con grado intermedio de sulfatación cuya estructura básica es la misma que en el caso del manano fibrilar, aunque se encuentran grupos sulfato en posición C-2 en algunas de las unidades Manp. Se propone para este polímero un rol de interfase entre la porción fibrilar neutra y la matriz sulfatada de la pared.

-Se detectó además la presencia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) del tipo arabinogalactano proteínas y extensinas.

-La localización *in situ* de los componentes de la pared reveló una estructura tipo sándwich, con dos capas fibrilares (donde también se encuentran HRGPs) que encierran una zona central donde se concentran los polisacáridos sulfatados.

1° PARTE - B

**Variabilidad de los componentes  
de la pared celular de *Codium vermilara***

# **INTRODUCCIÓN**



## Capítulo 1 – Variabilidad de los componentes de la pared celular de *Codium vermilara*

### 1.1. Introducción

La influencia de factores estacionales, geográficos y de otro tipo sobre aspectos de la biología de las algas (morfología, distribución, ciclos de vida y reproducción, bioquímica, etc.) fue analizada en numerosas ocasiones, desde perspectivas muy diversas. Como ejemplo de estudios centrados en características bioquímicas de macroalgas se pueden mencionar la variación poblacional y biogeográfica en el contenido de metabolitos relacionados con la defensa antiherbivoría (Paul y Alstyne, 1982; Steinberg, 1989) y la variabilidad estacional en la producción de otros compuestos bioactivos (Hornsey y Hide, 1976, cuyo estudio abarca once especies, entre ellas *Codium fragile*; Padmakumar y Ayyakkannu, 1997; Hellio et al, 2004).

La variabilidad en la pared celular de algas verdes, rojas y pardas fue estudiada en varias ocasiones, desde el punto de vista temporal (Lahaye y Yaphe, 1988; Chirapart y Ohno, 1993; Mouradi-Givernaud et al., 1993; Oliveira et al., 1996; Givernaud et al., 1999; Orduña-Rojas et al., 2008; Robic et al., 2009; Skriptsova et al., 2010). En la mayoría de estos casos, la variabilidad encontrada en la composición y/o estructura de los componentes de las paredes se relacionó tanto con factores ambientales complejos como con cambios endógenos (crecimiento y desarrollo, reproducción, cambios morfológicos, etc).

Algunos trabajos han indagado en la variabilidad de otros aspectos del género *Codium*. Hubbard y Garbary (2002) describieron la variación morfológica de la especie invasiva *C. fragile* en las costas del este de Canadá. Otro trabajo (Trowbridge y Farnham, 2004) se centró en la variación espacial a lo largo de un gradiente mareal, al sur de Inglaterra, para *C. vermilara*, *C. tomentosum* y dos subespecies de *C. fragile*. Sin embargo, mientras los aspectos químicos de la pared celular del género, incluyendo *Codium vermilara*, fueron extensamente estudiados (Bilan et al., 2007; Ciancia et al., 2007; Farias et al., 2008; Ohta et al., 2009), al momento de encarar este análisis no existían reportes acerca de la variabilidad en los polímeros de la pared a lo largo de gradientes geográficos o estacionales.

Se investigó entonces la variabilidad en muestras de *C. vermilara* recolectadas en diferentes localidades de la costa argentina, y en diferentes momentos del año para una misma localidad. La comparación tomó en cuenta los niveles de sulfatación y el contenido y composición de los azúcares de la pared. Además de las determinaciones químicas, para el análisis se utilizó espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y los resultados obtenidos se trataron por Análisis de Componentes Principales (FTIR-PCA).

La espectroscopía FTIR es una técnica muy sensible que permite la caracterización de macromoléculas en base a la absorción de luz asociada a la vibración de enlaces químicos asimétricos presentes en sus componentes monoméricos (Prado-Fernández et al., 2003). Es posible detectar pequeñas diferencias en la composición de dos muestras, aunque no siempre esas diferencias pueden asignarse claramente a una determinada estructura o grupo funcional. Las determinaciones químicas y la espectroscopía FTIR, por lo tanto, proveen distinto tipo de información acerca de los componentes de la pared, por lo que pueden considerarse enfoques complementarios a la hora de lograr una caracterización integral de estructuras tan complejas.

La espectroscopía infrarrojo presenta algunas ventajas para el análisis de paredes celulares. Los espectros se adquieren en muy poco tiempo y es una técnica no destructiva, que no requiere derivatización de la muestra. Son muchos los grupos funcionales que absorben a longitudes de onda características, obteniéndose perfiles bioquímicos con señales a veces superpuestas (Kim et al., 2004) y permitiendo asignaciones para muchos componentes de la pared. También es posible detectar alteraciones estructurales y arquitecturales en la pared (Kim et al., 2004), cambios en la conformación y la orientación de los polímeros (Chen et al., 1998) y resolver mezclas complejas de compuestos con similares características espectrales (Robic et al., 2008). Se ha utilizado FTIR, por ejemplo, para analizar interacciones intermoleculares en monómeros y dímeros de lignina (Kubo y Kadla, 2005), para evaluar la orientación de las macromoléculas y las propiedades mecánicas de la pared en epidermis (Wilson et al., 2000) y para monitorear la estructura cristalina de la celulosa en diferentes estadios de desarrollo en madera de Gimnospermas (Kataoka y Kondo, 1998). En otra línea, la combinación de FTIR con técnicas estadísticas de compresión de datos (como el análisis de componentes principales usado en esta tesis) permite comparar espectros

muy complejos, como lo son los de las paredes celulares (Robin et al., 2003). En plantas, este enfoque fue elegido por Chen y colaboradores (1998) para discriminar entre mutantes y el tipo salvaje usado como control, y por Robin et al. (2003) para obtener información sobre cambios en la pared en mutantes no caracterizados. Por otro lado, Kim et al. (2004) mostraron que esta técnica también tiene valor taxonómico al analizar las relaciones filogenéticas entre siete especies de plantas superiores de tres órdenes diferentes mediante FTIR-PCA. Lu y colaboradores (2008) usaron la misma técnica, combinada con un estudio anatómico comparado y análisis de la información biogeográfica, para realizar una revisión de 18 taxa de una sección que se hallaban en discusión. En algas verdes del género *Ulva*, Robic y colaboradores (2008) usaron una combinación de análisis químicos, por un lado, y FTIR con procedimientos estadísticos por otro, para analizar la composición de la pared celular.

Con el objetivo de evaluar si la distribución geográfica de diferentes poblaciones afecta el contenido de los diferentes polisacáridos que componen la pared celular de *Codium vermilara* y sus características (fundamentalmente el grado de sulfatación), se analizaron muestras provenientes de tres localidades costeras recolectadas en el mismo momento del año (mes de julio). Las localidades abarcan una franja latitudinal que va desde los 39° S a los 45° S. Por otro lado, el grado de variabilidad en los componentes de las paredes celulares de una misma población como posible respuesta a factores estacionales se analizó a partir de la recolección de material en una misma localidad en ocho ocasiones, a lo largo de dos años y abarcando todas las estaciones. Los polisacáridos analizados, componentes principales de la pared celular de *Codium vermilara* fueron el manano fibrilar y los polisacáridos de matriz (arabinano, galactano y manano sulfatados).

## **EXPERIMENTAL**

## Capítulo 2 – Caracterización de la pared celular y análisis de la variabilidad

### 2.1. Recolección del material

Se recolectaron ejemplares de *Codium vermilara* en Bahía Arredondo (Provincia de Chubut, BA; 45° 01' S, 65° 48' O), San Antonio Oeste (Provincia de Río Negro, SAO; 40° 43' S, 64° 56' O) y La Farola (Provincia de Buenos Aires, LF; 39° 00' S, 61° 65' O) (**Figura 8, Resultados**). Material correspondiente a cada sitio y fecha de muestreo se depositó en el herbario del Museo Bernardino Rivadavia (BA: número de colección 47170; SAO: número de colección 40466; LF: números de colección 47171-47178).

En el sitio La Farola se recolectó material en ocho ocasiones, entre los meses de noviembre de 2007 y diciembre de 2009, abarcando todas las estaciones del año (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Muestras usadas para el análisis de la variabilidad temporal de los componentes de pared de *Codium vermilara*

Muestra	Lugar de recolección	Fecha de recolección
M3	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Noviembre 2007
M4	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Diciembre 2007
M5	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Marzo 2008
M6	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Julio 2008
M7	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Diciembre 2008
M8	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Mayo 2009
M9	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Septiembre 2009
M10	La Farola, Pcia de Buenos Aires	Diciembre 2009

### 2.2. Material utilizado para el análisis de la variabilidad química de la pared celular

Se utilizó una mezcla de varios talos secos molidos con nitrógeno líquido en mortero para las determinaciones sobre algas sin extraer. Para validar este procedimiento, se analizaron separadamente las zonas apical y basal de una misma planta (n=5) y diferentes plantas de un mismo muestreo, distinguiendo también entre éstas las partes basales y apicales.

En el caso de las determinaciones sobre los extractos, el material molido se extrajo con agua destilada durante 24 horas (20 g/l). El residuo de la extracción se separó por centrifugación y el sobrenadante fue dializado y liofilizado.

### **2.3. Determinaciones químicas y espectroscopía de infrarrojo**

Las siguientes determinaciones químicas se realizaron siguiendo los métodos descritos en el Capítulo 3 de la 1° Parte-A: contenido total de hidratos de carbono (Dubois *et al*, 1956, Ahmed y Labavitch, 1977), contenido de sulfato (por cromatografía iónica isocrática y según Dodgson y Price, 1962) y composición de monosacáridos por CGL de alditoles peracetilados (Stevenson y Furneaux, 1991).

#### **2.3.1. Determinación del contenido de sulfato orgánico e inorgánico**

De acuerdo al método de Thero y Hartiala (1971) entre 1 y 3 mg de muestra se hidrolizaron durante 2 horas a 121° C, en 0,5 ml de TFA 2 M. Se neutralizó con NaOH 2 M y se llevó a seco con aire. Luego se agregó la cantidad de agua necesaria para obtener una solución de entre 4 y 24  $\mu\text{g/ml}$  de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Se tomaron alícuotas de 0,5ml de esta solución, a las que se agregaron 2ml de etanol absoluto, 1 ml de buffer  $\text{BaCl}_2$  y 1,5ml de solución de rodizonato de sodio. Se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos, y luego se midió la absorbancia a 520 nm, utilizando agua destilada como blanco y una solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (5-30  $\mu\text{g/ml}$ ) como referencia. La coloración es estable durante 30 minutos.

El mismo procedimiento se siguió con la muestra sin hidrolizar, obteniéndose así el contenido de sulfato inorgánico, que puede descontarse del contenido total de sulfato (orgánico + inorgánico) obtenido a partir de la muestra hidrolizada.

El buffer- $\text{BaCl}_2$  se preparó de la siguiente manera: a 10 ml de de ácido acético 2 M se sumaron 2 ml de cloruro de bario 0,005 M y 8 ml de bicarbonato de sodio 0,02 M; posteriormente se llevó a 100 ml con etanol absoluto. La solución de rodizonato se obtuvo disolviendo 5 mg de rodizonato de sodio en 20 ml de agua, agregando 100 mg de ácido ascórbico y agitando hasta disolver; finalmente se llevó a 100 ml con etanol absoluto.

### **2.3.2. Determinación del contenido de sulfato por microanálisis**

Los análisis se realizaron en el INQUIMAE (CONICET; FCEN-UBA), tal como se describió en el Capítulo 3 de la 1° Parte-A.

### **2.4. Análisis estadístico**

La significancia estadística de las diferencias entre partes de una misma planta, plantas de un mismo muestreo y plantas de distintas localidades fue determinada mediante prueba T de Student; los valores de p menores que 0,05 fueron considerados estadísticamente significativos. Previamente, se corroboró la normalidad de las muestras mediante la prueba de Shapiro-Wilks, apropiada para muestras pequeñas. Los análisis aplicados se llevaron a cabo con el programa InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

### **2.5. Espectroscopía de infrarrojo FTIR**

Los espectros de FTIR fueron obtenidos y procesados siguiendo la metodología descripta en el Capítulo 3 de la 1° Parte-A.

### **2.6. Análisis de Componentes Principales (PCA)**

Se utilizó el software win-das (Wiley, New York) para corregir la línea de base y normalizar los espectros, para aplicar luego análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) mediante el método de matriz de covarianza (Keymley, 1998). Se tomó para el análisis la región de  $1500-800\text{ cm}^{-1}$ , donde los polisacáridos de pared son las macromoléculas que realizan el mayor aporte a la absorbancia medida (Ver **3.2.2.** para mayores detalles).

## **RESULTADOS**



## Capítulo 3 - Variabilidad de la pared celular de *Codium vermilara*

### 3.1. Consideraciones generales

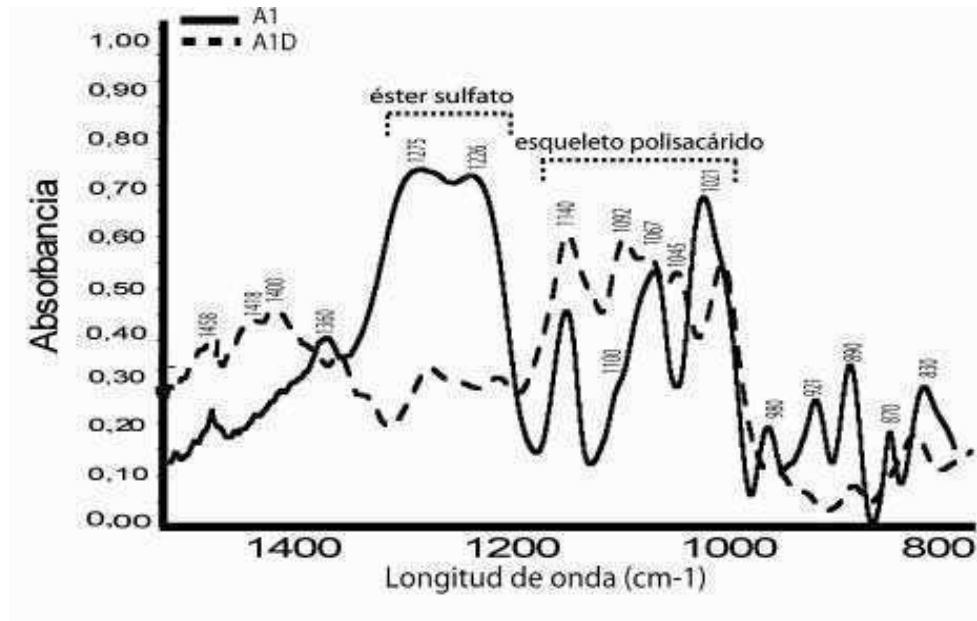
La caracterización de los componentes de las paredes celulares se realiza a través de diversos enfoques y técnicas, y la combinación de los mismos permite la obtención de datos complementarios. Cada técnica aplicada contribuye a la caracterización de los componentes de la pared a través de información de diferente naturaleza. Esta diversidad de enfoques enriquece el estudio de estructuras altamente complejas como lo son las paredes celulares.

En este caso, se determinó la composición de monosacáridos mediante cromatografía gas-líquido, el contenido de azúcares (y sulfato para los extractos) por técnicas colorimétricas, y se complementó esta información con la obtenida por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Los espectros IR de estructuras de gran complejidad como las paredes celulares de *Codium vermilara* son a su vez extremadamente complejos, y para su análisis se requieren herramientas estadísticas. El Análisis de Componentes Principales es una operación matemática que permite reducir una gran cantidad de caracteres a un número limitado de variables o componentes. Se trata de un método de compresión que no requiere conocimiento previo de la estructura de clases del conjunto de datos (Kim et al., 2004). Cada componente contiene información de todos los caracteres, pero en diferente proporción, y “explica” así una parte de la variabilidad total entre las muestras. En general, la mayor parte de la variabilidad (50-80%) está comprendida en los primeros dos o tres componentes. De este modo, y representando cada componente como un eje, las muestras pueden ser caracterizadas de acuerdo al valor que les corresponde respecto a cada uno de esos ejes. En el caso de FTIR acoplada a PCA, los caracteres son las absorbancias a distintas longitudes de onda, siendo expresada la contribución de éstas a cada componente en los gráficos llamados *loadings* (Crisci y López Armengol, 1983; Kemsley, 1988; Chen et al., 1998).

Para facilitar la interpretación de los resultados, se incluyeron en los análisis los espectros modelo de los siguientes polisacáridos: G1, A1, MS, M, G1D y A1D, (**Figura**

1). En los cuatro primeros casos se trata de polímeros aislados de las paredes celulares de *Codium vermilara* (galactano, arabinano y manano sulfatados, y manano fibrilar) y en los restantes, del producto de la desulfatación de dos de ellos (G1D y A1D, galactano y arabinano desulfatados). La estructura de estos polisacáridos fue descrita en detalle en la 1° Parte-A; en la **Tabla 1** se presenta un resumen.



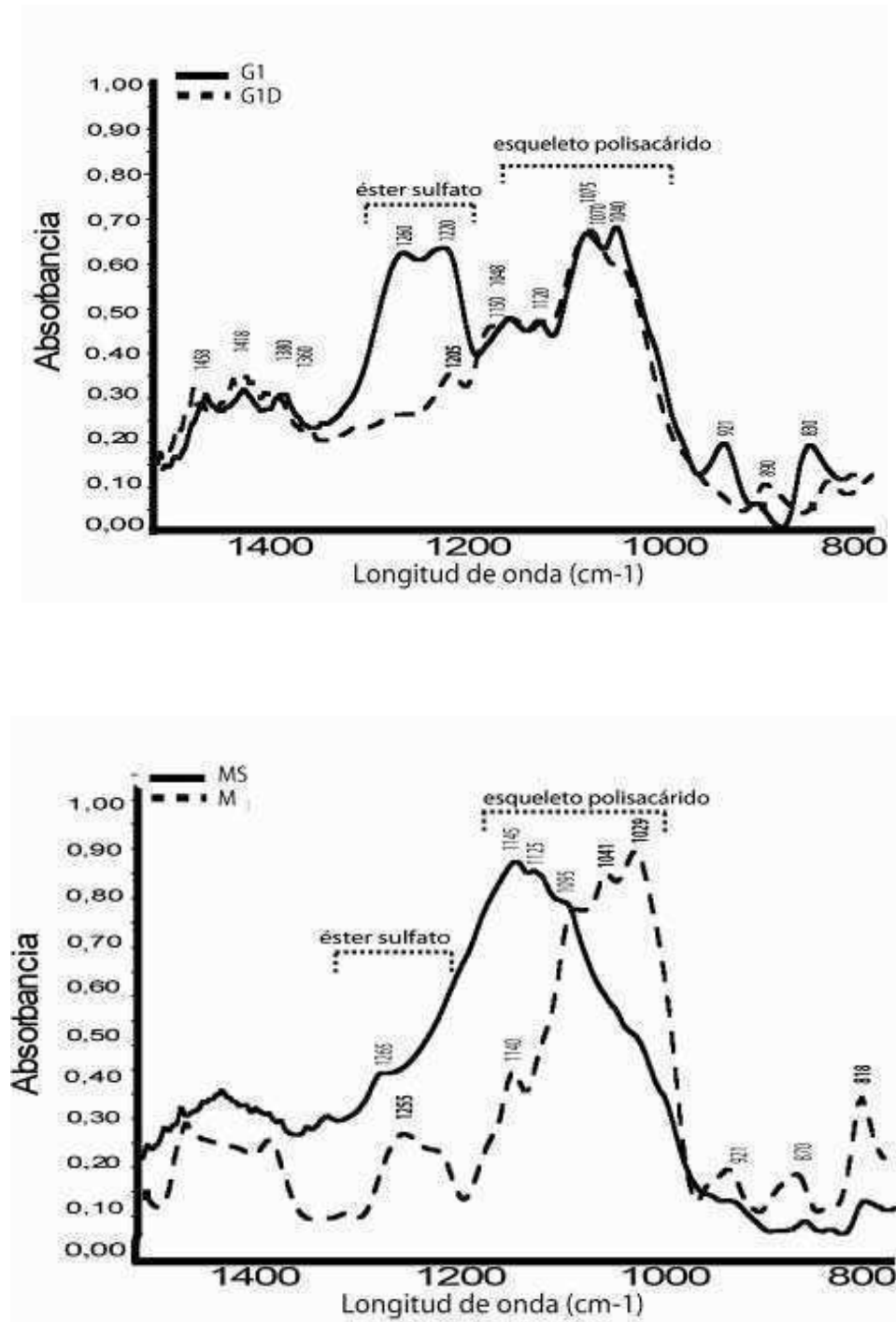


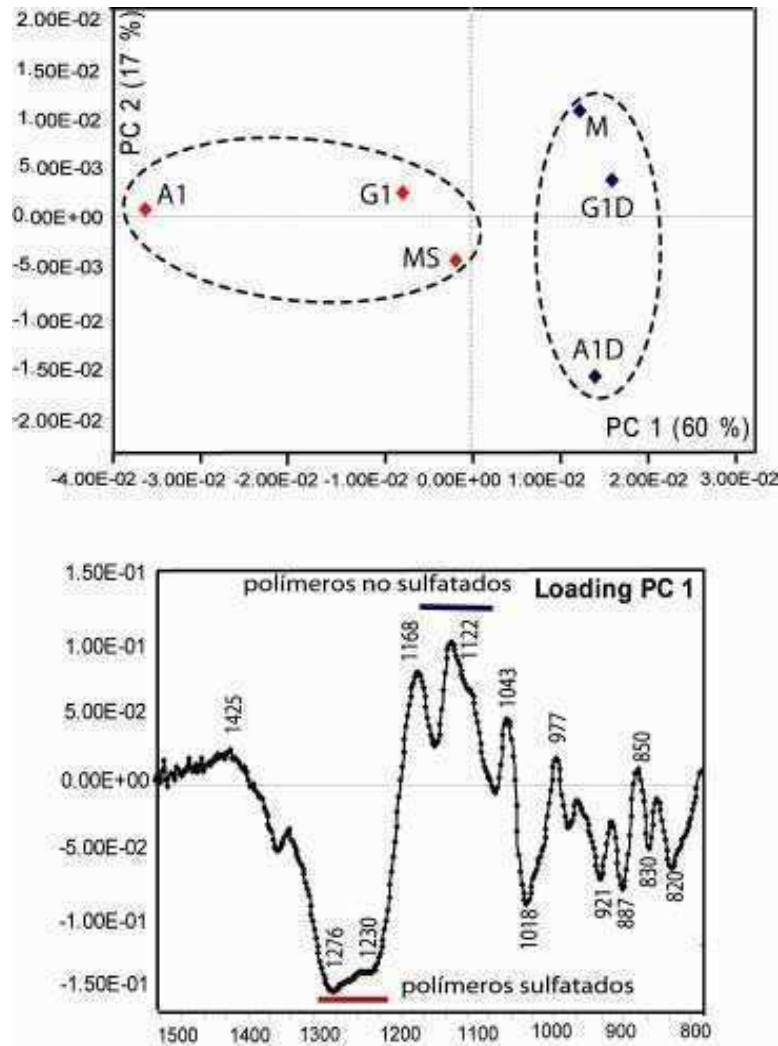
Figura 1- Espectros FTIR de los compuestos modelo.

**Tabla 1.** Caracterización de los polisacáridos usados como compuestos modelo en el análisis de FTIR-PCA

Composición química		Unidades estructurales	Importancia de la estructura
<b>A1</b>			
Arabinosa	97	→3) L-Arap (1→	++
Sulfato	47	→3) L-Arap 2,4S(1→	++++
Arabinosa:sulfato	1:1,8	→3) L-Arap 2S(1→, →3) L-Arap 4S(1→	+++
<b>A1D</b>			
Arabinosa	74	→3) L-Arap (1→	+++++
Sulfato	4	→3) L-Arap 2,4S(1→,	+
Arabinosa:sulfato	1:0,2	→3) L-Arap 2S(1→ y →3) L-Arap 4S(1→	
<b>G1</b>			
Galactosa	83	→3) D-Galp (1→	++
Sulfato	16	3,4Pir- D-Galp (1→, →3) D-Galp4S(1→	++
Galactosa:sulfato	1:0,5	→3) D-Galp 6S(1→	+
		→3,6) D-Galp (1→	+
		→3) D-Galp 4,6S(1→, →3,6) D-Galp 4S(1→	+++
<b>G1D</b>			
Galactosa	91	→3) D-Galp (1→	++++
Sulfato	< 3	3,4Pir- D-Galp (1→, →3) D-Galp4S(1→	+
Galactosa:sulfato	1:0,1	D-Galp (1→	+++
<b>MS</b>			
Manosa	94	→4) D-Manp (1→	++++
Sulfato	12	→4) D-Manp 2S(1→	++
Manosa:sulfato	1:0,3	→4) D-Manp 6S(1→	+
<b>M</b>			
Manosa	87	→4) D-Manp (1→	+++++
Sulfato	4		
Manosa:sulfato	1:0,1		

La cantidad de monosacárido se expresa como moles %, el contenido de sulfato como  $\text{SO}_3\text{Na}$  % p/p, y monosacárido:sulfato expresa la razón molar.

Importancia relativa de cada unidad estructural: +++++ = 70-100 mol %; ++++ = 50-70 mol %; +++ = 25-50 mol%; ++ = 10-30 mol%; += 0-10 mol%. 3nd= no determinado.



**Figura 2-** Análisis de Componentes Principales de los espectros de los compuestos modelo y *loading* del PC 1. A1: arabinano sulfatado, A1D: arabinano desulfatado, G1: galactano sulfatado, G1D: galactano desulfatado, M: manano fibrilar, MS: manano sulfatado.

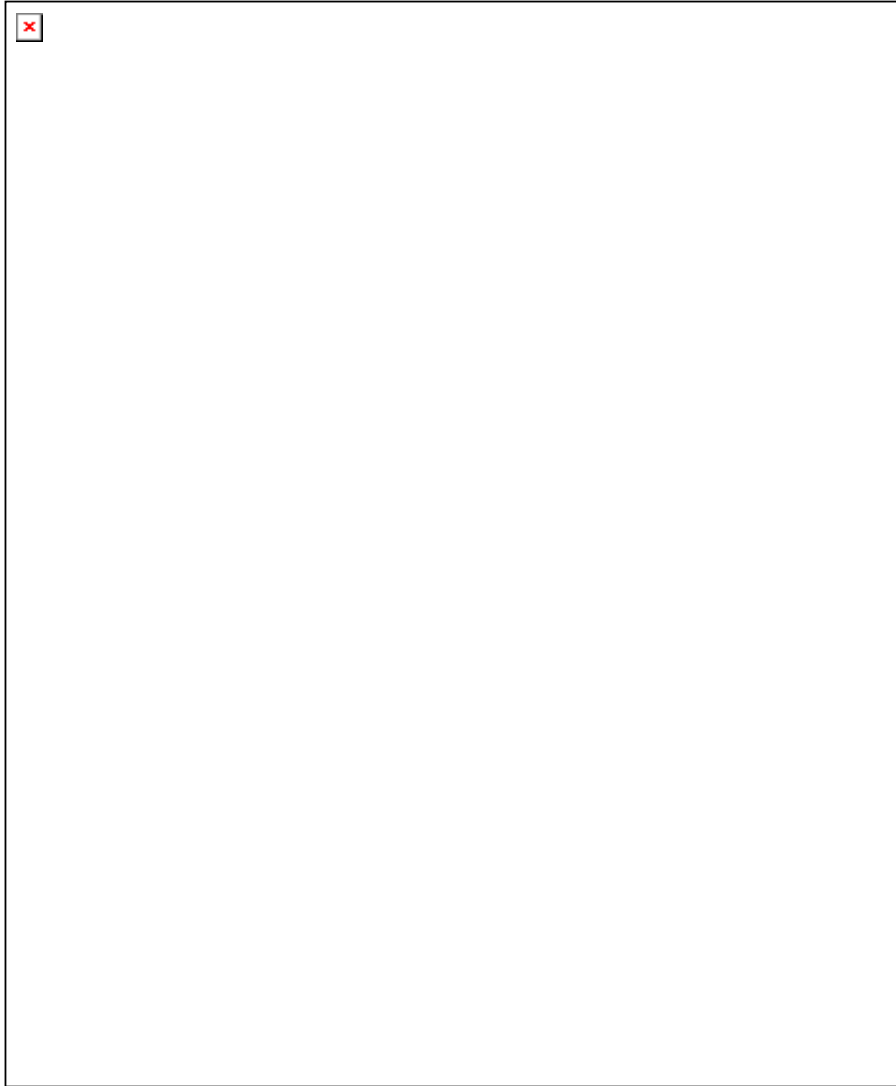
La inclusión de estos polisacáridos como referencia permitió evaluar la contribución de cada uno de ellos a la variabilidad total observada en la pared celular. El análisis de estos compuestos modelo (**Figura 2**) en la región de 1500-800  $\text{cm}^{-1}$  mostró que las bandas a 1275-1220  $\text{cm}^{-1}$ , asociadas al estiramiento asimétrico de los enlaces O=S=O del éster sulfato (Prado Fernández et al., 2003) permiten diferenciar claramente los polímeros sulfatados de sus correspondientes desulfatados. Ambos grupos de polisacáridos se segregan respecto de PC1 (horizontal), que explica el 60% de la variabilidad total, ubicándose los sulfatados hacia la izquierda del origen, y los no sulfatados hacia la derecha. El *loading* correspondiente a PC1 muestra cuáles son las

longitudes de onda que más aportan a la separación de ambos grupos. Las mayores intensidades, de signo negativo o positivo (el signo es indistinto), se corresponden a los valores negativos o positivos del eje de PC1. Es decir, las muestras que presentan mayor intensidad de absorción en las longitudes de onda en las que se observan picos negativos en el gráfico del *loading*, se ubican hacia la parte negativa del eje PC1 y están enriquecidas en esas bandas de absorbancia. Esto indica que las muestras A1, G1 y MS presentan grados de sulfatación significativamente mayores que las muestras desulfatadas A1D, G1D y M. Lo mismo puede decirse de los picos positivos en el *loading* y los valores positivos en el Componente Principal correspondiente: las muestras que se agrupan en dicho sector del eje PC presentan alta absorción en las longitudes de onda propias de los picos positivos del *loading*.

Así, la intensidad de las bandas en la región  $1275\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$  puede ser usada como un indicador del nivel general de sulfatación en las paredes celulares de *C. vermilara*, tal como se había mostrado previamente para otro tipo de polisacáridos (Prado Fernández et al., 2003). Vale aclarar que dada la complejidad de la información involucrada, y a pesar del conocimiento de que ciertas regiones y/o bandas están asociadas a determinados grupos funcionales, se consideraron los espectros como un todo, y no se intentó una asignación puntual para explicar las diferencias observadas

### 3.2. Validación del procedimiento.

Se evaluó el ruido, es decir, la variación no relevante desde el punto de vista biológico, que pudieran provocar en los espectros los componentes de bajo peso molecular presentes en el citoplasma y las paredes celulares. Para esto se compararon los espectros de muestras extraídas con metanol y sin extraer (**Figura 3**). El hecho de que no se observen diferencias significativas en la región a analizar ( $1500\text{-}800\text{ cm}^{-1}$ ) confirma que los polisacáridos de pared son las macromoléculas que mayor aporte realizan a las absorbancias de dicha región. Por otro lado, la región de  $1650\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$  no fue considerada para el análisis ya que contiene bandas características de amidas primarias y secundarias correspondientes a proteínas.



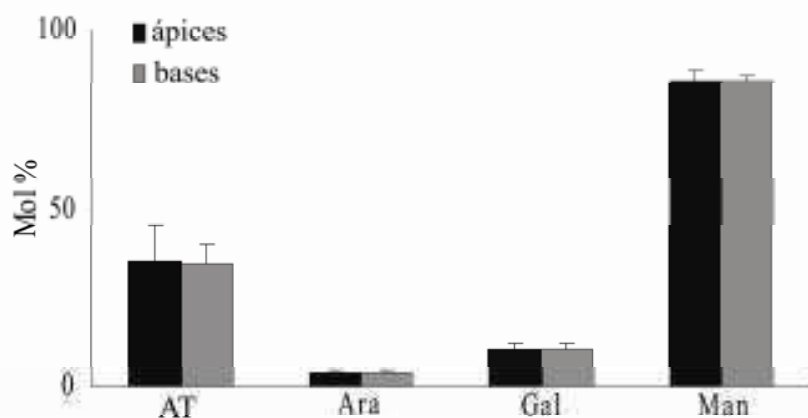
**Figura 3-** Espectros FTIR de dos muestras (M6 y M7) sin extraer y sometidas a extracción con metanol.

En una primera instancia, se determinó que la variabilidad entre las plantas dentro de un mismo muestreo (el procedimiento se repitió con las muestras M4, M5 y M7; ver tabla con información de los muestreos en Experimental) resulta menor que la que se encuentra entre los diferentes muestreos (M3-M10). Por otro lado, con el objetivo de evaluar las diferencias entre zonas con y sin crecimiento activo de los talos, se analizaron las regiones apical y basal de cinco ejemplares de una misma fecha de recolección (**Tabla 2; Figura 4**).

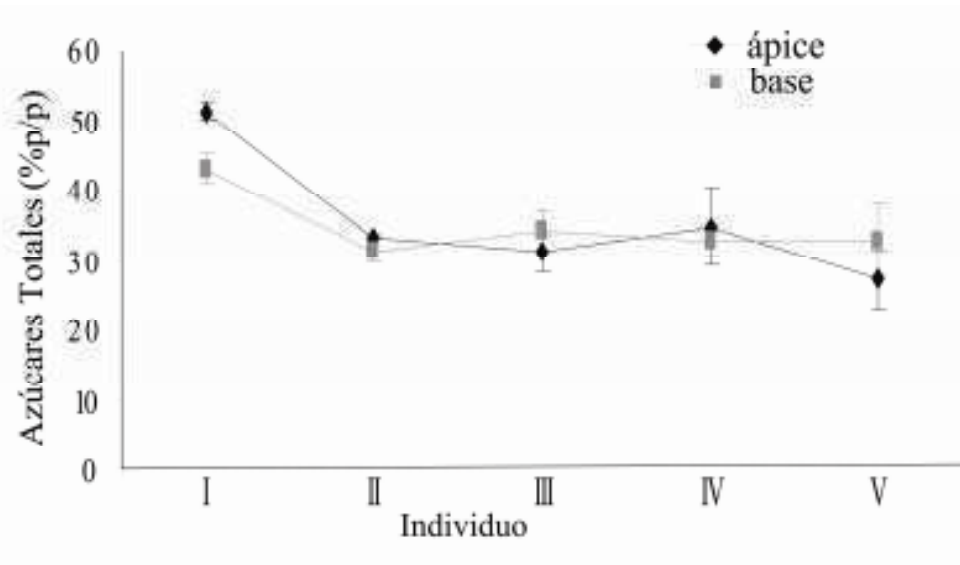
**Tabla 2.** Análisis químico de las regiones con y sin crecimiento activo (ápices y bases, respectivamente) de talos cinco ejemplares de *C. vermilara* recolectados en diciembre de 2007, en La Farola, Pcia de Buenos Aires (M4).

Individuo	AT %	Monosacáridos (moles %)			Gal:Ara Razón molar
		Gal	Ara	Man	
<b>Ápices</b>					
I	51	12	5	83	1:0,5
II	33	9	3	88	1:0,3
III	31	8	3	88	1:0,4
IV	35	13	4	83	1:0,3
V	27	9	3	88	1:0,3
Media ± DE	35 ± 9	10 ± 2	34 ± 1	86 ± 3	1:0,4
<b>Bases</b>					
I	43	10	4	85	1:0,4
II	32	11	5	84	1:0,5
III	34	8	3	88	1:0,4
IV	33	11	4	86	1:0,4
V	33	13	3	84	1:0,2
Media ± DE	35 ± 5	11 ± 2	4 ± 1	85 ± 2	1:0,4

AT= azúcares totales, descontando glucosa, expresado como % p/p. DE= desvío estándar.







**Figura 4-** Determinaciones químicas: comparación entre los espectros promedio para ápice y base, y entre ápice y base de cada individuo; AT= Azúcares Totales, expresa % p/p; Composición relativa monosacáridos expresada como moles % de Ara, Gal, Man ( $\Sigma=100\%$ ).

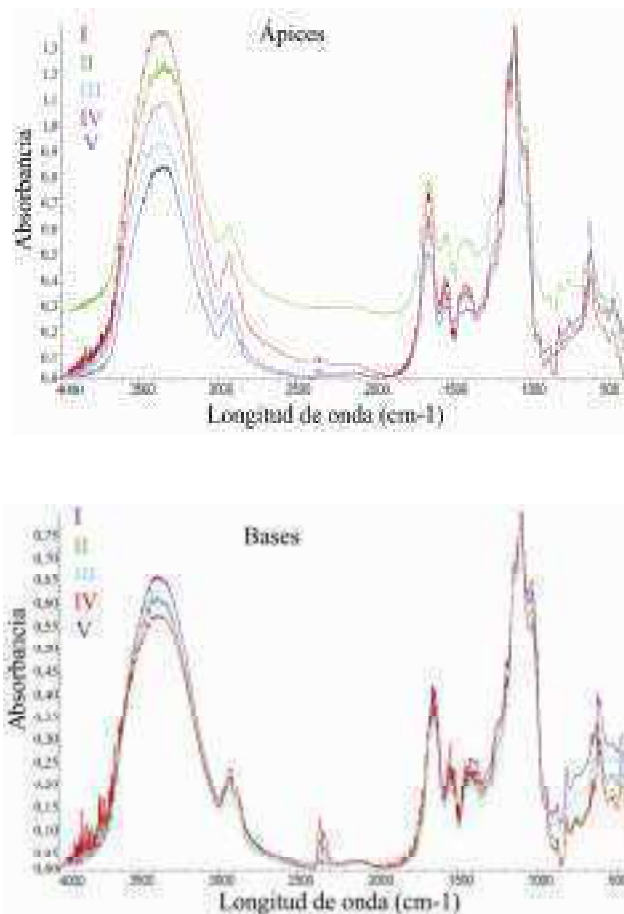
Si bien en la **Tabla 2**, y en las restantes tablas que corresponden a muestras sin extraer, se muestra el valor de azúcares totales, éste no debe ser considerado como un indicador confiable en estos casos. Puede verse que los valores obtenidos son fluctuantes en estas muestras, no así en los extractos. Esto se debe a que representa un porcentaje de una masa de material sin extraer que puede incluir cantidades muy variables de sales y otros contaminantes. Por el contrario, la composición de monosacáridos (en moles % del total de carbohidratos) refleja las cantidades relativas de cada uno de ellos, siendo este valor independiente de la masa original y por lo tanto de las impurezas presentes. Dejando de lado la glucosa derivada de polisacáridos de reserva (almidón), se asume que el origen del resto de los monosacáridos corresponde casi exclusivamente a la pared celular (Ciancia et al., 2007). Por otro lado, dado que el manano sulfatado representa sólo una pequeña proporción de la pared celular de *Codium vermilara*, la manosa encontrada se atribuye al manano neutro fibrilar, componente mayoritario de la pared celular del alga.

Mediante una prueba *t* de hipótesis de dos colas se verificó que para ninguna de las determinaciones químicas evaluadas existían diferencias significativas entre ambos grupos. Asimismo, una observación preliminar de los espectros FTIR muestra por un lado un alto grado de similitud entre individuos (**Figura 5**, donde cada espectro

representa el promedio de 10 espectros obtenidos a partir de cada muestra I-V); y por otro lado, para cada individuo, la similitud de los espectros promedio correspondientes al ápice y a la base (**Figura 6**).

El análisis de FTIR-PC no mostró una segregación clara entre ambos grupos (ápices y bases; **Figura 7**), aunque se observa una cierta separación, probablemente debido a variación al azar que no es asignable a ningún componente específico de la pared celular, es decir, la variación o ruido propios del método.

Estos resultados permitieron validar la metodología utilizada para lograr los resultados que se detallan en las secciones a continuación, donde tanto para las determinaciones sobre muestras sin extraer como para la obtención de los extractos acuosos a temperatura ambiente se utilizó una mezcla de ejemplares de cada muestreo (n=10-15), sin distinguir entre partes de cada talo.



**Figura 5-** Espectros promedio de ápices y bases de los 5 individuos analizados

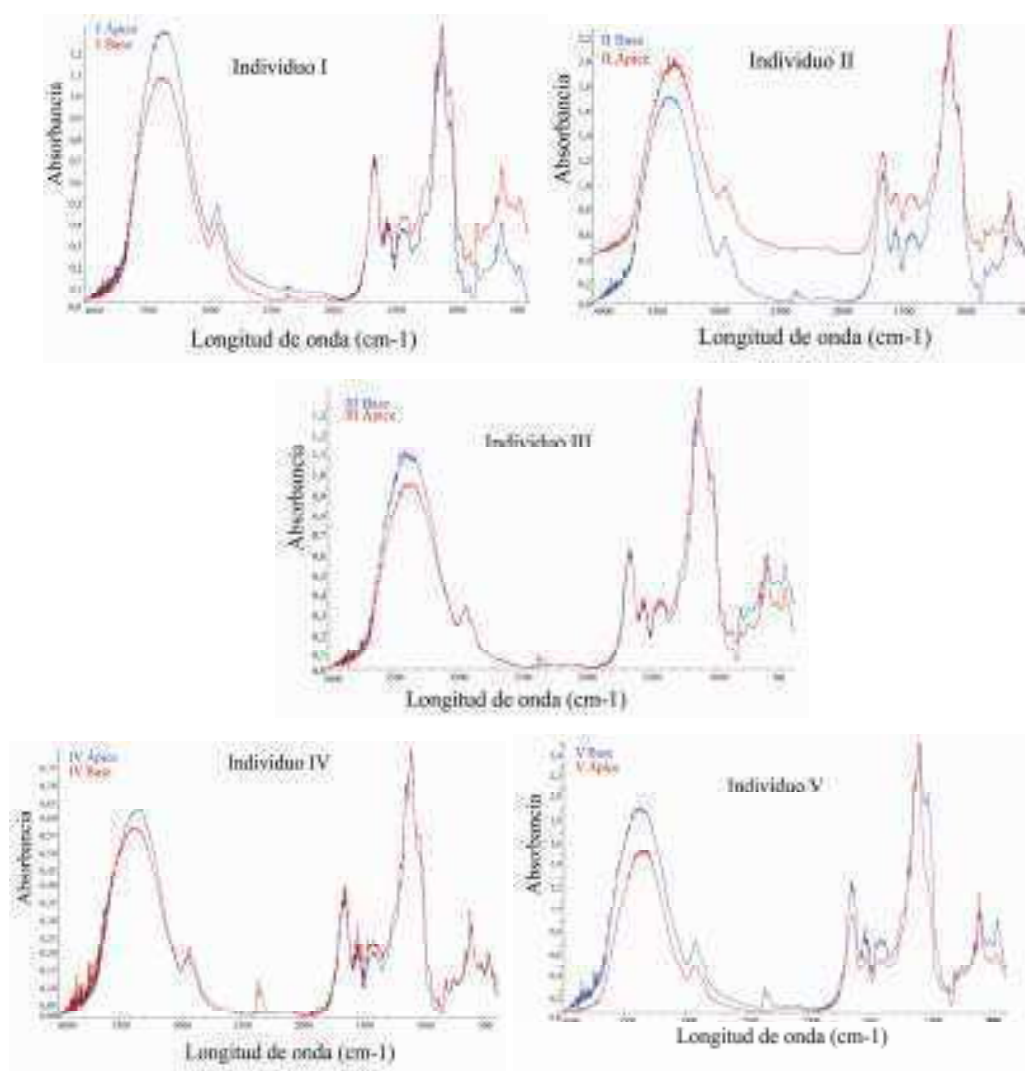
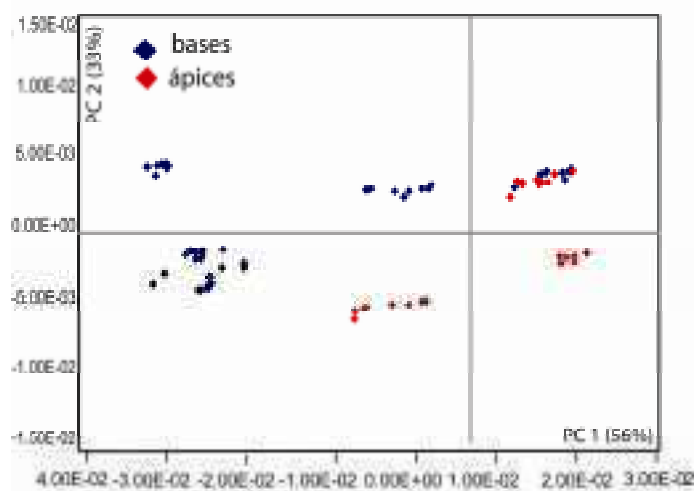
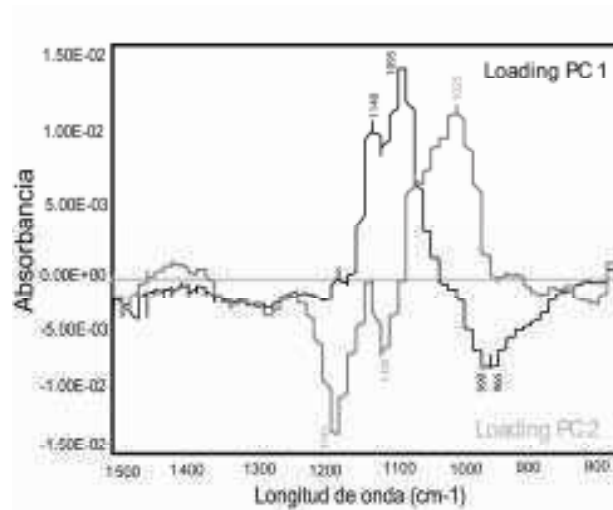


Figura 6- Espectros de ápice y base de cada individuo (I-V)

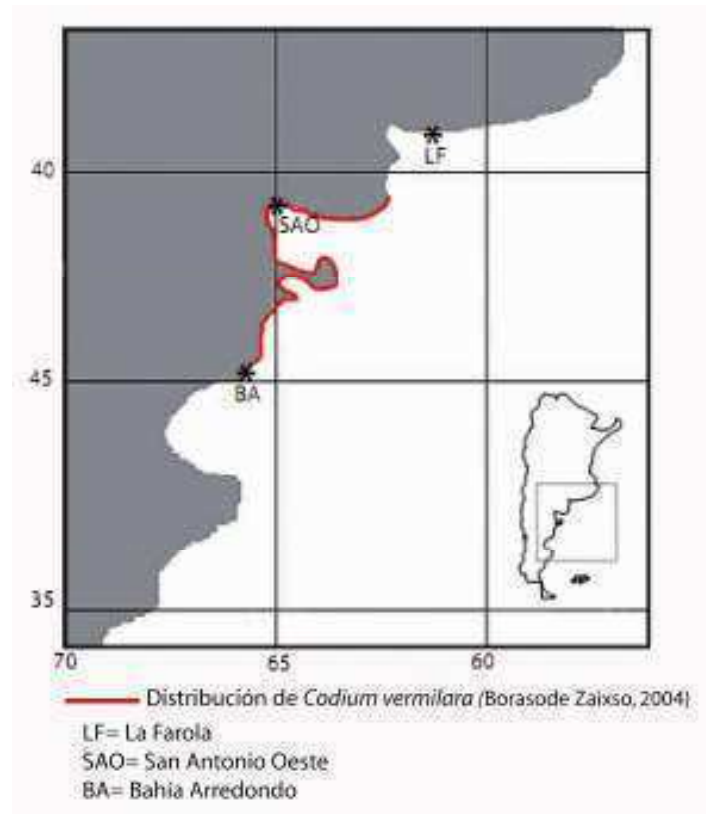




**Figura 7-** PCA y loadings de PC1 y PC2, realizado con 10 espectros por región (apical y basal) de cada ejemplar.

### 3.3. Variabilidad geográfica de la composición de la pared celular

Cabe mencionar, en primer lugar, que la recolección de parte del material utilizado en este trabajo se realizó en un sitio no incluido en el área de distribución descrita anteriormente para *Codium vermilara* (Boraso de Zaixso, 2004) (**Figura 8**). Dicho área abarca las provincias de Chubut y Río Negro, mientras que el sitio La Farola se encuentra hacia el norte de esa zona, sobre la costa de la Provincia de Buenos Aires (39° 00' S, 61° 65' O).



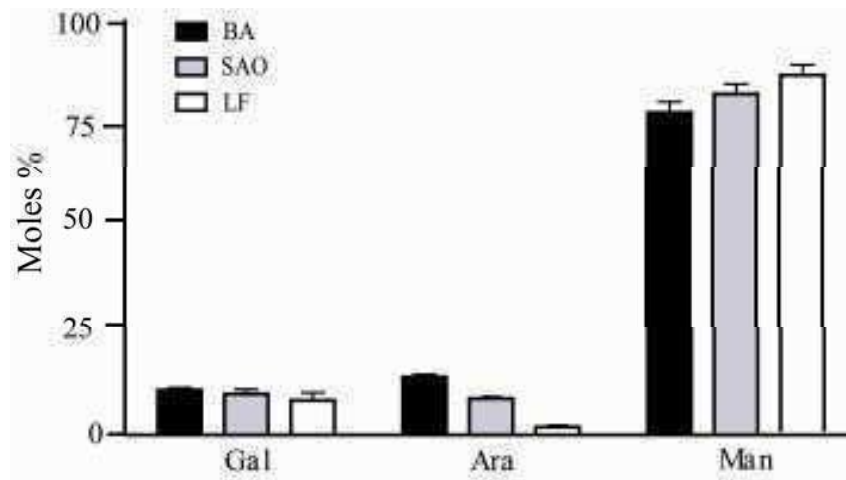
**Figura 8-** Distribución de *Codium vermilara* en aguas argentinas y sitios de recolección.

Al comparar los resultados del análisis químico (**Tabla 3**) de las muestras sin extraer de las tres poblaciones de *Codium vermilara* (LF, SAO y BA, en sentido norte-sur, **Figura 8**), se pudo observar que el contenido de galactano sulfatado se mantiene casi constante, mientras que el arabinano sulfatado muestra variaciones significativas. Se observa así un incremento relativo del contenido de arabinano de norte a sur, reflejándose en una relación molar D-Gal:L-Ara que va desde 1:0,5 en LF hasta 1:1,2 en BA, pasando por 1,0:0,65 en SAO. Por otro lado, los niveles de manano muestran un pequeño aunque significativo incremento en sentido opuesto (**Figura 9**).

**Tabla 3.** Análisis químico comparativo de las tres localidades (Bahía Arredondo, San Antonio Oeste y La Farola, en sentido sur-norte)

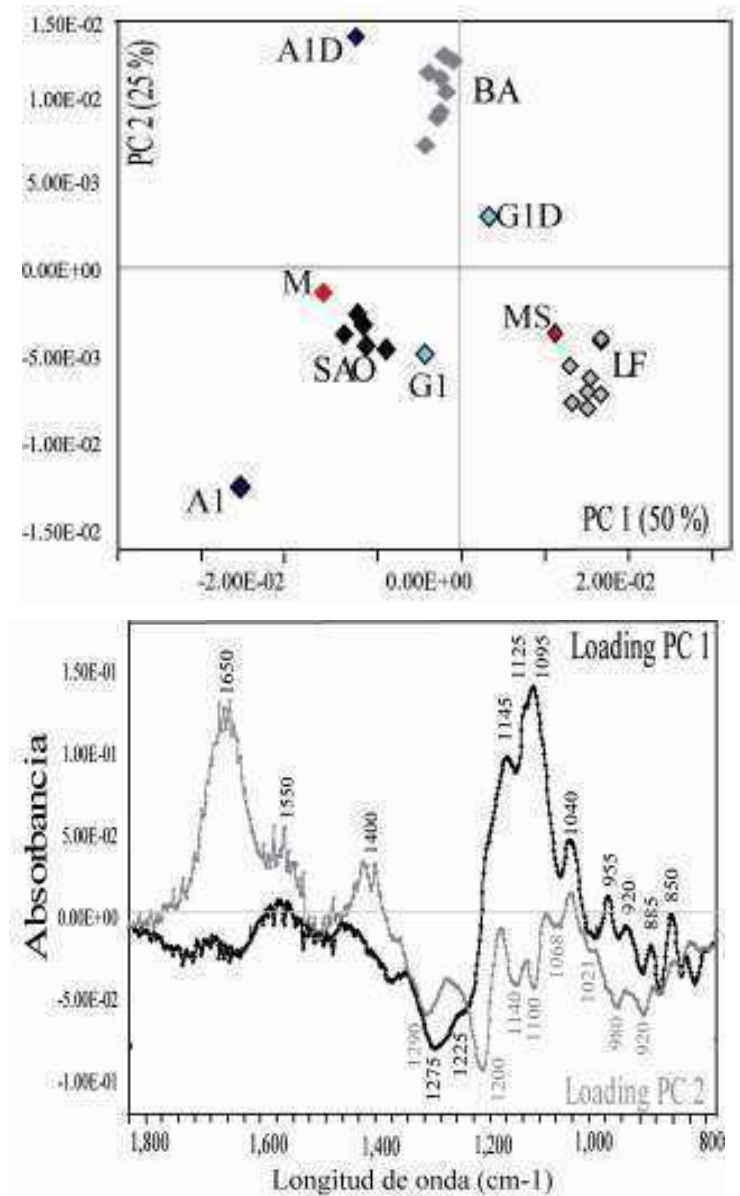
Muestra	AT %	Monosacáridos (moles %)			Gal:Ara Razón molar
		Gal	Ara	Man	
BA	24 ± 2	11	14	75	1:1,2
SAO	31 ± 5	11	8	81	1:0,7
LF	19 ± 2	10	4	86	1:0,5

AT= azúcares totales, descontando glucosa, expresado como % p/p ±



**Figura 9-** Composición de monosacáridos (moles %) de las muestras de Bahía Arredondo (BA), San Antonio Oeste (SAO) y La Farola (LF).

Adicionalmente, se analizó la variabilidad entre los sitios de recolección mediante FTIR-PCA. El grado de afinidad entre las muestras pudo visualizarse mediante un gráfico bidimensional incluyendo los dos primeros componentes, y la fuente de variabilidad gracias a los *loadings* correspondientes (**Figura 10**). Respecto del componente principal 1 (PC1), que explica el 50 % de la variabilidad total, las muestras de LF, SAO y BA se distribuyeron a lo largo del eje sin segregarse en grupos definidos. SAO se ubicó cerca del polisacárido de referencia M, mientras que el grupo LF lo hizo más cerca de MS, sugiriendo que el manano sulfatado es más abundante en las muestras de esa población, mientras que BA se ubicó en una posición intermedia. Por otro lado, en base al *loading* del PC2, se observa que las bandas de IR asociadas a A1 y G1 diferencian a SAO y LF de BA, indicando un posible incremento del contenido de ese tipo de polímeros y/o del nivel de sulfatación sobre los mismos en el primer grupo.



**Figura 10-** PCA de los espectros de las tres localidades y los compuestos modelo y *loadings* de PC1 y PC2. BA: Bahía Arredondo, SAO: San Antonio Oeste, LF: La Farola, A1D: arabinano desulfatado, A1: arabinano sulfatado, M: manano fibrilar, MS: manano sulfatado, G1D: galactano desulfatado, G1: galactano sulfatado.

### 3.4. Variabilidad temporal de la composición de la pared celular

#### 3.4.1. Análisis de la pared celular total

El análisis químico de las muestras sin extraer de La Farola (**Tabla 4**) no puso de manifiesto diferencias significativas entre las muestras; se observaron variaciones en la relación molar galactosa:arabinosa, mientras que el contenido de manosa estuvo en el rango de 81 a 87 mol %.

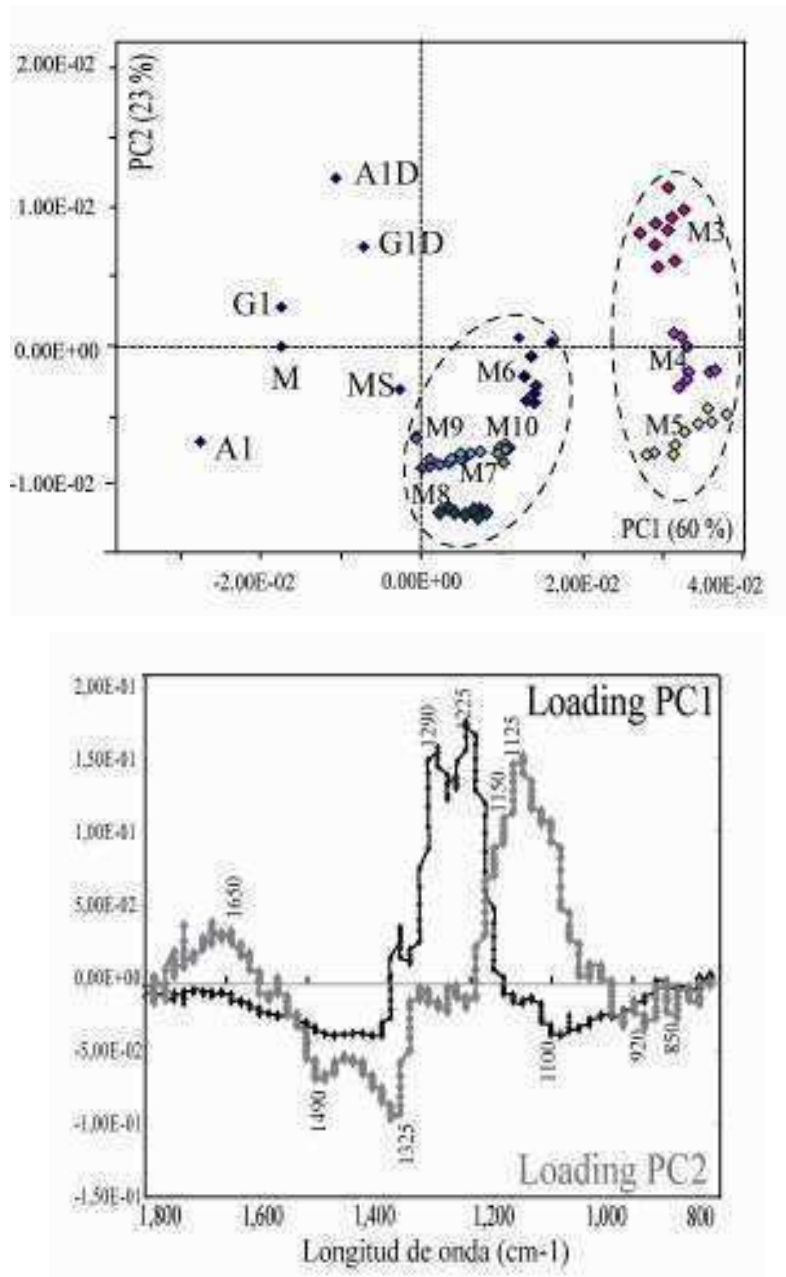
**Tabla 4.** Análisis químico de las muestras sin extraer (M3-10, LF).

Muestra	Fecha de colección	AT %	Monosacáridos (moles %)			Gal:Ara
			D-Gal	L-Ara	D-Man	Razón molar
M3	Nov-07	20 ± 2	11	6	83	1:0,5
M4	Dic-07	13 ± 1	11	4	85	1:0,4
M5	Mar-08	14 ± 1	10	5	85	1:0,5
M6	Jul-08	20 ± 2	10	4	87	1:0,4
M7	Dic-08	20 ± 1	11	4	85	1:0,3
M8	May-09	22 ± 2	14	5	81	1:0,3
M9	Sep-09	19 ± 3	11	3	86	1:0,3
M10	Dic-09	20 ± 3	13	4	84	1:0,3

AT= azúcares totales, descontando glucosa, expresado como % p/p ± desvío estándar.

En el análisis por FTIR-PC (**Figura 11**), M3-M5 se segregaron por separado de M6-M10 a lo largo del PC1, aunque esta diferencia no pudo ser asociada a la estructura de ninguno de los compuestos modelo utilizados. Un análisis más detallado de la composición de monosacáridos muestra que la diferencia entre los grupos definidos por PC1 podría estar relacionada con pequeñas variaciones en la relación molar galactosa:arabinosa (mayor para M3-M5 y algo menor para M7-M10, mientras que el valor para M6 no se corresponde con su ubicación en el segundo grupo), a la par que el contenido de manosa permanece casi constante. Por otro lado, respecto del PC2 las muestras tuvieron una distribución continua, sin que se observe segregación.





**Figura 11-** PCA de los espectros de M3-M10 y *loadings* de PC1 y PC2. A1D: arabinano, A1: arabinano sulfatado, M: manano, MS: manano sulfatado, G1D: galactano, G1: galactano sulfatado.

Estos resultados sugieren que la cantidad relativa de galactanos y arabinanos totales en las paredes celulares de *Codium vermilara* presenta pequeños cambios, así como el grado de sulfatación de los mismos a lo largo del tiempo, y que esos cambios serían independientes del momento del año en que se recolectó la muestra.

Se intentó determinar el contenido de sulfato de las muestras sin extraer mediante dos métodos (Dodgson y Price, 1962; Terho y Hartiala, 1971) pero el ruido causado por diversos contaminantes, incluyendo sulfato inorgánico, produjo notorias interferencias, por lo que estos métodos mostraron no ser apropiados para este tipo de material.

### 3.4.2. Estimación del nivel de sulfato

Con el objetivo de analizar el nivel de sulfatación de los polisacáridos sulfatados de la pared de *Codium vermilara* y sus posibles cambios, las algas se extrajeron con agua a temperatura ambiente con un rendimiento promedio de  $3\% \pm 0,3$ . Los análisis químicos y de FTIR-PC se realizaron entonces sobre los extractos obtenidos (M3E-M10E) (Tabla 5).

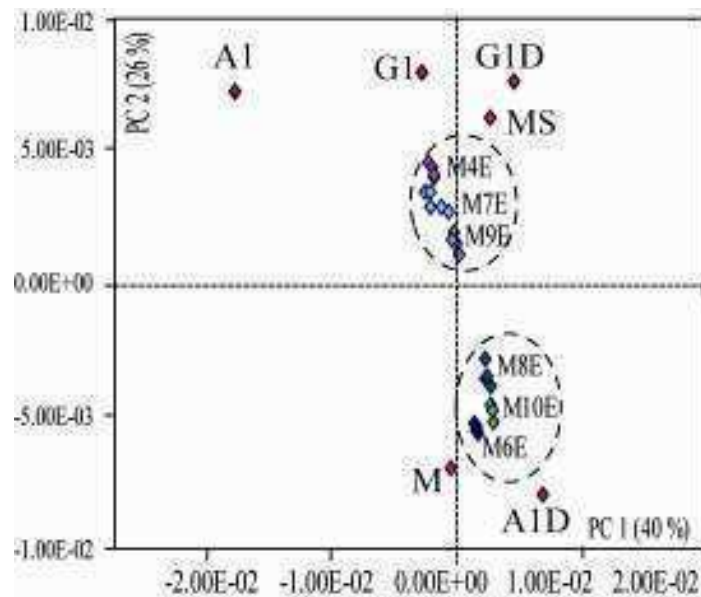
**Tabla 5.** Análisis químico de los extractos acuosos (M3E-M10E, LF)

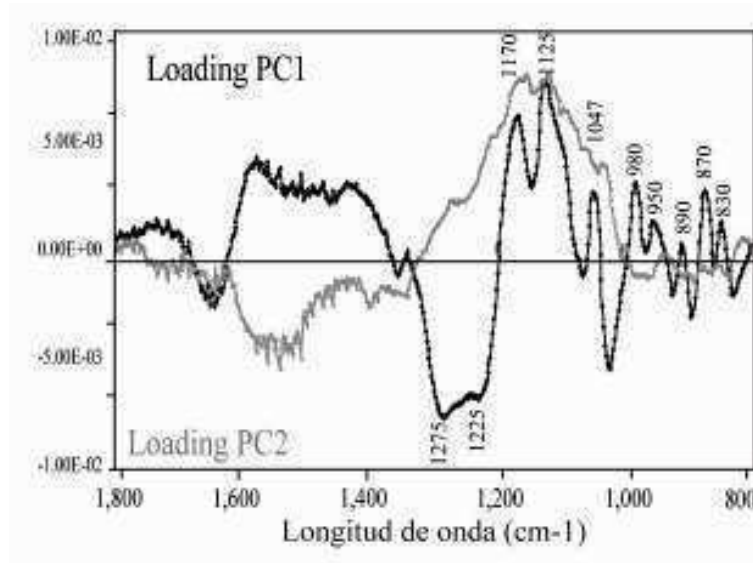
Extracto	Fecha de colección	AT %	AT:SO <sub>3</sub> Na Razón Molar	Monosacáridos (moles %)				Gal:Ara Razón Molar
				Gal	Ara	Man	Xil + Ram + Fuc	
M3-E	Nov-07	45 ± 1	1:0,5	49	30	13	8	1:0,6
M4-E	Dic-07	36 ± 1	1:0,5	52	29	10	9	1:0,6
M5-E	Mar-08	37 ± 1	1:0,5	53	31	8	8	1:0,6
M6-E	Jul-08	39 ± 5	1:0,5	41	38	8	13	1:1,0
M7-E	Dic-08	36 ± 3	1:0,5	65	18	8	9	1:0,3
M8-E	May-09	28 ± 5	1:0,6	56	25	10	10	1:0,5
M9-E	Sep-09	42 ± 1	1:0,5	56	14	9	21	1:0,3
M10-E	Dic-09	34 ± 2	1:0,6	59	19	14	8	1:0,3

AT= azúcares totales, descontando glucosa, expresado como % p/p ± desvío estándar.

Aunque el nivel de azúcares totales varió en M3E-M10E, la relación molar hidratos de carbono:sulfato se mantuvo casi constante sugiriendo que la extractabilidad de los componentes sulfatados de la pared celular fue la similar en todas las muestras analizadas (1:0,5-1:0,6). Por el contrario, la relación galactosa:arabinosa varió notablemente entre 1:0,3 (M7E, M9E y ME10), 1:0,5-0,6 (M3E, M4E, M5E, y M8E) a 1:1,0 (M6E), indicando cambios a lo largo del tiempo en la proporción entre galactano sulfatado y arabinano sulfatado, como se había observado antes para las muestras sin extraer (M3-M10).

De acuerdo con el análisis de FTIR-PC (**Figura 12**), los extractos resultaron ser muy similares respecto de PC1 (40 % de la variabilidad). No fue posible obtener espectros de calidad de las muestras faltantes en el análisis debido al bajo rendimiento de las extracciones. Respecto de PC2 (23 %) fue posible distinguir las muestras M6E, M8E y M10E del grupo formado por M4E, M7E y M9E. De acuerdo a la referencia de los compuestos modelo, habría en este último grupo una mayor sulfatación relativa sobre el arabinano y el manano, en comparación con M6E, M8E y M10E. Nuevamente, esto parece confirmar que la variabilidad en la pared celular estaría asociada a cambios en los niveles de sulfatación en polímeros específicos, aunque el nivel total de sulfatación se mantenga constante.





**Figura 12-** PCA de los espectros de los extractos de las muestras y *loadings* de PC1 y PC2. A1D: arabinano desulfatado, A1: arabinano sulfatado, M: manano fibrilar, MS: manano sulfatado, G1D: galactano desulfatado, G1: galactano sulfatado.

### 3.4.3. Determinación total de sulfato

En dos de las muestras (M3 y M8) se determinó por microanálisis elemental el contenido de sulfato en el residuo de la extracción acuosa (**Tabla 6**).

**Tabla 6.** Contenido de sulfato de las muestras M3 y M8 (residuo, extracto y total en el material original)

Muestra	SO <sub>3</sub> Na %		
	Residuo	Extracto	Material original
M3	3	16	4
M8	2	11	3

Este dato, junto con el contenido de sulfato de los respectivos extractos y el rendimiento de la extracción, permitió calcular el contenido de sulfato en el material original, que no se había podido determinar por otros medios. En ambas muestras, el nivel de sulfatación original calculado fue similar (entre 3 y 4 % p/p de la biomasa inicial).

## **Resumen de los resultados 1° Parte-B:**

-Se validó el uso de los talos enteros para el análisis, ya que no se observaron diferencias significativas entre las determinaciones realizadas con la parte basal y la parte apical de un mismo talo. Tampoco se observaron diferencias significativas entre las determinaciones realizadas sobre diferentes individuos de un mismo muestreo, por lo que se usó una mezcla de talos (n=10) para las siguientes determinaciones.

-El análisis de las muestras tomadas en el mismo momento del año en las tres localidades (La Farola, San Antonio Oeste y Bahía Arredondo) mostró que el contenido relativo de arabinosa aumenta en sentido norte-sur, mientras que el de manosa lo hace en sentido contrario, aunque en menor medida.

-El análisis de la variabilidad temporal en las muestras de La Farola indicó que si bien hay diferencias significativas en las cantidades relativas de cada polisacárido, el nivel de sulfatación total de la pared se mantiene constante.

-Esto sugiere la existencia de mecanismos complejos de regulación del nivel de sulfatación de la pared, remarcando la importancia de esta característica como adaptación al ambiente marino.

-En cuanto a la metodología usada, las determinaciones químicas y el análisis por FTIR acoplado a Análisis de Componentes Principales dan información diferente y complementaria sobre la pared celular. Mientras la composición de monosacáridos da la proporción relativa de los polisacáridos presentes, el análisis basado en IR da idea del grado relativo de sulfatación de cada uno de ellos.

-La combinación del análisis químico con la espectroscopía infrarroja asociada a técnicas estadísticas de compresión constituye un enfoque valioso para el estudio de variaciones espacio-temporales en los componentes de las paredes celulares.

**VISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**  
**(1° PARTE A y B)**

### Polisacáridos de las paredes celulares de algas.

Las algas verdes del género *Codium* desarrollan paredes celulares complejas, diferentes a las de otros grupos de algas marinas, tanto rojas y pardas como de otros grupos de algas verdes. Las especies de *Codium*, así como algunos otros géneros del orden Bryopsidales, producen  $\beta$ -(1→4)-D-mananos como componentes fibrilares principales de sus paredes (Love y Percival, 1964; Mackie y Preston, 1968; Huizing y Rietema, 1975; Chanzy et al., 1984; Kaihou et al., 1993). Por otro lado, las algas del género *Codium* sintetizan sistemas complejos de polisacáridos sulfatados que constituyen la matriz de sus paredes celulares.

En algunos casos, se ha encontrado alternancia generacional en la composición de la parte fibrilar de la pared, como el caso de especies de *Derbesia* donde el macrotalo esporofítico produce mananos y el microtalo gametofítico, xilanos. Lo mismo sucede en el género *Bryopsis*, con la diferencia de que el esporofito es un microtalo y el gametofito es macroscópico. La diplofase del alga verde marina *Acetabularia acetabulum* (Dasycladales) sintetiza  $\beta$ -(1→4)-D-mananos no cristalinos y para-cristalinos, con bajos niveles de sustitución, mientras que sus gametangios tienen paredes celulósicas donde también se encuentra una porción de mananos (Dunn et al., 2007). El alga *Codiolum pusillum* (Chlorococcales), por su parte, produce como polisacárido sulfatado minoritario un  $\beta$ -(1→4)-D-manano ramificado en C-6 y con grupos sulfato sobre C-2 (Carlberg y Percival, 1977). Otros mananos similares en cuanto a su composición y patrón de sustitución se describieron para las algas rojas *Chondrophyucus papillosus* y *C. flagelliferus* (Ceramales) (Cardoso et al., 2007), aunque en estos casos se trata de componentes minoritarios, ya que los principales polisacáridos de la matriz de la pared son agaranos. Estos últimos mananos presentan sulfatación en C-2 y sustituciones en C-6 con unidades de  $\beta$ -D-xilosa o  $\beta$ -D-manosa sulfatadas en C-2. En el caso de *Codium vermilara*, esta tesis describe como componente minoritario de la pared celular un  $\beta$ -(1→4)-D-manano de grado intermedio de sulfatación, con grupos sulfato ubicados en la posición 2 del 23% de las unidades de manosa (MS). Sumado a los ejemplos antes mencionados, esto sugiere que las enzimas responsables de la síntesis de mananos podrían haber surgido varias veces a lo largo de la evolución de las algas rojas y verdes (Popper y Tuohy, 2010). El manano MS de *C.vermilara* podría cumplir una función de interfase entre las zonas fibrilares neutras de

la pared, que se distribuyen en una capa externa y una interna, según surge del análisis de localización *in situ*, y la zona central amorfa, donde se ubican los polisacáridos sulfatados. Los trabajos sobre *Kappaphycus alvarezii*, alga roja de pared celulósica donde se encontró un glucano sulfatado con bajo rendimiento (Lechat et al., 2000), apoyan la idea de que en algunos casos podría haber mecanismos que generan una nueva macromolécula a partir de una estructura mayoritaria (celulosa o manano fibrilar según el caso), con una función biológica diferente. Esto se lograría modulando la solubilidad y las propiedades físico-químicas de los biopolímeros de la pared celular a través de factores como el grado de polimerización, la sustitución con sulfato, la presencia de cadenas laterales, etc.

Love y Percival (1964) reportaron que los polisacáridos solubles en agua de *Codium fragile* estaban compuestos por unidades de galactopiranososa y de arabinopiranososa unidas por C-3, estando las primeras sulfatadas en C-4 o C-6, mientras que sobre las segundas los grupos sulfato se ubican en C-2 o C-4. Más recientemente, los trabajos preliminares de nuestro laboratorio sobre *C. fragile* y *C. vermilara* indicaron que los extractos acuosos a temperatura ambiente de ambas algas contenían una familia de arabinogalactanos sulfatados y/o arabinanos y galactanos sulfatados (Ciancia et al., 2007). Los análisis descriptos en esta tesis permiten afirmar que, al menos en el caso de *C. vermilara* se trata de una mezcla de galactanos y arabinanos. Respecto de los galactanos, en años recientes se han publicado varios trabajos donde se reporta su aislamiento y caracterización (Bilan et al., 2007; Farias et al., 2008; Ohta et al. 2009). Se trata de estructuras similares,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactanos con pequeñas variaciones en cuanto a los patrones de ramificación y sustitución con grupos sulfato y ácido pirúvico. Esta variabilidad podría corresponder a diferencias interespecíficas y/o a la influencia de los procedimientos utilizados para la obtención de los polímeros. Lo mismo puede decirse del caso de los galactanos aislados de *Codium vermilara* aquí estudiados.

Por el contrario, la información acerca de los polisacáridos ricos en arabinosa de especies de *Codium* era relativamente escasa (Hayakawa et al., 2000; Siddhanta et al., 1999) al momento de comenzar este trabajo de tesis. A excepción de los reportes tempranos ya mencionados, en los arabinanos encontrados anteriormente se había reportado que la arabinosa estaba presente en forma furanósica. Los arabinanos sulfatados piranósicos de *Codium vermilara* descriptos en esta tesis resultan entonces



los primeros en su tipo, tanto para el género como para algas en general y para cualquier tipo de organismo, como se desprende de la literatura actualmente disponible.

### **Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs).**

En trabajos previos en nuestro laboratorio (Estevez et al., 2009) se había detectado la presencia de epitopes de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) en las paredes de *Codium fragile*. En este caso, se distribuían en una ancha capa interna y una externa mucho más delgada, al igual que el manano fibrilar. En el caso de *C. vermilara*, los epitopes de HRGPs también colocalizan con el manano fibrilar, pero en este caso forman dos capas de igual espesor. Los proteoglicanos del tipo HRGPs detectados en *Codium vermilara* reaccionaron con distintos anticuerpos monoclonales, generados tanto contra arabinogalactano proteínas (AGPs) como contra extensinas de plantas superiores. En el caso de los anticuerpos monoclonales JIM16 y MAC207, se sabe que reconocen la fracción de carbohidrato de las AGPs, aunque se ignora cuáles son los epitopes específicos reconocidos por ellos (Knox et al., 1991, Yates e tal., 1996). La purificación y caracterización de las glicoproteínas tipo HRGP presentes en *C. vermilara*, tanto de la parte proteica como la de carbohidrato, permitiría dilucidar estas cuestiones. Lamentablemente, los intentos de aislar estos compuestos mediante inmunoprecipitación con anticuerpos específicos realizados en el marco de esta tesis no dieron resultado, probablemente, al menos en parte, debido a la baja proporción en que se encuentran y a la interferencia de los compuestos sulfatados.

Los dos tipos de HRGPs difieren en el patrón de *O*-glicosilación, que está determinado por la secuencia primaria de la fracción proteica (Ellis et al., 2010). La presencia de grupos de unidades de prolina 4-hidroxilada contiguas, característica de las extensinas, genera sustitución con oligosacáridos de arabinosa. Por el contrario, en las AGPs se encuentran unidades de hidroxiprolina aisladas en el contexto de ciertas secuencias de aminoácidos, sobre las cuales se produce la sustitución con cadenas más complejas, ramificadas y formadas por galactosa, arabinosa y cantidades menores de ramnosa y ácido glucurónico.

La presencia de HRGPs del tipo AGPs en paredes celulares está extendida no sólo en plantas superiores sino también en micro- y macro algas de agua dulce como *Chara*,

*Chlamydomonas*, *Micrasterias*, *Oedogonium* y *Pleurotaenium* (Lutz-Meindl y Brach-Solomon, 2000; Ender et al., 2002; Popper y Fry, 2003; Hallman, 2006; Domozych, 2007; Eder et al., 2008; Estevez et al., 2008). La existencia de AGPs tanto en algas verdes como en plantas terrestres sugiere para estos compuestos roles biológicos esenciales posiblemente asociados a la porción de hidratos de carbono que se encuentra muy bien conservada en estos *O*-glicanos. La ubicación en zonas apicales del utrículo tanto en *C. vermilara* como en *C. fragile* (Estevez et al., 2009) sugiere además alguna relación con la expansión celular apical, como ya fuera demostrado en la briofita *Physcomistrella patens* (Lee et al., 2005)

El segundo tipo de HRGPs detectado en las paredes de *C. vermilara*, las extensinas, está presente en plantas (Knox et al., 1991) así como en el alga *Chlamydomonas* (Hicks et al., 2001) pero no se encontró en las paredes de *Micrasterias* (Eder et al., 2008).

### **Modelos de pared celular en algas.**

Cabe destacar que hasta el momento, no se cuenta con otro modelo de pared celular para algas cenocíticas. En el caso de macroalgas verdes, sólo se encuentra disponible un modelo detallado para el caso del alga laminar *Ulva* sp. (Bobin-Dubigeon et al., 1997). Si bien es difícil hacer una comparación entre ambos tipos de algas, pueden plantearse ciertas homologías: en primer lugar, entre los polisacáridos sulfatados de las paredes de *Codium* y los llamados “ulvanos” (xiloglucuronamnanos sulfatados) y glucuronanos de *Ulva*. En segundo lugar, entre el manano fibrilar de *Codium*, y el glucoxilano y la celulosa de *Ulva* (Lahaye et al., 1994; 1996), ya que todos ellos presentan esqueletos  $\beta$ -(1→4) y funciones estructurales similares.

### **Variabilidad en los componentes de la pared.**

El análisis de la composición de la pared de las tres poblaciones de *Codium vermilara* permitió establecer que el contenido de arabinano muestra un incremento en sentido norte-sur, y el de manano lo hace en sentido opuesto. En el análisis temporal se observaron cambios en el contenido de los polisacáridos y en el grado de sulfatación de cada uno de ellos, manteniéndose el nivel de sulfatación total. Dado que dichos niveles de sulfatación parecen mantenerse constantes en *Codium vermilara*, podría suponerse

que estas algas han desarrollado un mecanismo de regulación que les permite controlar los niveles de sulfato en sus paredes. En cuanto a la porción fibrilar de la pared, el manano no sulfatado, con una estructura muy regular de unidades enlazadas en forma  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), mostró niveles constantes a lo largo del tiempo, aunque se observó cierta variación con la latitud.

La caracterización química y el análisis por FTIR-PCA brindan información diferente y complementaria sobre la variabilidad de la pared celular. Mientras que a partir de la composición de monosacáridos (obtenida mediante derivatización y análisis por cromatografía gaseosa) puede inferirse la proporción relativa de los polisacáridos presentes, el análisis basado en IR da una idea del grado relativo de sulfatación de cada uno de esos polímeros para cada grupo de muestras. La utilización combinada de ambas técnicas, por lo tanto, permite obtener una visión más completa de las variaciones en los polisacáridos que componen la pared celular.

#### **Biosíntesis de polisacáridos sulfatados.**

La regulación de los niveles de sulfatación en la pared podría suceder, en primer lugar, mediante el control de la síntesis y degradación de los polisacáridos de pared, y en segundo lugar por el ajuste de la expresión y actividad de sulfotransferasas en el aparato de Golgi y sulfhidrolasas localizadas en el aparato de Golgi y/o la pared. Es relativamente poco lo que se conoce acerca de la biosíntesis de los componentes de pared celular en algas, siendo mucho más abundante la información disponible al respecto en plantas. Los análisis del genoma de plantas en los casos en que éste ha sido completamente secuenciado muestran la existencia de cientos de enzimas relacionadas con hidratos de carbono (conocidas como *CAZy enzymes*, enzimas con actividad hacia carbohidratos), siendo la mayoría de ellas glicosiltransferasas (GT) y glicósido-hidrolasas (GH) con roles clave en la síntesis y modificación de la pared celular (Yin et al., 2010).

Aquino y colaboradores (2011) proponen que los genes responsables de la biosíntesis de polisacáridos sulfatados (PS) de pared podrían haberse conservado a lo largo de la evolución, y que modificaciones en los genes que codifican glicosiltransferasas (GT)

podieron alterar la composición de los PS en los distintos grupos filogenéticos. Otro estudio (Yin et al., 2010) encaró el análisis de 15 genomas de plantas, algas y cianobacterias con el objetivo de identificar genes pertenecientes a una familia de glicosiltransferasas (GT 8, vinculada a la síntesis de pectinas fundamentalmente). Sus conclusiones, junto con trabajos previos sobre celulosa en cianobacterias (Nobles 2001, 2004), les permiten proponer que las tres clases principales de polisacáridos de pared (celulosa, hemicelulosas y pectinas) están presentes desde un momento relativamente temprano de la evolución y que al menos algunos de ellos fueron adquiridos por las plantas, junto con la aparición de los plástidos, mediante endosimbiosis (es decir, la transformación de organismos endocitobiontes en organelas del organismo hospedador).

La síntesis de hemicelulosas y pectinas en plantas, así como de varias glicoproteínas de pared, es llevada a cabo en el aparato de Golgi por GT específicas que actuarían en complejos, transfiriendo cada azúcar a los oligosacáridos aceptores, a partir de un nucleótido donador (Dupree y Sherrier, 1998). Estas enzimas se encontrarían compartimentalizadas para facilitar el reconocimiento de los sustratos por parte de las enzimas. Los polímeros así sintetizados son luego exportados a la pared celular por exocitosis (Sandhu et al., 2009). Es probable que al igual que otros polímeros de matriz de pared de plantas y de otras algas (pectinas, alginatos y galactanos de algas rojas), los PS de *Codium vermilara* sean sintetizados en el aparato de Golgi como oligosacáridos y exportados a la pared celular mediante vesículas secretoras (Tveter-Gallagher et al., 1984). Las modificaciones y ensamblaje de estos polisacáridos con carga negativa involucran enzimas como la pectina-metil-esterasa (pectinas de plantas terrestres), alginato-C5-epimerasa (alginatos de algas pardas), y D-/L-galactosa-6-sulfurilasa (carragenanos y agaranos en algas rojas).

Además de las GT, otras enzimas son necesarias para la síntesis de los polisacáridos de pared. En el caso del arabinano, por ejemplo, una decarboxilasa genera el sustrato para la arabinosiltransferasa a partir de UDP-GlcA, dando lugar a UDP-Xil que luego es convertida en UDP-Ara. Se han señalado algunos genes que probablemente codifican arabinosiltransferasas, tanto en dicotiledóneas como en gramíneas (donde el nivel de sustitución con arabinosa es mayor) (Mitchell et al., 2007). No obstante, ninguna de estas enzimas fue identificada aún (Sandhu et al., 2009), con excepción de las arabinosiltransferasas que transfieren estos azúcares a O-glicoproteínas de tipo

extensinas (Velasquez et al., 2011). Por otro lado, se encontró que una proteína asociada a Golgi cataliza la interconversión de las formas furanósica y piranósica de UDP-arabinosa (Konishi et al., 2007; Sandhu et al., 2009), tanto en distintos grupos de plantas vasculares y en briofitas como en algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*), aunque se desconocen los transportadores de UDP-Arap y UDP-Araf que posiblemente estén asociados al aparato de Golgi.

Pomin y Mourão (2008) resaltan la presencia de polímeros de  $\beta$ -(1→3)-galactopiranosas como una característica conservada en distintos grupos de eucariotas (algas rojas y verdes, angiospermas, equinodermos y moluscos). Esto conlleva la hipótesis de que también las galactosiltransferasas responsables de la síntesis de esos polímeros fueron conservadas, mientras que otro tipo de enzimas serían responsables de la variabilidad encontrada en sus patrones de ramificación y sulfatación.

Los genes relacionados con la pared celular mejor estudiados corresponden a la superfamilia de las celulosa-sintasas, que se ha diversificado a lo largo de la evolución en una familia de celulosa sintasas (CesA) y nueve familias que codifican enzimas “tipo celulosa sintasa” (Csl, por *cellulose synthase-like*) (Popper y Tuohy, 2010). Se trata, en el primer caso, de proteínas que forman complejos en la membrana plasmática y sintetizan celulosa a la par que la liberan hacia el exterior de la célula. En el caso de las Csl, su existencia fue predicha a partir de la similitud estructural entre las cadenas de  $\beta$ (1→4)-glucanos de la celulosa y las cadenas principales con uniones  $\beta$  que constituyen los polisacáridos hemicelulósicos, aunque en este caso se trate de proteínas localizadas en el aparato de Golgi (Lerouxel et al., 2006). En 2004, Dhugga y colaboradores demostraron que un miembro de una de esas familias (CslA) codifica una  $\beta$ -(1→4)-D-manano sintasa involucrada, junto con otras glicosiltransferasas, en la producción de galactomananos. Se han reportado mayores niveles de manano en las paredes celulares de plantas no-espermatofitas (briofitas, licopodiofitas, equisetofitas y psilotofitas) que en las de helechos leptosporangiados, gimnospermas y angiospermas (Popper y Fry, 2003; Nothnagel y Nothnagel, 2007), lo que sugiere que la presencia de  $\beta$ -(1→4)-D-mananos sería una adquisición temprana en la evolución de las plantas terrestres (Sorensen et al., 2010). Popper y Tuohy (2010) proponen que la presencia de mananos en sus paredes celulares podría haber facilitado el éxito y la diversificación de las algas verdes. Sin embargo, la familia CslA parece estar ausente en las algas verdes, donde sí

se han encontrado este tipo de mananos (Popper y Tuhoy, 2010), tanto en especies del género *Codium* como en otras, por ejemplo *Acetabularia acetabulum* (Dunn et al., 2007). En estas algas, una familia de Csl distinta a CslA sería responsable de la síntesis de estos polisacáridos (Yin et al., 2009), y podría haber originado luego a las familias CslA y CslC de plantas terrestres. Esta familia de Csl parece estar ausente en algas rojas y pardas; en las últimas no se han encontrado mananos, y sí en algunas especies de algas rojas, donde serían sintetizados por otro tipo de enzima.

Los polisacáridos de la pared celular pueden, una vez sintetizados y ensamblados, sufrir modificaciones que se relacionan principalmente con el crecimiento. A través de cambios en la rigidez de la pared, en procesos a su vez regulados hormonalmente, una serie de enzimas modulan la expansión celular: endoglicanasas que atacan el esqueleto de los polisacáridos de matriz, glicosidasas que eliminan cadenas laterales y permiten mayor interacción entre las cadenas principales, esterasas que remueven grupos metilo de las pectinas, peroxidasas que forman o rompen enlaces fenólicos (Cosgrove, 2001). Algunas de estas enzimas han sido identificadas y caracterizadas en plantas (Cosgrove, 2005). En el caso de las algas, una vez más, la información disponible es mucho más escasa. En algas agarofitas, por ejemplo, no se detectó degradación los polisacáridos por parte de enzimas endógenas, mientras esos mismos polímeros son degradados por enzimas bacterianas o de otras fuentes (Hemmingson et al., 1996). En el caso de los fucoidanos sulfatados de algas pardas, muy estudiados por sus propiedades biológicas, si bien es muy poco lo que sabe sobre su síntesis, se conocen varias enzimas capaces de degradarlos, que han sido aisladas de distintas especies marinas (bacterias, moluscos y otros invertebrados) (Berteau et al., 2002; Berteau y Mulloy, 2003; Colin et al., 2006). Cabe destacar la importancia de este tipo de enzimas tanto para los estudios estructurales de los polímeros como para la obtención de productos modificados con vistas a optimizar su actividad biológica.

Las sulfotransferasas (ST) transfieren grupos sulfato a distintas moléculas, aunque el principio que determina su especificidad respecto del sustrato no se conoce en detalle (Tveter-Gallagher et al., 1984; Wu y Gretz, 1990; Negishi et al., 2001). Si bien sólo han sido estudiadas en profundidad en animales, se las encuentra en todos los grupos de organismos, excepto Archaea (Klein y Papenbrock, 2004). Mientras que en organismos unicelulares se relaciona a estas enzimas, y en particular a los polisacáridos sulfatados,

con la comunicación con el medio, en los multicelulares se las ha vinculado con diversos aspectos de la comunicación célula-célula (Bowman y Bertozzi, 1999). La superficie celular y la matriz extracelular presentan gran diversidad de polisacáridos, asociados a lípidos y proteínas, que son secretados tras su síntesis en el aparato de Golgi, donde constituyen el sustrato para ST transmembrana. Éstas actuarían en forma coordinada con otras enzimas de la vía sintética correspondiente (Kusche-Gullberg y Kjellén, 2003). De este modo, a la diversidad estructural propia de las cadenas de polisacáridos, se suma la posibilidad de obtener distintos patrones de sulfatación (además de otras modificaciones por formación de enlaces covalentes, como piruvilación, metoxilación, etc.) sobre un mismo esqueleto (Bowman y Bertozzi, 1999).

Tanto en eucariotas como en bacterias las ST presentan dominios muy conservados, en particular el sitio de unión a 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), que actúa universalmente como dador del grupo sulfato que se transfiere a un -OH o, más raramente, -NH. Los dos tipos de ST conocidos, citosólicas y transmembrana, pertenecerían a una misma superfamilia de genes (Negishi et al., 2001) y el hecho de que se haya conservado el núcleo catalítico sugiere además un mecanismo común. Las ST citosólicas actúan sobre sustratos pequeños y han sido más estudiadas a nivel estructural. Se conoce menos sobre ST de membrana, que transfieren grupos sulfato a macromoléculas como proteínas y glicosaminoglicanos (GAGs). No obstante, se ha identificado a la mayoría de las ST que intervienen en la biosíntesis de GAGs en mamíferos (Kusche-Gullberg y Kjellén, 2003). En cuanto a plantas, son pocas las ST identificadas, y en su mayoría citosólicas, a excepción de una enzima de la leguminosa *Mimosa pudica* que se ubica en la membrana plasmática y, a través de la sulfatación del ácido gálico ( $\beta$ -D-glucopiranosil-6'-sulfato), regula el movimiento defensivo de las hojas (Varin et al., 1997; Klein y Papenbrock, 2004). En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han señalado 18 genes que podrían corresponder a ST, aunque ninguno incluye un fragmento transmembrana (Klein y Papenbrock, 2004), y sólo una enzima, que actúa sobre hidroxijasmonato, fue caracterizada funcionalmente (Gidda et al., 2003). La hidroxilación y posterior sulfatación del jasmonato parece ser parte de un mecanismo de control de la actividad y/o exceso de esta hormona vegetal.

Asimismo se ha encontrado que las simbiosis que establecen, en forma muy específica, bacterias fijadoras de nitrógeno con distintas leguminosas son reguladas mediante la

secreción de lipopolisacáridos por parte de las bacterias y la presencia de receptores en los pelos radicales de la planta. Esos lipopolisacáridos pueden ser sulfatados o sin sulfatar, y se ha caracterizado una ST encargada de tal modificación (Bowman y Bertozzi, 1999). En este contexto, y si bien aun no se han identificado, pueden plantearse algunas suposiciones sobre las ST que intervendrían en la biosíntesis de polisacáridos sulfatados en algas verdes: presencia de algunos de los dominios conservados característicos, PAPS como dador de sulfato y ubicación en el aparato de Golgi junto con otras enzimas encargadas de la construcción del esqueleto del polisacárido.

Las sulfhidrolasas (SH) hidrolizan enlaces éster sulfato y se encuentran en raíces de plantas, bacterias y hongos, desde donde son liberadas al suelo para aumentar la disponibilidad de azufre (Hunt et al., 1986). En el caso de las algas, inicialmente se describieron SH relacionadas con la modificación de galactanos de algas rojas (Lawson y Rees 1970; Wong y Craigie 1978), aunque no se las ha encontrado aún en algas verdes. En los galactanos de algas rojas, las SH catalizan la conversión de galactosa 6-sulfato en 3,6-anhidrogalactosa, cuyo nivel regula la capacidad de gelificación al afectar la conformación que adoptan los polisacáridos. La presencia de unidades de 3,6-anhidrogalactosa favorece la formación de la estructura de doble hélice que genera geles más compactos, una característica deseable, por ejemplo, ante la exposición a un oleaje más intenso (Percival, 1979).

### **Funciones de los polisacáridos sulfatados.**

Se han reportado polisacáridos sulfatados en una variedad de organismos: vertebrados, invertebrados, algas y plantas vasculares marinas (Mourão et al., 1996; Aquino et al., 2005). Si bien algunas estructuras se repiten en todos estos grupos, como los  $\beta$ -(1→3) galactanos, se observan diferencias en los patrones de sulfatación, con una tendencia hacia la sulfatación en C-4 en algas y angiospermas marinas y en C-2 en invertebrados, mientras que la sustitución con sulfato en C-6 es dispersa en los distintos grupos. Puede proponerse una relación de analogía entre los polisacáridos cargados de estos distintos grupos, ya que en todos los casos se ubican de modo tal que forman una capa protectora, sea la matriz extracelular del tejido conectivo en mamíferos, la túnica de las ascidias o las paredes celulares de algas marinas. Probablemente, los mejor estudiados



sean los glicosaminoglicanos (GAGs) sulfatados de mamíferos. En comparación, los polisacáridos sulfatados (PS) que se encuentran en organismos marinos son de mayor peso molecular y más sulfatados (los GAGs contienen en promedio un grupo sulfato por unidad de disacárido). Esto podría relacionarse con el hecho de que las interacciones entre componentes de la matriz extracelular en un ambiente marino ocurren a mayores concentraciones salinas, y se requieren polisacáridos con mayor densidad de carga (Pomin y Mourão, 2008).

Existe consenso alrededor de la idea de que la síntesis de polisacáridos sulfatados en organismos marinos representa una respuesta evolutiva a una fuerte presión selectiva presente en dichos ambientes (Aquino et al., 2005). Más recientemente, Aquino y colaboradores (2011) demostraron que la presencia de polisacáridos sulfatados en plantas vasculares halófitas es más común de lo que se creía, y encontraron una correlación entre el nivel de salinidad ambiental y la síntesis de dichos compuestos. Dicho trabajo propone además que la salinidad del ambiente no sólo produce cambios en la cantidad de polisacáridos sulfatados sino también en el grado de sulfatación de los mismos.

En el caso de las algas, el nivel de sulfatación en las paredes celulares y matrices intercelulares impacta fuertemente sobre la homeostasis celular, mediante la regulación iónica, mecánica e hídrica de la pared (Kloareg y Quatrano, 1988). A partir de lo observado en numerosos estudios, puede concluirse que la proporción de polisacáridos cargados se incrementa hacia las capas más externas de la pared celular; esto sugiere que la matriz intercelular podría actuar como una estructura conectiva entre células. Por otro lado, dado que en la mayoría de las algas marinas la matriz representa una alta proporción de las paredes celulares, sus características fisicoquímicas determinarían las propiedades mecánicas de los tejidos. Esto es de gran importancia en ambientes donde las presiones ejercidas por el oleaje determinan los patrones de distribución de los organismos. En algas pardas, se ha encontrado correlación entre la rigidez de tejidos y la de los geles obtenidos a partir de alginatos extraídos de esos mismos tejidos (Kloareg y Quatrano, 1988). También se observaron diferencias en el contenido de sulfato del agar proveniente de partes del talo, siendo menor el contenido en las partes más jóvenes.

En cuanto a la regulación hídrica, es de vital importancia en ambientes donde las algas se hallan expuestas a la desecación por efecto de las mareas. La regulación de la actividad enzimática sobre ciertos polisacáridos determinaría su capacidad para formar soluciones viscosas, asegurando que eso suceda una vez que fueron secretados a la pared y no antes en la vía secretoria. El rol de los PS al respecto está en debate; mientras algunos resaltan su capacidad para actuar como coloides hidrofílicos, otros estudios apuntan a la elasticidad de la red de polisacáridos o la reducción de la razón área/volumen de los talos como factores clave en la resistencia a la desecación (Mariani et al., 1985; Kloareg y Quatrano, 1988).

Otra consecuencia de los ciclos mareales son las variaciones en el entorno iónico que rodea a las algas. Los PS podrían tener un rol en la regulación iónica como intercambiadores, adsorbiendo cationes y actuando como una barrera iónica (Mariani et al., 1985). Diferencias en la selectividad con la que se unen a determinados cationes y en la localización en la pared originarían gradientes en la distribución de cationes a lo largo de la pared celular, aunque no está claro cuál sería el efecto biológico de dichos gradientes (Kloareg y Quatrano, 1988).

Los PS de organismos marinos se han relacionado además con funciones de comunicación, adhesión, desarrollo, etc. En algas pardas del género *Fucus*, fucanos sulfatados se localizan en rizoides y son necesarios para la adhesión al sustrato (Falshaw et al., 1999). En equinodermos, una cierta distribución de los grupos sulfato sobre un fucano que rodea los huevos interviene en el reconocimiento específico y la unión de proteínas del esperma, y de este modo posibilita la fertilización (Mourão, 2007).

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ahmed A.E.R. y Labavitch J.M. 1977. "A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content" *Journal of Food Biochemistry* 1: 61-365.

Aquino R.S., Grativol C. y Mourão P.A.S. 2011. "Rising from the sea: correlations between sulfated polysaccharides and salinity in plants" *PLoS ONE* 6(4):e18862.

Aquino R.S., Landeira-Fernández A.M., Valente A.P., Andrade L.R. y Mourão P.A.S. 2005. "Ocurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications" *Glycobiology* 15(1):11-20.

Bauer S., Vasu P., Persson S., Mort A.J. y Somerville C.R. 2006. "Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls" *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America* 103:11417-11422

Becker C.F., Guimarães J.A., Mourão P.A.S. y Verli H. 2007. "Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: implications to their anticoagulant activities" *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26:391–399.

Berteau O. y Mulloy B. 2003. "Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide" *Glycobiology* 13(6):29-40.

Berteau O., McCort I., Goasdoué N., Tissot B. y Daniel R. 2002. "Characterization of a new  $\alpha$ -L-fucosidase isolated from the marine mollusk *Pecten maximus* that catalyses the hydrolysis of  $\alpha$ -L-fucose from algal fucoidan (*Ascophyllum nodosum*)" *Glycobiology* 12(4):273-282.

Bilan M.I., Vinogradova E.V., Shashkov A.S. y Usov A.I. 2007. "Structure of a highly pyruvylated galactan sulfate from the pacific green alga *Codium yezoense* (Bryopsidales, Chlorophyta)" *Carbohydrate Research* 342:586-596.

Blumenkratz N. y Asboe-Hansen G. 1973. "New method for quantitative determination of uronic acids" *Analytical Biochemistry* 54:484-489.

Bobin-Dubigeon C., Lahaye M., Guillon F., Barry J.L. y Gallant D.J. 1997. "Factors limiting the biodegradation of *Ulva* sp cell-wall polysaccharides" *Journal of the Science of Food and Agriculture* 75:341-351.

Bock K. y Pedersen C. 1983. "Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides" *Advances in Carbohydrate Chemistry Biochemistry* 41:27-66.

Boraso de Zaixso A. 2004. "Chlorophyta marinas de la Argentina" *Historia Natural (Segunda Serie)* 3(11): 95-119.

Bowman K.G. y Bertozzi C. 1999. "Carbohydrate sulfotransferases: mediators of extracellular communication" *Chemistry and Biology* 6:9-22

Burton R.A., Gidley M.J. y Fincher G.B. 2010. "Heterogeneity in the chemistry, structures and function of plant cell walls" *Nature Chemical Biology* 6:724-732.

Cardoso M.A., Nosedá M.D., Fujii M.T., Zibetti R.G.M. y Duarte M.E.R. 2007. "Sulfated xilomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil" *Carbohydrate Research* 342:2766-2775.

Carlberg G.E. y Percival E. 1977. "Carbohydrates of the seaweeds *Urospora wormskioldii* and *Codiuloum pusillum*" *Carbohydrate Research* 57:223-234.

Chanzy H.D., Grosrenaud A., Vuong R. y Mackie W. 1984. "The crystalline polymorphism of mannan in plant cell walls and after recrystallisation" *Planta* 161:320-329.

Chen L., Carpita N.C., Reiter W.D., Wilson R.H., Jeffries C. y McCann M.C. 1998. "A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transform infrared spectra" *Plant Journal* 16:385-392.

Chirapart A. y Ohno M. 1993. "Seasonal variation in the physical properties of agar and biomass of *Gracilaria* sp (chorda type) from Tosa Bay, southern Japan" *Hydrobiologia* 260/261 (1):541-547.

Ciancia M., Quintana I., Vizcargüenaga M.I., Kasulin L., Dios A., Estevez J.M. y Cerezo A.S. 2007. "Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis" *International Journal of Biological Macromolecules* 41:641-649.

Cinelli P., Andrade L., Valente A.P. y Mourão P.A.S. 2010. "Sulfated  $\alpha$ -L-galactans from the sea urchin ovary: selective 6-desulfation as eggs are spawned" *Glycobiology* 20(6):702–709.

Ciucanu I. y Kerek F. 1984. "A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates" *Carbohydrate Research* 134: 209-217.

Colin S., Deniaud E., Jam M., Descamps V., Chevolot Y., Kervarec N., Yvin J-C., Barbeyron T., Michel G. y Kloareg B. 2006 "Cloning and biochemical characterization of the fucanase FcnA: definition of a novel glycoside hydrolase family specific for sulfated fucans" *Glycobiology* 16(11):1021–1032.

Cosgrove D.J. 2005. "Growth of the plant cell wall" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 850-861.

Cosgrove D.J. 2001. "Wall Structure and Wall Loosening. A Look Backwards and Forwards" *Plant Physiology* 125:131–134.

Cosgrove D.J. 1997. "Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants" *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 13:171-201.

Crisci J.V. y López Armengol M.F. 1983. "Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica" Serie de Biología, Monografía N° 26, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.

Davis A.L., Hoffman R.A., Russell A.L. y Debet M. 1995. " $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ -NMR characterization of the digalactosylmannopentose liberated from legume seed galactomannan by  $\beta$ -mannanase action" *Carbohydrate Research* 271:43-54.

Dhugga K.S., Barreiro R., Whitten B., Hazebroek J., Randhawa G., Dolan M., Kinney A., Tomes D., Nichols S. y Anderson P. 2004. "Guar seed mannan synthase is a member of the cellulose synthase super gene family. *Science* 303(5656):363-366.

Doblin M.S., Pettolino F.A., Wilson S.M., Campbell R., Burton R.A., Fincher G.B., Newbigin E. y Bacic A. 2009. "A barley cellulose synthase-like CSLH gene mediates (1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucan synthesis in transgenic *Arabidopsis*" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(14):5996-6001.

Dodgson K.S. y Price R.G. 1962. "A note on the determination of the ester sulfate content of sulphated polysaccharides". *Biochem.J.* 84: 106-110.

Domozych D.S. 2007. "Exopolymer production by the green alga *Penium margaritaceum*: implications for biofilm residency" *International Journal of Plant Science* 168:763-774.

Dubois M., Gilles K.A., Hamilton P., Rebers P.A. y Smith F. 1956. "Colorimetric method of determination of sugars and related substances" *Analytical Chemistry*. 28:350-356,.

Dunn E.K., Shoue D.A., Huang X., Kline R.E., MacKay A.L., Carpita N.C., Taylor I.E.P. y Mandoli D.F. 2007. "Spectroscopic and biochemical analysis of regions of the cell wall of the unicellular 'mannan weed', *Acetabularia acetabulum*" *Plant Cell Physiology* 48(1): 122-133.

Dupree P. y Sherrier D.J. 1998. "The plant Golgi apparatus" *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research* 1404(1-2):259-270.

Eder M., Tenhaken R., Driouich A. y Lutz-Meindl U. 2008. "Occurrence and characterization of arabinogalactan-like proteins and hemicelluloses in *Micrasterias* (Streptophyta)" *Journal of Phycology* 44:1221-1234.

Ender F., Godl K., Wenzl S. y Sumper M. 2002. "Evidence for autocatalytic cross-linking of hydroxiproline-rich glycoproteins during extracellular matrix assembly in *Volvox*" *Plant Cell* 14:1147-1160.

Ellis M., Egelund J., Schultz C.J. y Bacic A. 2010. "Arabinogalactan-proteins: key regulators at the cell surface?" *Plant Physiology* 153:403-419.

Estevez J.M., Kasulin L., Fernández P.V., Dupree P. y Ciancia M. 2009. "Chemical and *in situ* characterization of macromolecular components of the complex cell walls from the coenocytic alga *Codium fragile*" *Glycobiology* 19:212-222.

Estevez J.M., Leonardi P. y Alberghina J. 2008. "Cell wall carbohydrate-epitopes in the green alga *Oedogonium bharuchae* f. *minor* (Oedogoniales, Chlorophyta)" *Journal of Phycology* 44:1257-1268.

Falshaw R., Furneaux R.H. y Slim G.C. 1999. "Carbohydrate sulphates" en *Carbohydrates: structures, syntheses and dynamics*, Ed. P. Finch, Springer.

Farias E.H.C., Pomin V.H., Valente A.P., Nader H.B., Rocha H.A.O. y Mourao P.A.S. 2008. "A preponderantly 4-sulfated, 3-linked galactan from the green alga *Codium isthmocladum*" *Glycobiology* 18:250-259.

Filisetti-Cozzi T.M.C.C. y Carpita N. 1991. "Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars" *Analytical Biochemistry* 197: 157-162.

Gidda S.K., Miersch O., Levitin A., Schmidt J., Wasternak C. Y Varin L. 2003. "Biochemical and molecular characterization of a hydroxy-jasmonate sulphotransferase from *Arabidopsis thaliana*" *Journal of Biological Chemistry* 278:17895-17900.

Givernaud T.E.L., Gourji A., Mouradi-Givernaud, A., Lemoine Y., Chiadmi N. 1999. "Seasonal variation of growth and agar composition of *Gracilaria multipartite* harvested along the Atlantic coast of Morocco" *Hydrobiologia* 398/399:167-172.

Hallman A. 2006. "The pterophorins: common, versatile building blocks in the evolution of extracellular matrix architecture in Volvocales" *Plant Journal* 45:292-307.

Handford M.G., Baldwin T.C., Goubet F., Prime T.A., Miles J., Yu X. y Dupree P. 2003. "Localization and characterization of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*" *Planta* 218:27-36.



Harholt J., Suttangkakul A. y Scheller H.V. 2010. "Biosynthesis of pectins" *Plant Physiology* 153:184-395.

Hayakawa Y., Hayashi T., Lee J., Srisomporn P., Maeda M., Ozawa T. y Sakuragawa N. 2000. "Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides from green algae" *Biochimica et Biophysica Acta* 1543:86-94.

Hellio C., Marechal J.P., Veron B., Bremer G., Clare A.S. y Le Gal Y. 2004. "Seasonal variation of antifouling activities of marine algae from the Brittany Coast (France)" *Marine Biotechnology* 6:76-82.

Hemmingson J.A., Furneaux R.H. y Murray-Brown V.H. 1996. "Biosynthesis of agar polysaccharides in *Gracilaria chilensis* Bird, McLachlan et Oliveira" *Carbohydrate Research* 287:101-115.

Hicks G.R., Hironaka C.M., Dauvillee D., Funke R.P., D'Hulst C., Waffenschmidt S. y Ball S.G. 2001. "When simple is better. Unicellular green algae for discovering new genes and functions in carbohydrate metabolism" *Plant Physiology* 127:1334-1338.

Hornsey I.S. y Hide D. 1976. "The production of antimicrobial compounds by British marine algae II. Seasonal variation in production of antibiotics" *British Phycological Journal* 11:63-67.

Hubbard C.B. y Garbary D.J. 2002. "Morphological variation of *Codium fragile* (Chlorophyta) in Eastern Canada" *Botanica Marina* 45:476-485.

Huizing H.J. y Rietema H. 1975. "Xylan and mannan as cell wall constituents of different stages in the life-histories of some siphonous green algae" *British Phycological Journal* 10:13-16.

Hunt H.W., Stewart J.W.B. y Cole C.V. 1986. "Concepts of sulfur, carbon and nitrogen transformations in soil: evaluation by simulation modelling" *Biogeochemistry* 2:163-177.

Il'in S.G., Reshetnyak M.V. y Evtushenko E.V. 1985. "Crystal and molecular structure of methyl  $\beta$ -L-arabinopyranoside" *Chemistry of Natural Compounds* 21(5):566-570.

Ishii T., Konishi T., Ito Y., Ono H., Ohnishi-Kameyama M. y Maeda I. 2005. "A  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3)-arabinopyranosyltransferase that transfers a single arabinopyranose onto arabino-oligosaccharides in mung bean (*Vigna radiate*) hypocotyls" *Phytochemistry* 66: 2418-2425.

Kahiou S., Hayashi K., Otsuru O. y Maeda M. 1993. "Studies on the cell-wall mannan of the siphonous green algae *Codium latum*" *Carbohydrate Research* 240:207-218.

Kataoka Y. y Kondo T. 1998. "FTIR microscopic analysis of changing cellulose crystalline structure during wood cell wall formation" *Macromolecules* 31:760-764.

Keegstra K. 2010. "Plant cell walls" *Plant Physiology* 154:483-486.

Kemsley E.K. 1998. "Discriminant analysis and class modeling of spectroscopic data" John Wiley and Sons, Chichester, UK: Wiley.

Kim S.W., Ban S.H., Chung H., Cho S., Chung H.J., Choi P.S., Yoo O.J. y Liu J. R. 2004. "Taxonomic discrimination of flowering plants by multivariate analysis of Fourier transform infrared spectroscopy data" *Plant Cell Reports* 23:246-250.

Klein M. y Papenbrock J. 2004. "The multi-protein family of *Arabidopsis* sulphotransferases and their relatives in other plant species" *Journal of Experimental Botany* 55(404) Sulphur Metabolism in Plants Special Issue:1809–1820.

Kloareg B. y Quatrano R.S. 1988. "Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides" *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 26:259-315.

Knox J.P., Linstead P.J., Peart J., Copper C. y Roberts K. 1991. "Developmentally-regulated epitopes of cell surface arabinogalactan-proteins and their relation to root tissue pattern formation" *Plant Journal* 1:317-326.

Koepsell H.J. y Sharpe E.S. 1952. "Microdetermination of pyruvic and  $\alpha$ -ketoglutaric acids" Archives of Biochemistry and Biophysics 38:443-449.

Konishi T., Takeda T., Miyazaki Y., Ohnishi-Kameyama M., Hayashi T, O'Neill M.A. y Ishii T. 2007. "A plant mutase that interconverts UDP-arabinofuranose and UDP-arabinopyranose" Glycobiology 17(3):345-354.

Krishnamurthy K.V.1999. "Methods in cell wall cytochemistry" CRC Press, Tiruchirappalli, India.

Kubo S. y Kadla J.F. 2005. "Hydrogen bonding in lignin: a Fourier Transform Infrared model compound study" Biomacromolecules 6:2815-2821.

Kusche-Gullberg M. y Kjellén L. 2003. "Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis" Current Opinion in Structural Biology 13:605-611.

Lahaye M., Ray B., Baumberger S. Quemener B. y Axelos M.A. 1996. "Chemical characterization and gelling properties of cell wall polysaccharides from species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta)" Hydrobiologia 326/327:473-480.

Lahaye M., Jergou D. y Buleon A. 1994. "Chemical characteristics of insoluble glucans from the cell wall of the marine green algae *Ulva lactuca* (L.) Thuret" Carbohydrate Research 262:115-125.

Lahaye M. y Yaphe W. 1988. "Effects of seasons on the chemical structure and gel strength of *Gracilaria pseudoverrucosa* agar (Gracilariaceae, Rhodophyta)" Carbohydrate Polymers 8(4): 285-301.

Lawson C.J. y Rees, D.A. 1970. "An enzyme for the metabolic control of polysaccharide conformation and function" Nature 227:392-393.

Lechat H., Amat M., Mazoyer J., Buleón A. y Lahay M. 2000. "Structure and distribution of glucomannan and sulfated glucan in the cell walls of the red alga *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta)" Journal of Phycology 36:891-902.

Lee K.J.D., Sakata Y., Mau S.L., Pettolino F., Bacic A., Quatrano R.S., Knight C.D. y Knox P. 2005. "Arabinogalactan proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomistrella patens*" *Plant Cell* 17:3501-3565.

Lerouxel O., Cavalier D.M., Liepman A.H. y Keegstra K. 2006. "Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process" *Current Opinion in Plant Biology* 9:621-630

Lewis L.A. y Mc Court R.M. 2004. "Green algae and the origin of land plants" *American Journal of Botany* 91(10):1535-1556.

Love J. y Percival E. 1964. "The polysaccharides of the green seaweed *Codium fragile*: Part III. A  $\beta$ -1,4-linked mannan" *Journal of the Chemical Society* 3345-3350.

Lowry H.O., Rosenbrought A., Farr L. y Randall R.J. 1951. "Protein measurements with the Folin phenol reagent" *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.

Lu H. F., Jiang B., Shen Z.G., Shen J.B., Peng Q.F. y Cheng C.G. 2008. "Comparative leaf anatomy, FTIR discrimination and biogeographical analysis of *Camellia* section *Tuberculata* (Theaceae) with a discussion of its taxonomic treatments" *Plant Systematic and Evolution* 274(3-4):223-235.

Lutz-Meindl U. y Brosch -Salomon S. 2000. "Cell wall secretion in the green alga *Micrasterias*" *Journal of Microscopy* 198:208-217.

Mackie W. y Preston R.D. 1968. "The occurrence of mannan microfibrils in the green algae *Codium fragile* and *Acetabularia crenulata*" *Planta* 79:249-253.

Mariani P., Tolomio C. y Braghetta P. 1985. "An ultrastructural approach to the adaptative role of the cell wall in the intertidal alga *Fucus virsoides*" *Protoplasma* 128:208-217.

Matsuhira, B. 1995. "Aislamiento y caracterización de ficocoloides" en *Manual de métodos ficológicos*, Alveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C. y Sar E. (eds). Concepción, Chile. 658-675.

Matulewicz, M.C. 1995. "Determinación estructural de polisacáridos de algas: métodos químicos" en Manual de métodos ficológicos, Alveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C. y Sar E. (eds). Concepción, Chile. 692-726.

McCourt R.M. 1995. "Green algal phylogeny" Trends in Ecology and Evolution 10:159-163.

Miravalles A.B. 2008. "Biología y estructura de *Codium* spp. (Bryopsidophyceae, Chlorophyta): morfologías vegetativa y reproductiva, ciclos de vida y epifitismo" Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Mitchell R.A.C., Dupree P y Shewry P.R. 2007. "A novel bioinformatic approach identifies candidate genes for the synthesis and feruloylation of arabinoxylan" Plant Physiology 144:43-53.

Moraudi-Givernaud A., Givernaud T., Morvan H., Cosson J. 1993. "Annual variations of the biochemical composition of *Gelidium latifolium* (Greville) Thuret et Bornet" Hydrobiologia 260/261:607-612.

Morrison I.M.. 1988. "Hydrolysis of plant cell walls with trifluoroacetic acid" Phytochemistry 27:1097-1100.

Mourão P.A.S. 2007. "A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization" Brazilian Journal of Medical and Biological Research 40(1): 5-17.

Mourão P.A.S., Pereira M.S., Pavão M.S.G., Mulloy B., Tollefsen D.M., Mowinckel M.C., and Abildgaard M. 1996. "Structure and Sulfated galactans in seagrass anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm: sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action" Journal of Biological Chemistry 271:23973-23984.

Navarro D.A. y Stortz C.A. 2007. "Microwave-assisted alkaline modification of red seaweed galactans" Carbohydrate Polymers 62(2):187-191

Negishi M., Pedersen L.G., Petrotchenko E., Shevtsov S., Gorokhov A., Kakuta Y. y Pedersen L.C. 2001. "Structure and function of sulfotransferases" *Archives of Biochemistry and Biophysics* 390(2): 149–157.

Nika K., Mulloy B., Carpenter B. y Gibbs R. 2003. "Specific recognition of immunocytokines by sulphated polysaccharides from marine algae" *European Journal of Phycology* 38:257-264.

Niklas K.J. 2004. "The cell walls that bind the tree of life" *Bioscience* 54(9):831-841.

Nobles D.R. y Brown R.M. 2004. "The pivotal role of cyanobacteria in the evolution of cellulose synthases and cellulose synthase-like proteins" *Cellulose* 11:437-448.

Nobles D.R., Romanoviczy D.K. y Brown R.M. 2001. "Cellulose in Cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase?" *Plant Physiology* 127:529–542.

Nosedá M.D. y Cerezo A.S. 1993. "Room temperature, low-field <sup>13</sup>C-n.m.r. spectra of degraded carrageenans: Part III. Autohydrolysis of a lambda carrageenan and of its alkali-treated derivative" *International Journal of Biological Macromolecules* 15:177-181.

Nothnagel A.L. y Nothnagel E.A. 2007. "Primary cell wall structure in the evolution of land plants" *Journal of Integrative Plant Biology* 49(8):1271–1278.

Odonmažig P., Ebringerová A., Machová E. y Alföldi J. 1994. "Structural and molecular properties of the arabinogalactan isolated from Mongolian larchwood (*Larix dahurica* L.)" *Carbohydrate Research* 252:17-324.

Ohta Y., Lee J-B., Hayashi K. y Hayashi T. 2009. "Isolation of Sulfated Galactan from *Codium fragile* and its antiviral effect" *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 32:892-898.

- Oliveira E.C., Saito R.M, Santos Neto J.F. y Garofalo G.M.C. 1996. "Temporal and spatial variation in agar from a population of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) from Brazil" *Hydrobiologia* 326/327:501-504.
- Orduña-Rojas J., García-Camacho K.Y., Orozco-Meyer P., Ríosmena-Rodríguez R., Pacheco-Ruiz I., Zertuche-González J.A. y Meling-López A.E. 2008. "Agar properties of two species of Gracilariaceae from the Gulf of California, Mexico" *Journal of Applied Phycology* 20(2):169-175.
- Padmakumar K. y Ayyakkannu K. 1997. "Seasonal variation of antibacterial and antifungal activities of the extracts of marine algae from Southern Coasts of India" *Botanica Marina* 40(1-6):507-516.
- Paradowska K., Gubica T., Temeriusz A., Cyrński M.K. y Wawer I. 2008. "<sup>13</sup>C CP MAS NMR and crystal structure of methyl glycopiranosides" *Carbohydrate Research* 343(13):2299-2307.
- Park J.T. y Johnson M.J. 1949. "A submicrodetermination of glucose" *Journal of Biological Chemistry* 181:149-151.
- Paul V.J. y Alstyne K.L. 1982. "Chemical defense and chemical variation in some tropical Pacific species of *Halimeda* (Halimedaceae; Chlorophyta)" *Coral Reefs* 6(3-4): 263-269.
- Percival E. 1979. "The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function" *British Phycology Journal* 14:103-117.
- Percival E. y McDowell R.H. 1981. "Algal wall. Composition and biosynthesis" En Tanner W. y Loewus F.A. eds. *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 13B, Springer Verlag, Berlin, 277-316.
- Pereira M.S., Vilela-Silva E.S.A.C., Valente A.P. y Mourão P.A.S. 2002. "A 2-sulfated, 3-linked  $\alpha$ -L-galactan is an anticoagulant polysaccharide" *Carbohydrate Research* 337:2231-2238.

Pilling E. y Höfte H. 2003. "Feedback from the wall" *Current Opinion in Plant Biology* 6:611-616.

Pomin V.H. y Mourão P.A.S. 2008. "Structure, biology, evolution, and medical importance of sulfated fucans and galactans" *Glycobiology* 18(12):1016-1027.

Popper Z.A. y Tuohy M.G. 2010. "Beyond the green: understanding the evolutionary puzzle of plant and algal cell wall" *Plant Physiology* 153:373-383.

Popper Z.A. y Fry S.C. 2003. "Primary cell wall composition of Bryophytes and Charophytes" *Annals of Botany* 91:1-12.

Prado Fernández J., Rodríguez Vazquez J.A., Tojo E. y Andrade J.M. 2003. "Quantitation of  $\kappa$ -,  $\iota$ , and  $\lambda$ -carrageenan by mid-infrared spectroscopy and PLS regression" *Analytica Chimica Acta* 480:23-37.

Robic A., Sassi J.F., Dion P., Lerat Y. y Lahaye M. 2009. "Seasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two *Ulva* species (Chlorophyta) from the Brittany coast" *Journal of Phycology* 45 (4):962-973.

Robic A., Bertrand D., Sassi J-F., Lerat Y. y Lahaye M. 2008. "Determination of the chemical composition of ulvan, a cell wall polysaccharide from *Ulva* spp. (Ulvales, Chlorophyta) by FTIR and chemometrics" *Journal of Applied Phycology* 21(4):451-456.

Robin S., Lecomte M., Höfte H. y Mouille G. 2003. "A procedure for the clustering of cell wall mutants in the model plant *Arabidopsis* based on Fourier-transform infrared (FTIR)" *Journal of Applied Statistics* 30(6):669-681.

Sandhu A.P.S., Randhawab G.S. y Dhugga K.S. 2009. "Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis" *Molecular Plant* 2(5):840-850.

Sarkar P., Bosneaga E. y Auer M. 2009. "Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles" *Journal of Experimental Botany* 60(13):3615-3635.



Seifert G.J. y Roberts K. 2007. "The biology of arabinogalactan proteins" Annual Reviews in Plant Biology 58:137-161.

Shashkov A.S., Lipkind G.M., Knirel Y.A. y Kochetkov N.K. 1988. "Stereochemical factors determining the effects of glycosylation on the  $^{13}\text{C}$  chemical shifts in carbohydrates" Magnetic Resonance in Chemistry 26:735-747.

Shea E.M. y Carpita N.C. 1988. "Separation of partially methylated alditol acetals on SP-2330 and HP-1 vitreous silica capillary columns" Journal of Chromatography 445:424-428.

Sheible W. y Pauly M. 2004. "Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights" Current Opinion in Plant Biology 7:285-295.

Siddhanta A.K., Shanmugam M., Mody K.H., Goswami A.M. y Ramabat B.K. 1999. "Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India : Chemical composition and blood anticoagulant activity" International Journal of Biological Macromolecules 26:151-154.

Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N. y Imbs T.I. 2010. "Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta)" Journal of Applied Phycology 22(1):79-86.

Smallwood M., Beven A., Donovan N., Neill S.J., Peart J. Roberts K. y Knox J.P. 1994. "Localization of cell wall proteins in relation to the developmental anatomy of the carrot root apex" Plant J. 5:237-246.

Smith R.L. y Gikelson E. 1979. "Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hidrazone hydrochloride" Analytical Biochemistry 98:478-480.

Somerville C., Bauer S., Brininstool G., Facette M., Hamann T., Milne J., Osborne E., Paredes A., Persson S., Raab T., Vorwerk S. y Youngs H. 2004. "Towards a system approach to understanding plant cell walls" Science 306:2206-2211.

Sorensen I., Domozych D. y Willats W.G.T. 2010. "How have plant cells evolved?" *Plant Physiology* 153:366–372.

Steinberg P.D. 1989. "Biogeographical variation in brown algal polyphenolics and other secondary metabolites: comparison between temperate Australasia and North America" *Oecologia* 78:373-382.

Stevenson T.T. y Furneaux R.H. 1991. "Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae" *Carbohydrate Research* 210:277-298.

Stortz, C.A. 1995. "Estructura de polisacáridos de algas: Métodos espectroscópicos" en *Manual de métodos ficológicos*, Alveal K., Ferrario M.E., Oliveira E.C. y Sar E. (eds). Concepción, Chile. 728-750.

Stortz C.A. y Cerezo A.S. 1992. "The  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of carrageenans: calculation of chemical shifts and computer-aided structural determination" *International Journal of Biological Macromolecules* 14: 237-242.

Stroyan E. y Stevens E. 2000. "An improved model for calculating the optical rotation of simple saccharides" *Carbohydrate Research* 327(4):447-453.

Sweet D.P., Shapiro H. y Albersheim P. 1975. "Quantitative analysis by various g.l.c. response-factor theories for partially methylated and partially ethylated alditol acetates" *Carbohydrate Research* 111:31-39.

Terho T. y Hartiala K. 1971. "Method for determination of the sulfate content of glycosaminoglycans" *Analytical Biochemistry* 41: 471.

Trowbridge C.D. y Farnham W.F. 2004. "Spatial variation in littoral *Codium* assemblages on Jersey, Channel Islands (southern English Channel)" *Botanica Marina* 47: 501–503

Trowbridge C.D. 1998. "Ecology of the green macroalga *Codium fragile* (Suringar) Hariot 1889: Invasive and non-invasive subspecies" *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 36:1-64.

Tveter-Gallagher E., Cogburn J.N., Mathieson A.C. y Schiff J.A. 1984. "Localization of carrageenan and incorporation of  $^{35}\text{SO}_4^{-2}$  into sulphur amino acids in the red alga *Chondrus crispus*" *Hydrobiologia* 116/117:488-492.

Varin L., Marsolais F., Richard M. y Rouleau M. 1997. "Biochemistry and molecular biology of plant sulfotransferases" *FASEB Journal* 11:517-525.

Velasquez S.M., Ricardi M.M., Gloazzo Dorosz J., Fernández P.V., Nadra A.D., Pol-Fachin L., Egelund J., Gille S., Ciancia M., Verli H., Pauly M., Bacic A., Olsen C.E., Ulvskov P., Petersen B.L., Somerville C., Iusem N.D y Estevez J.M.. 2011. "O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth." *Science* 332(6036): 1401-1403.

Verbruggen H., Leliaert F., Maggs S., Shimada S., Schils T., Provan J., Booth D., Murphy S., De Clerck O., Littler D.S. y Copepejans E. 2007. "Species boundaries and phylogenetic relationships within the green algal genus *Codium* (Bryopsidales) based on plastid DNA sequences" *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44:240-254.

Wilson R.H., Smith A.C., Kačuráková M., Saunders P.K., Wellner N. y Waldron K.W. 2000. "The mechanical properties and molecular dynamics of plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-Transform Infrared spectroscopy" *Plant Physiology* 124:397-405.

Wong K.F. y Craigie J.S. 1978. "Sulfohydrolase activity and carrageenan biosynthesis in *Chondrus crispus* (Rhodophyceae)" *Plant Physiology* 6:663-666.

Wu Y. y Gretz M.R. 1990. "Stable isotope labelling method for studies of saccharide metabolism in *Agardiella subulata*" *Hydrobiologia* 260/261:595:600.

Yates E.A., Valdor J.F., Haslam S.M., Morris H.R., Dell A., Mackie W. y Knox J.P. 1996. "Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies" *Glycobiology* 6:131-139.

Yin Y., Chen H., Hahn M.G., Mohnen D. y Xu Y. 2010. "Evolution and Function of the Plant Cell Wall Synthesis-Related Glycosyltransferase Family 8" *Plant Physiology* 153: 1729-1746.

Yin Y., Huang J. y Xu Y. 2009. "The cellulose synthase superfamily in fully sequenced plants and algae" *BMC Plant Biology* 9:99-113.

Yu, P. 2004. "Application of advanced synchrotron radiation-based Fourier transform infrared (SR-FTIR) microspectroscopy to animal nutrition and feed science: a novel approach" *British Journal of Nutrition* 92:869-885.

Zhuo, K., Liu, H., Zhang, X., Liu, Y. y Wang, J. 2008. "<sup>13</sup>C NMR study on the interactions of calcium chloride/potassium chloride with pyranosides in D<sub>2</sub>O" *Carbohydrate Research* 343: 2428-2432.

## 2° PARTE

### **Actividad anticoagulante del arabinano piranósico de *Codium vermilara***

**Abreviaturas, siglas y expresiones utilizadas en la 3° Parte:**

MD: dinámica molecular

CD: dicroísmo circular

TT: tiempo de trombina

TTPA: tiempo de tromboplastina parcial activada

TP: tiempo de protrombina

TR: tiempo de reptilasa

TB: trombina bovina

TH: trombina humana

AT: antitrombina

HCII: cofactor de heparina II

FII-FXIII: factor II a factor XIII

FIIa-FXIIIa: factor II activado a factor XIII activado

TBO: azul de orto-toluidina

CB: azul de Coomasie

PPP: plasma pobre en plaquetas

RMSF: raíz de fluctuación cuadrática media

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

SDS: dodecil sulfato de sodio

PDB: *Protein Data Bank*

SPC: *Simple Point Charge water model*

# INTRODUCCIÓN

## **Capítulo 1 - Compuestos bioactivos de algas marinas**

### **1.1. Introducción**

Los organismos marinos son fuente de una inmensa diversidad de moléculas con potencial aplicación en tanto compuestos bioactivos. Según Laurienzo (2010), el interés científico en el área se ha desarrollado sin pausa desde la década de 1950, cuando se describió el primer compuesto con actividad biológica de origen marino, una toxina con actividad antitumoral sintetizada por una especie de equinodermo.

Las algas marinas, en particular, presentan una importante diversidad química y estructural como resultado de distintas estrategias de adaptación al medio (Cardozo et al., 2007), y a partir de ellas se aislaron gran cantidad de compuestos, tanto metabolitos primarios como secundarios, que se utilizan actualmente en muy diversos campos.

### **1.2. Actividad biológica de polisacáridos sulfatados**

#### **1.2.1. Aspectos generales**

Los polisacáridos sulfatados son sintetizados, entre otros organismos, por las algas marinas. Como componentes de su pared celular, están involucrados en la regulación iónica, hídrica y mecánica (ver 1° Parte de esta tesis donde desarrolla este tema con mayor detalle). Se ha reportado para este tipo de compuestos actividad biológica de distinto tipo: antiviral, antitumoral, anticoagulante, antioxidante, antiinflamatoria, entre otras (Costa et al., 2010; Jiao et al., 2011). Estas propiedades resultan de interés en áreas como la farmacéutica y la cosmética y otras de más reciente desarrollo como la nutracéutica y los alimentos funcionales (Jiao et al., 2011).

La mayoría de los reportes de actividad corresponde a polímeros sintetizados por algas rojas y pardas, y en menor medida por algas verdes (Ciancia et al., 2010). Lo mismo puede decirse acerca del grado de conocimiento sobre las estructuras, ya que algas rojas y pardas han concentrado mayor atención debido al aprovechamiento de compuestos como el agar, carragenanos y alginato, de uso muy difundido en la industria gracias a sus propiedades reológicas.



En este campo, es de gran importancia la relación entre actividad y estructura, aunque en la mayoría de los casos ese vínculo no se ha dilucidado claramente. Por otro lado, la naturaleza misma de las rutas biosintéticas de estos compuestos genera dispersión estructural. Esto significa que no se trata de moléculas con una única estructura y secuencia, sino de mezclas de moléculas similares, que sólo pueden describirse en términos de una estructura “promedio”.

Muchas de las actividades biológicas de polisacáridos sulfatados están mediadas por interacciones con proteínas. Se ha establecido la necesidad de algunos requerimientos estructurales, como ciertos rangos de tamaño molecular y la presencia de *clusters* de grupos sulfato que posibilitan la interacción con proteínas catiónicas (Costa et al., 2010).

Se ha reportado en algunos casos actividad relacionada con los procesos de coagulación y fibrinólisis para otras macromoléculas de algas como lectinas (hemaglutininas) y proteasas (Matsubara, 2004), mientras que para los polisacáridos sulfatados de algas la actividad anticoagulante está entre los efectos más estudiados. Las propiedades anticoagulantes de estos compuestos parecen depender de zonas de unión no específicas, constituidas por secuencias de monosacáridos variables, con diferentes patrones de sulfatación (Ciancia et al, 2010). De este modo, los factores estructurales que determinan la actividad se relacionan tanto con el esqueleto hidrocarbonado como con la distribución de los grupos aniónicos sobre aquél. Si bien se acepta que un alto contenido de sulfato favorece la actividad, no hay una correlación estricta entre ambas variables, sugiriendo una mayor complejidad en la relación actividad/estructura.

Algunas de las drogas antitrombóticas comúnmente usadas, como la heparina sin fraccionar y las heparinas de bajo peso molecular, son polisacáridos sulfatados de origen animal (glicosaminoglicanos– GAGs- sulfatados, en rigor), que presentan una serie de efectos colaterales como sangrado y trombocitopenia (Kelton y Hirsh., 1980; Kelton y Warkentin, 2008), además de no ser efectivas en casos de deficiencia congénita o adquirida de antitrombina y de su incapacidad de inhibir trombina unida a fibrina (Wijesekara et al., 2011). Además, el origen animal de estos compuestos implica un riesgo respecto de enfermedades priónicas. En este contexto, y dada la alta incidencia de la trombosis en la salud humana a nivel mundial, se inscribe la búsqueda

de agentes antitrombóticos alternativos y/o complementarios. Los polisacáridos sulfatados de algas marinas podrían tener un rol importante tanto como compuestos anticoagulantes como modelos de investigación para el desarrollo de otras drogas (Shanmugam y Mody, 2000).

### **1.2.2. Polisacáridos sulfatados de algas verdes**

Si se compara con el caso de las algas rojas y sobre todo pardas, es escasa la información disponible acerca de polisacáridos sintetizados por algas verdes, tanto desde el punto de vista estructural como respecto de su actividad biológica en general y anticoagulante en particular (Ciancia et al., 2010; Wijesekara et al., 2011). No obstante, hacia el año 2000, Shanmugam y Mody remarcaban que de 150 reportes de actividad anticoagulante en polisacáridos sulfatados de algas marinas (Rhodophyta, Phaeophyta y Chlorophyta) alrededor de un tercio (45) correspondían a algas verdes. Los reportes en este último grupo son más recientes, correspondiendo el primero de ellos a extractos de especies del género *Codium* de costas británicas (Deacon-Smith et al., 1985; Rogers et al., 1990) donde se encontró actividad antitrombótica asociada a un factor del plasma no identificado.

Se han caracterizado en detalle ulvanos extraídos de especies de *Ulva* y *Enteromorpha*, aunque no se ha profundizado en su comportamiento biológico (Lahaye y Robic, 2007), excepto en el caso de *Ulva conglobulata*, donde se encontró inhibición directa de trombina y potenciación de HCII (Mao et al., 2006). Por otro lado, ramnanos sulfatados de dos especies de *Monostroma* mostraron inhibición de trombina por una fuerte potenciación de cofactor de la heparina II (HCII) y en menor medida inhibición de Factor Xa mediada por AT (Mao et al., 2008, 2009). Galactanos aislados de algas del género *Caulerpa* también provocaron inhibición de trombina en forma dependiente de HCII (Hayakawa et al., 2000).

### **1.2.3. Polisacáridos sulfatados del género *Codium***

En numerosas ocasiones se reportó actividad anticoagulante de extractos y fracciones purificadas provenientes de especies del género *Codium*. Ciancia et al. (2010) recopilan tanto aquellos casos en que los productos responsables del efecto no fueron

identificados como aquellos donde se realizó una caracterización detallada de su estructura. Las especies mencionadas son: *Codium fragile*, *C. fragile* ssp. *tomentosoides*, *C. fragile* ssp. *atlanticum*, *C. istmocladum*, *C. divaricatum*, *C. latum*, *C. dwarkense*, *C. pugniformis*, *C. adhaerence* y *C. cylindricum*. En los casos en que se identificaron los polisacáridos sulfatados con actividad, se encontró que estos contenían L-arabinosa y/o D-galactosa como componentes principales, acompañados por D-glucosa, L-ramnosa y/o D-xilosa (Matsubara et al., 2000). En todos los casos el rendimiento de estos compuestos fue relativamente bajo, el contenido de sulfato entre medio y alto, y también se encontraron cantidades pequeñas de proteínas en su composición.

Las características de la actividad reportada son variadas: en algunos casos sólo se observó un alargamiento en los tiempos de coagulación en ensayos globales de coagulación (Tiempo de Trombina – TT- y/o Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada – TTPA), mientras que en otros se identificó el mecanismo de acción. En la mayoría de estos casos se reportó la inhibición de trombina a través de la activación del inhibidor fisiológico HCII. En un solo caso (*Codium pugniformis*, Matsubara et al., 2000) la actividad anticoagulante se atribuyó a un mecanismo de inhibición directa de la trombina, tratándose de un polisacárido compuesto por 73 % de glucosa, 17 % de arabinosa y 10 % de galactosa, aislado por intercambio iónico y cromatografía de permeación de geles. Este polisacárido, con un nivel de sulfato de 32 %, fue caracterizado como “menor” por su importancia relativa en la pared del alga. En el caso de un galactano sulfatado de *Codium cylindricum* (89 % Gal y 11 % Glc, con ~8 % de proteínas), no se encontró potenciación de AT ni HCII ni inhibición de ninguna de las enzimas que participan del proceso de coagulación, aunque se reportó inhibición de la polimerización de la fibrina (Matsubara et al., 2001).

### 1.2.3.1. Galactanos del género *Codium*

A partir de la información disponible, puede generalizarse que el género *Codium* sintetiza una familia de  $\beta$ -(1→3)-D-galactanos sulfatados con cadenas laterales de  $\beta$ -D-galactosa, grupos sulfato en C-4 y/o C-6 y algunas variaciones estructurales como enlaces  $\beta$ -(1→6) y cetales de ácido pirúvico unidos a C-3 y C-4 en el extremo no reductor de la cadena (Ciancia et al., 2010). No se determinó la actividad anticoagulante

de ningún galactano puro sintetizado por algas del género *Codium*. Por otro lado, sus características estructurales, fundamentalmente el efecto estérico de las cadenas laterales, dificultarían la interacción del galactano con otras moléculas. Esto permite prever niveles de actividad anticoagulante relativamente bajos para este tipo de compuestos, lo cual ha sido verificado experimentalmente.

### 1.2.3.2. Arabinanos del género *Codium*

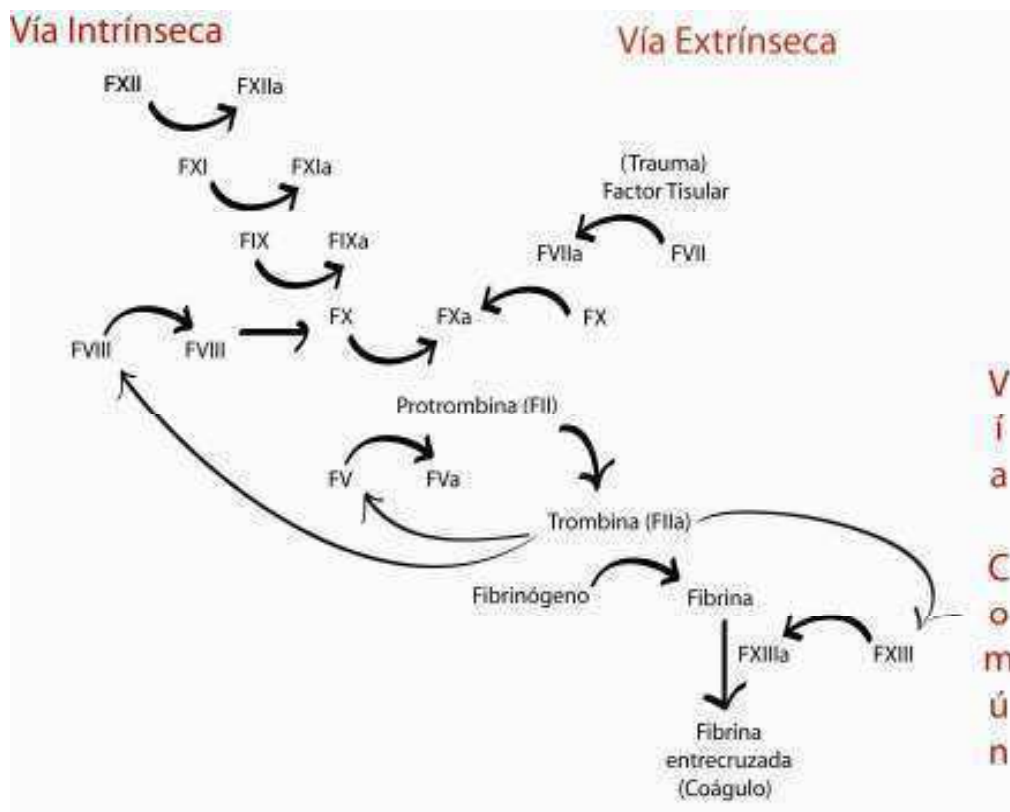
Dos arabinanos sulfatados similares, aislados de *C. dwarkense* (Siddhanta et al., 1999) y *C. latum* (Uehara et al., 1992), se obtuvieron por precipitación con cloruro de potasio (0,12 y 0,2 M, respectivamente). Estos polímeros fueron caracterizados como  $\alpha$ -L-arabinanos furanósicos sulfatados, aunque en ninguno de los dos casos se informa acerca de la posición de los grupos sulfato. En el segundo de ellos las unidades se unirían por enlaces (1→5). En ambos casos se reportó alargamiento del tiempo de coagulación en ensayos globales (TT en *C. latum* y TTPA y TT en *C. dwarkense*).

Por otro lado, tras evaluar la actividad anticoagulante de ocho polisacáridos sulfatados aislados de algas verdes, incluyendo cuatro especies del género *Codium*, Hayakawa y colaboradores (2000) concluyen que aquellos ricos en arabinosa (arabinanos, xiloarabinanos y glucoxiloarabinanos) son inhibidores de trombina (vía HCII) más potentes que otros donde predomina la galactosa. Se trata de polisacáridos obtenidos a partir de *C. divaricatum*, *C. adhaerence*, *C. latum* y *C. fragile* y sus contenidos de sulfato varían entre 0,5 y 0,8 moles por cada mol de arabinosa. Las diferencias observadas en la actividad respecto de la de otros polímeros se atribuye a características estructurales, fundamentalmente la ausencia de -OH en C-5 en la arabinosa. Sin embargo, la estructura de estos polisacáridos ricos en arabinosa, cuya actividad anticoagulante se estudió, no fue analizada en profundidad.

### 1.3. Generalidades sobre coagulación

El modelo de cascada de la coagulación prevalece desde que fuera planteado hace más de cincuenta años, tiempo durante el cual fue enriqueciéndose teniendo siempre como objetivo la identificación y caracterización de las proteínas que intervienen, así como las interacciones entre ellas. El modelo de cascada representa el proceso de coagulación

como una serie de reacciones proteolíticas donde cada proteasa cliva y activa a la proteasa siguiente, mientras se produce la amplificación del proceso. En esta serie, los fosfolípidos aniónicos y los cationes de calcio juegan un rol esencial en el ensamblaje y estabilización de los complejos formados por las distintas proteasas. Esta propuesta evolucionó hacia un esquema donde dos vías (extrínseca e intrínseca, iniciadas por el factor XII y el complejo factor VII activado/factor tisular, respectivamente) convergen en una vía común cuyo punto de inicio es el complejo protrombinasa formado por los factores Xa y Va junto con un ion calcio y un fosfolípido de membrana que los fija (**Figura 1**).

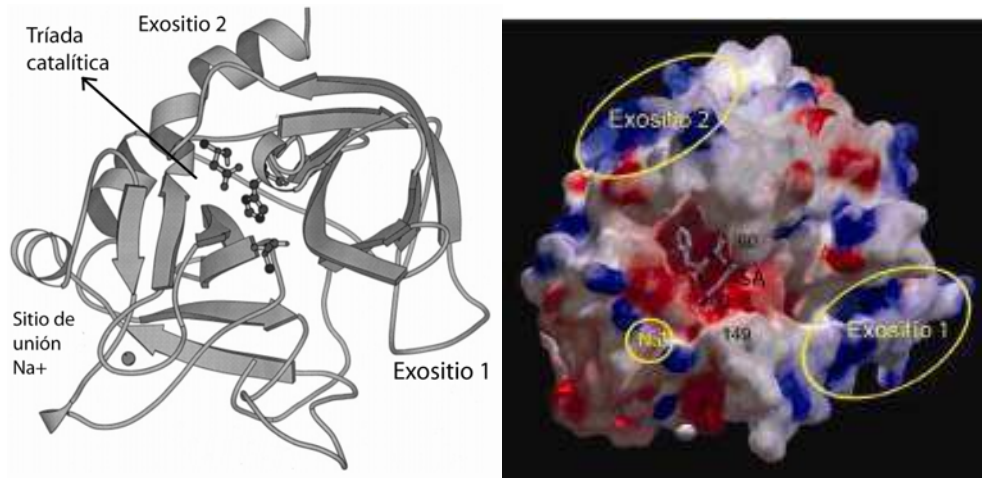


**Figura 1** – Representación del proceso de coagulación según el modelo de cascada. FII-FXIII: factor II a XIII; FIIa-FXIIIa: factor activado II a XIII.

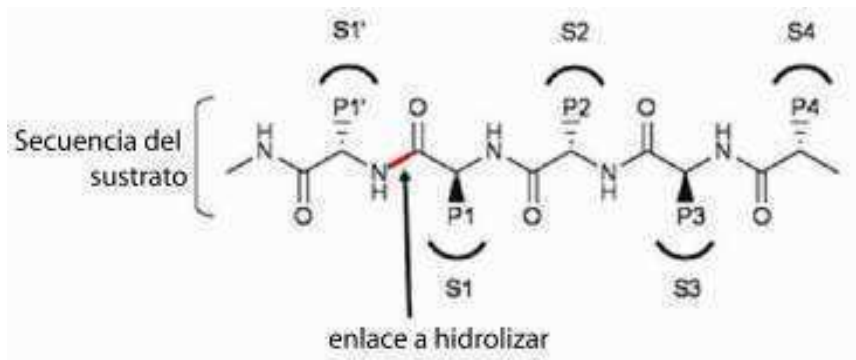
Si bien más recientemente se propuso un modelo celular (Hoffman y Monroe, 2001), que pretende superar algunas limitaciones del modelo clásico de cascada, éste último sigue vigente. Esto es así, en alguna medida, porque se corresponde apropiadamente con los ensayos habituales de coagulación: TP (Tiempo de Protrombina) y TTPA (Tiempo

de Tromboplastina Parcial Activada), que evalúan las vías extrínseca e intrínseca, respectivamente.

La trombina (**Figura 2**) es una proteína clave con numerosos roles tanto en la coagulación como en otros procesos (proliferación celular e inflamación), donde ejerce importantes efectos sobre varios tipos celulares al unirse a sus receptores (Di Cera et al., 1997). Pertenece al grupo de las serín proteasas, cuyo mecanismo de acción se basa en un ataque nucleofílico mediado por un residuo serina sobre un enlace peptídico. La trombina está formada por dos cadenas unidas por un puente disulfuro. La cadena liviana (A) está formada por 36 residuos y la pesada (B) 259. Esta última es similar a la tripsina y sus dominios catalíticos, como los de otras serín proteasas relacionadas, se organizan en dos barriles  $\beta$  adyacentes, en cuya interfase se forma el sitio activo. El surco del sitio activo es profundo y estrecho y en él se ubican los residuos que componen la tríada catalítica: Ser195, His57 y Asp102. La profundidad y estrechez del surco que contiene la tríada se debe a la disposición de los bucles llamados 60 y 149 que bloquean el acceso a muchos sustratos o inhibidores, regulando la especificidad de la enzima (Bode, 2006). Sobre la superficie de la trombina se encuentran dos zonas con alta densidad de cargas positivas que corresponden a los sitios de unión del fibrinógeno (exosito 1, al que además se unen la fibrina, los receptores Par-1 y PAR-4 y la hirudina) y de la heparina (exosito 2). Un exosito es, sobre la superficie de una proteasa, una región físicamente separada del sitio activo, que define las reacciones de reconocimiento y la especificidad de la enzima (Bock et al., 2007). Las interacciones que estabilizan al exosito 1 de la trombina son principalmente hidrofóbicas, mientras que en el caso del exosito 2 predominan las interacciones electrostáticas (Bock et al., 2007). Por otro lado, de acuerdo a la nomenclatura de Schechter y Berger (1967) se denomina  $P_i \dots P_2, P_1, P_1', P_2', P_j$  a los residuos del péptido sustrato (en sentido N a C terminal) y  $S_i \dots S_2, S_1, S_1', S_2' \dots S_j$  a los respectivos subsitios de unión sobre la proteasa, siendo  $P_1$  y  $P_1'$  el enlace cuyo clivaje se cataliza (**Figura 3**). Los residuos P son necesariamente contiguos en la secuencia del sustrato, mientras que esto no es así en el caso de los subsitios de especificidad S (Di Cera et al., 1997). En el caso de la trombina, son de especial importancia el subsitio  $S_1$ , que se ubica al fondo del surco del sitio activo y permite el acomodo de grupos  $P_1$  hidrofóbicos o no cargados, y los subsitios  $S_2$  y  $S_4$  (este último, sitio de unión para grupos arilo) que forman la hendidura de unión para grupos apolares, determinada por el bucle 60 y ubicada sobre  $S_1$ .



**Figura 2-** Dos representaciones de la estructura de la trombina. Izquierda: estructura secundaria de la cadena B de la trombina humana; se indican los exositos 1 y 2, el sitio de unión de sodio y los residuos de la tríada catalítica en la interfase entre los dos dominios  $\beta$ -barril. Tomado de Di Cera et al., 1997. Derecha: representación de la superficie de la trombina humana formando un complejo con el inhibidor PPACK (un pequeño inhibidor que consiste en un tripéptido y un grupo metilcetona); se indican los exositos 1 y 2, el sitio activo (SA), el sitio de unión de sodio, los bucles 60 y 149 y los subsitios S1 y S4. Zonas positivas en azul y negativas en rojo. Tomado de Bode, 2006.



**Figura 3-** Esquema de la nomenclatura utilizada para describir los sitios de unión en el sustrato y una proteasa, según la convención de Schechter y Berger. P1, P2, P3, etc. corresponden a los residuos de la proteína sustrato, y S1, S2, S3, etc., a los sitios de unión en la proteasa. El enlace peptídico entre P1 y P1' es hidrolizado por la enzima. Tomado de Pinto et al., 2010.

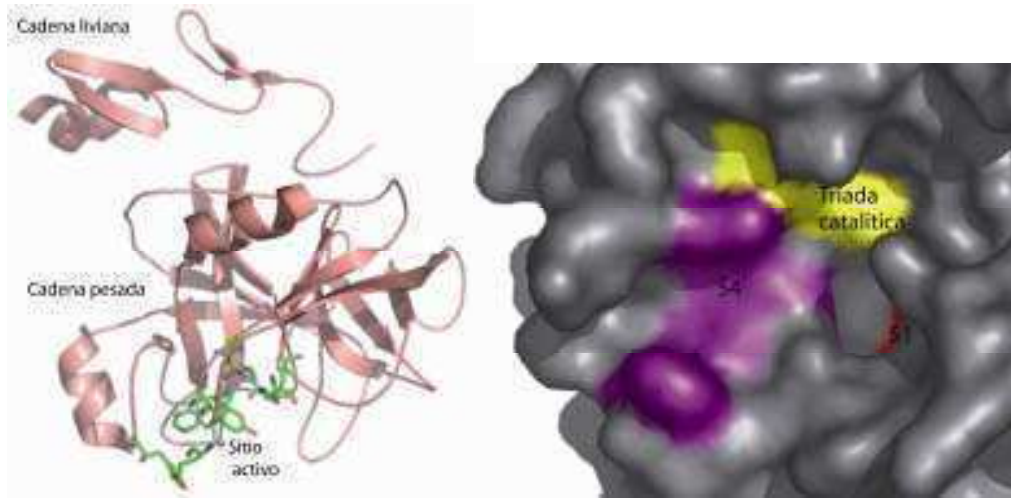
Para sumar complejidad, las funciones de la trombina en el proceso de coagulación son opuestas, ya que puede actuar alternativamente como procoagulante y como anticoagulante. En el primer caso, promoviendo la conversión del fibrinógeno en fibrina

insoluble, la agregación plaquetaria y la estabilización del coágulo mediante activación del Factor XIII, además de favorecer su propia generación a partir de protrombina por un mecanismo de retroalimentación que involucra a los factores V, VIII y XI. El efecto anticoagulante involucra a las proteínas C y S y se ejerce a través de la inactivación del Factor V, lo que restringe la conversión de protrombina en trombina. Por último, el sodio actúa como un importante modulador alostérico de la trombina, uniéndose a un sitio específico sobre la superficie de la enzima en el centro del bucle 222. De este modo, la trombina presenta dos estados alostéricos, una forma “lenta” y una “rápida”, caracterizadas por la ausencia o presencia de sodio, respectivamente. La forma “rápida” presenta mayor afinidad por el fibrinógeno, los receptores de trombina, la trombomodulina y la antitrombina, mientras que la “lenta” tiende a clivar la proteína C y se comporta entonces como anticoagulante.

Las trombinas bovina y humana actúan de modo similar respecto del reconocimiento y clivaje del fibrinógeno y la unión a plaquetas, aunque sus secuencias primarias presentan algunas diferencias, fundamentalmente la presencia en la enzima bovina de un fragmento de 13 residuos en el extremo amino de la cadena liviana, que no se encuentra en la trombina humana (Shuman et al., 1976).

El Factor Xa (**Figura 4**) también ocupa una posición clave en el proceso de coagulación, siendo el punto donde convergen las vías extrínseca e intrínseca de acuerdo al modelo tradicional de cascada (**Figura 1**). Sus funciones son más limitadas que las de la trombina, ya que su rol principal es como regulador de la generación de trombina a partir de protrombina, aunque también actúa como proinflamatorio y proliferativo (Ansell, 2007). El FXa está formado por dos cadenas, y en su sitio activo se diferencian cuatro subsitios (S1, S2, S3 y S4), siendo S1 y S4, fuertemente hidrofóbicos, los responsables de la formación del sitio activo. En esta proteasa, a diferencia de la trombina, el exosito 1 es el sitio de unión para el calcio, en tanto el exosito 2 se relaciona con el reconocimiento de la protrombina y la interacción con el FVa. El exosito 2 se superpone además con el sitio de unión de la heparina sobre el FXa. Adicionalmente, la cadena liviana contiene el dominio Gla, una región que contiene 11 residuos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico que posibilita, en presencia de calcio, la unión a un fosfolípido de membrana necesario para la formación del complejo protrombinasa (Kamata et al., 1998; Bock et al., 2007).



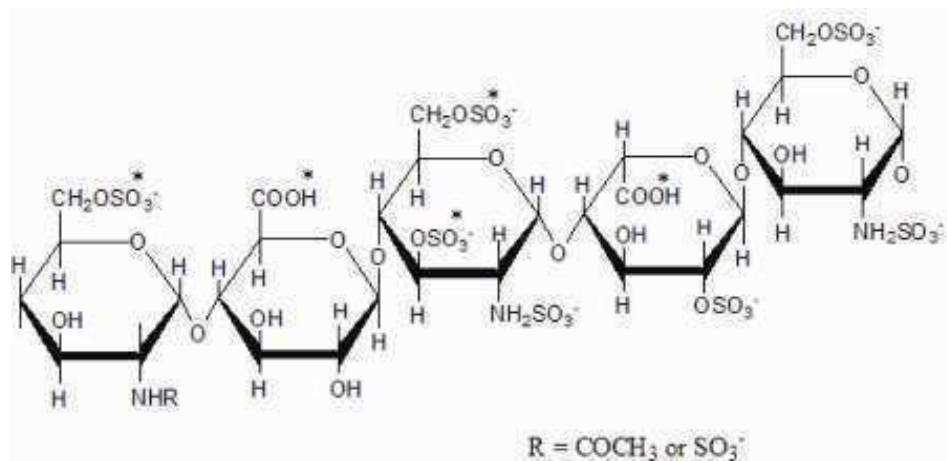


**Figura 4-** Estructura del Factor Xa. Izquierda: representación de la estructura secundaria de ambas cadenas, los residuos del sitio activo se muestran en verde. Derecha: detalle de la superficie de la enzima; se indican los subsitios S1 (rojo) y S4 (violeta) y la triada catalítica (amarillo). Tomado de la página web del Laboratorio de William Jorgensen, Departamento de Química, Universidad de Yale, Estados Unidos (<http://traken.chem.yale.edu/>).

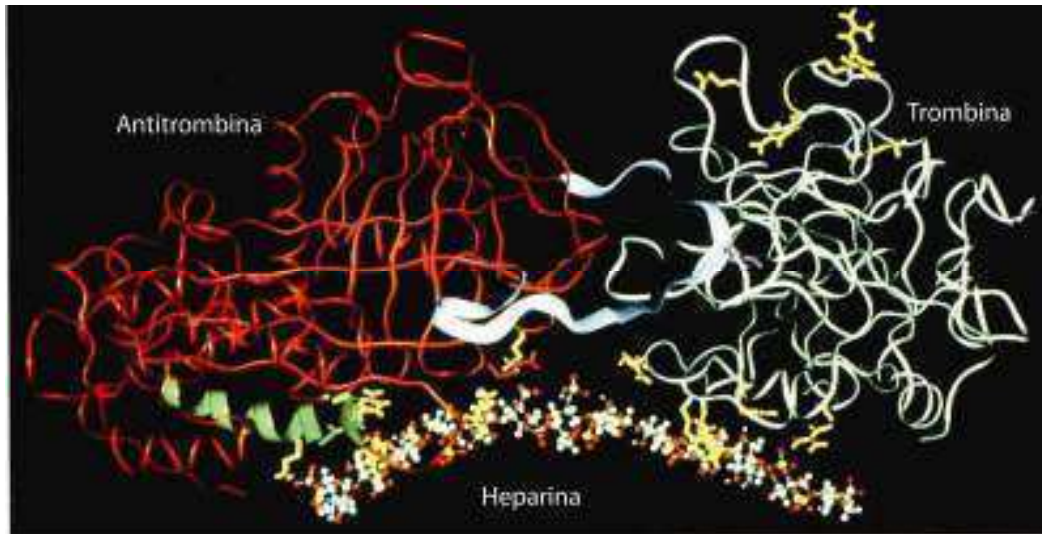
Los inhibidores de serín proteasas (conocidos como “serpinas”) son un conjunto de proteínas con similitudes estructurales y capaces de inhibir serín proteasas. A esta superfamilia pertenecen dos serpinas de gran importancia para el proceso de coagulación y las terapias antitrombóticas: antitrombina y cofactor II de heparina. Estos inhibidores actúan ofreciendo su centro activo en un fragmento expuesto de su estructura que actúa como pseudo-sustrato para la proteasa. En lugar de producirse el clivaje, como sucedería en el caso del sustrato real de la proteasa, el bucle sobre el cual se encuentra el centro activo de la serpina puede adoptar una conformación que estabiliza el complejo formado con la enzima.

La antitrombina, formada por una cadena única con un peso molecular de 58-62 kDa, ejerce su efecto inhibitorio sobre varios componentes clave del proceso de coagulación: trombina, FXa, FIXa y el complejo Factor Tisular-FVIIa. La AT inhibe con mayor afinidad a la trombina y el FXa en forma libre que cuando se encuentran formando complejos; de este modo actúa removiendo estos factores de la circulación general para

confinar su actividad a los sitios donde debe producirse la coagulación. El complejo que la AT forma con la trombina es rápidamente eliminado de la circulación. Dada la importancia de esta serpina en la regulación del proceso de coagulación, aun deficiencias moderadas en su producción o actividad pueden tener consecuencias clínicas, encontrándose casos de deficiencia innata tanto como adquirida (Norris, 2003). La heparina, un GAG de origen animal en cuya estructura se alternan residuos sulfatados de ácidos urónicos y D-glicosamina unidos por enlaces (1→4), potencia a la AT aumentando notoriamente la afinidad por los factores sobre los cuales actúa. La unión de la heparina induce un cambio conformacional en la AT que facilita su interacción con las proteasas (Gray et al., 2008). El requerimiento estructural de esta unión es la presencia de una secuencia de cinco monosacáridos con determinado patrón de sulfatación (**Figura 5**). En el caso de la inhibición de la trombina mediada por AT, la heparina actúa como puente, formándose un complejo ternario (**Figura 6**) del cual luego se disocia la heparina.



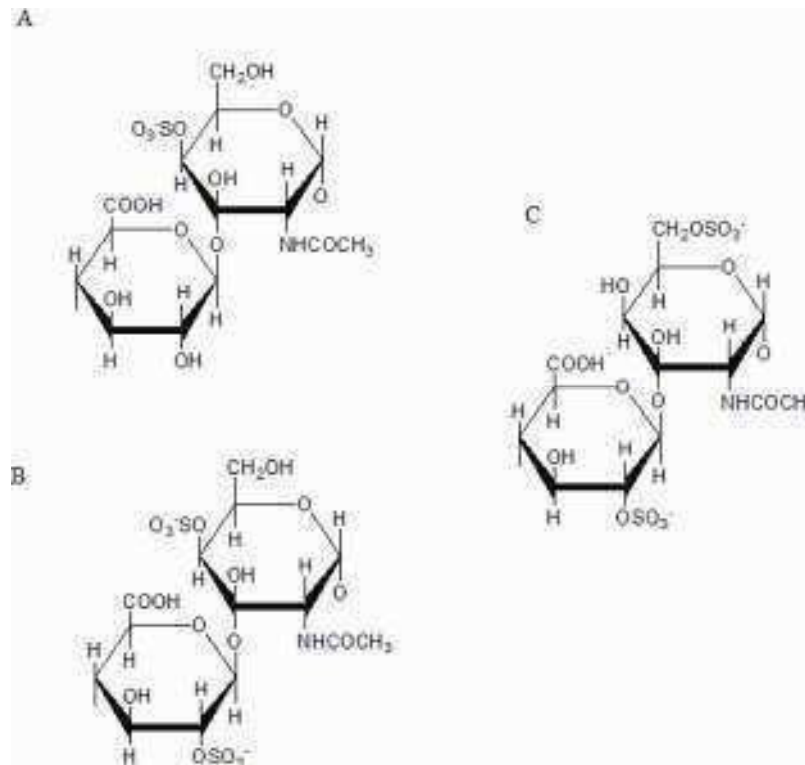
**Figura 5-** Estructura del glicosaminoglicano sulfatado heparina. El pentasacárido representa la estructura mínima que determina la afinidad por el inhibidor fisiológico AT. Los asteriscos indican los sustituyentes esenciales para dicha afinidad. Tomado de Mulloy, 2005.



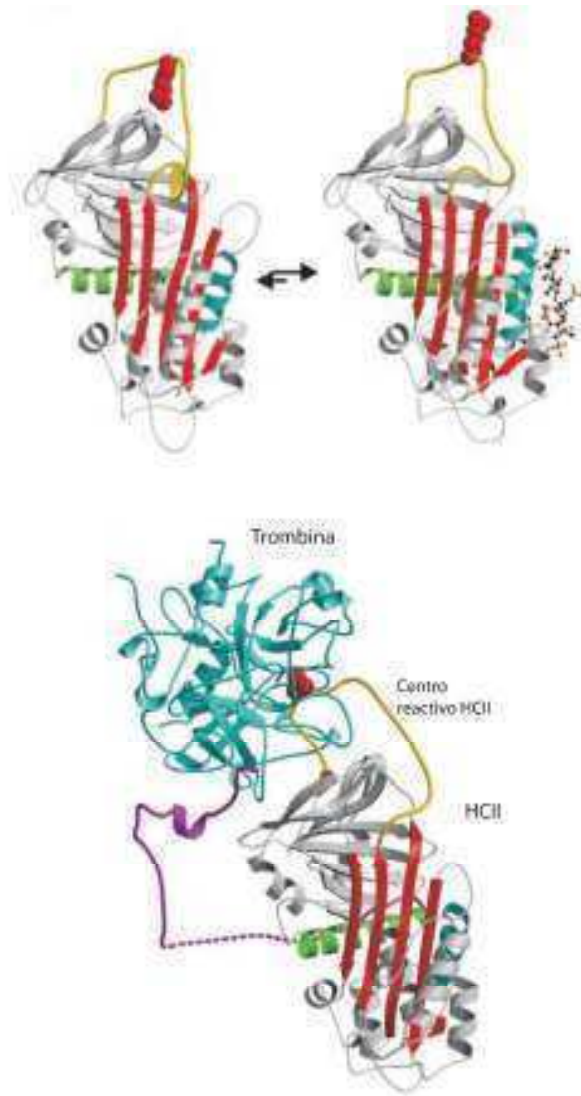
**Figura 6** –Complejo ternario entre antitrombina (rojo), trombina (blanco) y heparina (varios colores, abajo). Tomado de Carrell et al., 1995.

El HCII (~66 kDa) tiene similitudes estructurales y funcionales con la AT, aunque su acción está limitada a la trombina. Al reconocer y unirse a los residuos P1-P1' del sitio activo del HCII, la trombina queda atrapada en un complejo estable en el cual se encuentra inactivada. Su deficiencia no se asocia con episodios de trombosis. El HCII también es potenciado por la heparina al igual que la AT (aunque se necesitan concentraciones mayores de heparina en el caso del HCII para lograr el mismo efecto), mientras que otro GAG, el dermatán sulfato (**Figura 7**), potencia alrededor de mil veces la inhibición de trombina mediada por HCII (Tollefsen et al., 1983). Los sitios de unión para ambos GAGs sobre el HCII se superponen parcialmente (Rossi et al., 1999). El dermatán sulfato se obtiene de diversas fuentes animales, tanto mamíferos como invertebrados, y está formado por unidades de ácido idurónico y glucurónico y N-acetilgalactosamina. A pesar de las similitudes, la inhibición de trombina mediada por HCII parece implicar un mecanismo alostérico, diferente al de templado o puente que ocurre en el caso de la AT. En la molécula de HCII el dominio ácido del extremo amino está interactuando con el sitio de unión de los GAGs (básico), de modo tal que no puede interactuar con la trombina. En presencia de dermatán sulfato (algo similar sucedería con la heparina), se produce una competencia por el sitio de unión de GAGs, en la que el compuesto sulfatado desplaza al extremo amino terminal, exponiéndolo a la trombina y permitiendo la formación del complejo HCII-trombina (**Figura 8**). Este

mecanismo no requiere la unión del GAG a la trombina, y el complejo trombina-HCII es eliminado rápidamente (Rossi et al., 1999; Baglin et al., 2002).



**Figura 7-** Estructura del glicosaminoglicano sulfatado dermatán sulfato. A) Disacárido predominante en dermatán sulfato sintetizado por mamíferos, con un grupo sulfato. B) Disacárido de dermatán sulfato de mamíferos necesario para la unión al inhibidor fisiológico HCII, con dos grupos sulfato C) Disacárido de dermatán sulfato sintetizado por ascidias, también con dos sulfatos, aunque en diferente posición, y sin afinidad por HCII. Tomado de Mulloy, 2005.



**Figura 8** – Estructura y modo de acción del HCII. Arriba: equilibrio entre las formas inactiva y activa del HCII; a la izquierda se observa que el bucle que contiene el sitio reactivo no está expuesto, a la derecha la unión con un GAG produce su exposición. Abajo: complejo entre el HCII y la trombina. Tomado de Baglin et al., 2002.

## **EXPERIMENTAL**

---

## **Capítulo 2 – Análisis de la actividad anticoagulante del arabinano piranósico *Codium vermilara***

### **2.1. Ensayos generales de coagulación**

Las pruebas globales de coagulación se realizaron con un coagulómetro ST4 (Diagnostica Stago, Francia), siguiendo los métodos establecidos por Brozovic (1991). Los parámetros de cada ensayo fueron establecidos en el equipo, fijando un tiempo máximo de medición de aproximadamente 10 veces el tiempo de control. Los reactivos usados fueron provistos por Diagnostica Stago, excepto la trombina bovina (Wiener, Argentina), y las drogas usadas como referencia: heparina (Sigma, USA) y dermatán sulfato (Syntex, Argentina). Las incubaciones con los polisacáridos y las drogas de referencia se realizaron mezclando plasma pobre en plaquetas (PPP) y las correspondientes soluciones (de concentración variable) en una relación de volumen de 9:1. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado; como control se utilizó solución salina (0,9 % NaCl). Los resultados se expresan como la razón tiempo del ensayo/tiempo del control.

Para la obtención del plasma, se extrajo sangre de voluntarios sanos y se agregó citrato de sodio 3,2 % en una relación de volumen 9 + 1. El PPP se preparó por doble centrifugación (2000 g por 10 minutos). Se mezclaron los plasmas provenientes de todos los voluntarios, se alicuotó la mezcla y se conservó a  $-70^{\circ}$  C hasta ser utilizada en los análisis.

#### **2.1.1. Tiempo de Trombina (TT)**

##### **2.1.1.1. TT sobre plasma**

Se reconstituyó un vial del reactivo Thrombin Time liofilizado en 2 ml de agua destilada. 100  $\mu$ l de plasma se incubaron a  $37^{\circ}$  C durante 60 segundos con la solución salina, o de polisacárido o droga, según el caso. Se agregaron 100  $\mu$ l del reactivo y se midió el tiempo de formación del coágulo.

##### **2.1.1.2. TT sobre fibrinógeno**

Se repitió el procedimiento descrito en el punto anterior, reemplazando el plasma por una solución de fibrinógeno purificado 3 mg/ml.

### **2.1.2. Tiempo de Protrombina (TT)**

Un vial del reactivo Neoplastine CI Plus se reconstituyó en 5 ml de agua destilada, al menos 30 minutos antes de realizar los ensayos. Se incubaron 50 µl de plasma con las distintas soluciones, a 37° C durante 60 segundos. Luego se agregaron 100 µl del reactivo y se midió el tiempo de formación del coágulo.

### **2.1.3. Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA)**

El reactivo PTT-A se reconstituyó en 5 ml de agua destilada. Se incubaron 50 µl de plasma con las distintas soluciones y sumando 50 µl del reactivo, a 37° C durante 180 segundos. Luego se agregaron 50 µl de cloruro de calcio 0,025 M y se midió el tiempo de formación del coágulo.

### **2.1.4. Tiempo de Reptilasa (TR)**

El reactivo FTH 50 Reptilase se reconstituyó en 1 ml de agua destilada. Se incubaron 150 µl de plasma con las distintas soluciones, a 37° C durante 90 segundos. Luego se agregaron 50 µl del reactivo y se midió el tiempo de formación del coágulo.

## **2.2. Ensayos amidolíticos**

Los ensayos amidolíticos se realizaron de acuerdo al método de Collic et al. (1991). En dichos ensayos, la enzima estudiada actúa sobre un sustrato artificial que al ser hidrolizado libera un cromóforo, cuya presencia puede detectarse al medir la absorbancia de la solución a determinada longitud de onda. De este modo, a mayor actividad de la enzima en el sistema, mayor concentración del cromóforo, y por lo tanto, mayor absorbancia.

### **2.2.1. Inhibición directa de Trombina**



Se disolvieron los polisacáridos (5-100 µg/ml) en buffer Tris-HCl pH 7,4, 7,5 mM EDTA 150 mM NaCl. 50 µl de esta solución se incubaron con 75 µl del mismo buffer durante 2 minutos a 37° C. Se agregaron 75 µl de trombina (10 U/ml en el caso de la trombina bovina, y una concentración equivalente determinada por ensayo de Tiempo de Trombina en el caso de la trombina humana) y se incubó a 37° C durante un minuto. Finalmente, se sumaron 75 µl de sustrato cromogénico S-2238 1,5 mM, y transcurrido un minuto se midió la absorbancia a 405 nm con un lector de placas Stat Fax 303. La medición se repitió cada 1 minuto, hasta los 10 minutos luego de agregado el sustrato. Los valores tomados en cuenta para realizar todos los gráficos que se muestran en Resultados corresponden a la absorbancia medida a los 2 minutos.

### **2.2.2. Inhibición de Trombina mediada por AT**

Se repitió el procedimiento descrito en el punto anterior, reemplazando los 75 µl de buffer Tris-HCl por el mismo volumen de solución de antitrombina (AT; 50-200 nM).

### **2.2.3. Inhibición de Trombina mediada por HC II**

Se repitió el procedimiento descrito en el punto 2.2.1., reemplazando los 75 µl de buffer Tris-HCl por el mismo volumen de solución de cofactor II de la heparina (HCII; 50-200 nM), utilizando trombina humana debido a la especificidad de este inhibidor fisiológico.

### **2.2.4. Inhibición directa de Factor Xa**

Se repitió el procedimiento descrito en el punto 2.2.1., reemplazando los 75 µl de solución de trombina por el mismo volumen de solución de FXa 1 U/ml, y utilizando sustrato S-2222 1,5 mM.

## **2.3. Electroforesis**

### **2.3.1. Geles de poliacrilamida, nativo**

Alicuotas de 20 µl de trombina humana purificada (Diagnostica Stago) de concentración 165 NIH/ml se incubaron durante 30 segundos con el polisacárido (20 µl, 100-250

µg/ml), a temperatura ambiente. La reacción se detuvo por agregado de buffer Tris 0,025 M - Glicina 0,192 M, pH 8,3, en relación de volumen 3:1. Como control se sembraron la trombina y el polisacárido por separado, incubados con agua. Las muestras (20 µl) se sembraron en geles de poliacrilamida de gradiente (4-15 %). La electroforesis se realizó en una cuba Mini-PROTEAN (BioRad) a corriente constante (200V), durante 40 minutos, en el buffer descrito. Se realizaron tinciones con Azul de Coomassie R-250 0,25 % en metanol 40% y ácido acético 10% para visualizar las proteínas, y en el caso de los polisacáridos sulfatados, con Azul de *o*-Toluidina 1 % en buffer fosfato 0,1M pH 6,8. Los geles teñidos con Azul de Coomassie se trataron con solución lavadora (metanol:ácido acético:agua en relación 4:1:5), y los teñidos con Azul de Toluidina se lavaron con etanol 70%, luego 50%, y así sucesivamente hasta lograr la rehidratación total del gel.

### **2.3.2. Geles de poliacrilamida, SDS**

Se procedió de manera similar a lo descrito en el punto anterior para las incubaciones. La reacción se detuvo por agregado de buffer de muestra 0,125 M Tris/HCl, SDS 40 mg/ml, 20 % (v/v) glicerol, pH 6,8, en relación de volumen 3:1. Luego las muestras se llevaron a 100° C en baño de agua durante 5 minutos. Se utilizaron los mismos controles, condiciones de desarrollo de la electroforesis y tinciones que en PAGE nativo.

## **2.4. Espectroscopía**

Los análisis de las interacciones entre el arabinano sulfatado de *Codium vermilara* mediante espectroscopía se realizaron en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Buenos Aires (IIBBA), CONICET, en colaboración con el Dr. Julio Caramelo.

### **2.4.1 Espectroscopía de dicroísmo circular**

Los espectros de dicroísmo circular fueron medidos con un espectropolarímetro Jasco J-815. Todos los espectros fueron tomados a 20° C en buffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 y se tomaron usando una celda de 1 mm de paso óptico, en el rango de 190-260 nm. Cada

espectro es el promedio de 15 pulsos. Las concentraciones usadas en estos ensayos fueron 2  $\mu\text{M}$  para la trombina humana y 10  $\mu\text{M}$  para el arabinano.

#### 2.4.2. Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia fueron medidos con un espectrofluorímetro Jasco FP-6500 a 20° C en buffer 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. La muestra, conteniendo 1  $\mu\text{M}$  de trombina humana, fue titulada con una solución concentrada del polisacárido en una celda de cuarzo de 4 x 4 mm. Tras cinco minutos de incubación, la muestra fue excitada a 295 nm y se registró la emisión en el rango de 300 a 430 nm. Se seleccionaron anchos de banda espectrales de 1 a 5 nm. Cada espectro es el promedio de 6 pulsos. En cada caso, se sustrajo el blanco y la información fue corregida respecto de la dilución. La afinidad de unión fue estimada por ajuste de la intensidad de fluorescencia a 335 nm a un modelo de unión cooperativo ( $F = F_0 + \Delta F \cdot [L]^n / (K_D + [L]^n)$ ), donde F es la señal medida,  $F_0$  es la señal en ausencia del polisacárido,  $\Delta F$  es el cambio de señal de la proteína saturada con el polisacárido, [L] es la concentración del ligando,  $K_d$  es la constante de disociación y n el coeficiente de Hill).

#### 2.5. Acoplamiento molecular (*docking*) y simulación de la dinámica molecular

Estos ensayos fueron realizados por el Dr. Hugo Verli y el Lic. Laercio Pol-Fachin en el Centro de Biotecnología de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil, sin participación de la autora de esta tesis. Sus resultados se incluyen debido al aporte que representan en el estudio de la actividad anticoagulante del arabinano sulfatado de *Codium vermilara*, en particular con respecto al mecanismo de inhibición directa de la trombina y las interacciones a nivel molecular ente la enzima y el polisacárido.

##### 2.5.1. Acoplamiento molecular (*docking*)

La estructura de las trombinas humana y bovina fue tomada de PDB Id's 1PPB y 1TBQ, respectivamente (Bode et al., 1989; van de Locht et al., 1995). Se construyeron octasacáridos formados por unidades disulfatadas ( $[\text{L-Arap}_{2,4\text{S}}-(1 \rightarrow 3)\text{-L-Arap}_{2,4\text{S}}]_4$ ) y no sulfatadas ( $[\text{L-Arap}-(1 \rightarrow 3)\text{-L-Arap}]_4$ ), en base a las conformaciones prevalentes de

los disacáridos que los componen. Estas conformaciones se obtuvieron por simulación de la dinámica molecular de las soluciones, como fuera previamente descrito (Fernandes et al., 2010; Pol-Fachin et al., 2010). Para estos cálculos, las unidades de arabinosa piranósica se consideraron en su forma más abundante,  ${}^4C_1$ . Las estructuras de las proteínas y los oligosacáridos se prepararon con AutoDockTools 1.5.4. para AutoDock 4.2 (Morris et al., 2009), usando Autogrid para generar las condiciones y parámetros de la grilla para cubrir el exosítio 2 de ambas trombinas. Se aplicó el algoritmo genético lamarckiano, con parámetros por defecto, excepto el número máximo de generaciones en cada repetición, fijado en 270.000, y el número de conformaciones generadas, fijada en 1.000 después de 100 corridas. Las orientaciones de los oligosacáridos fueron seleccionadas en base a la energía de unión, abundancia de orientaciones y superposición con heparina en un grupo de 2,0 Å de corte.

### 2.5.2. Simulación de la dinámica molecular

La trombina (humana y bovina) se simuló en las siguientes condiciones: sin complejar y complejada en cada uno de los exosítios (1 y 2) con el octasacárido de arabinosa no sulfatada y con el octasacárido de arabinosa disulfatada. Cada uno de estos sistemas fue disuelto en cajas triclinicas usando condiciones límite periódicas y modelo de agua SPC. Se aplicó el método de LINCS (Hess et al., 1997) para forzar el largo de los enlaces covalentes, permitiendo un paso de integración de 2 femtosegundos tras una minimización inicial de energía usando el algoritmo de máxima pendiente. Las interacciones electrostáticas fueron calculadas con el método de Ewald (*Particle mesh Ewald method*) (Darden et al., 1993). Temperatura y presión se mantuvieron constantes a 310 K y 1 atm, respectivamente, asociando proteínas, oligosacáridos, iones y solvente a la temperatura y presión de baños de externos (Berendsen et al., 1984; Bussi et al., 2007) con constantes de acoplamiento de  $\tau = 0,1$  y  $0,5$  picosegundos, respectivamente. La constante dieléctrica fue tratada como  $\epsilon = 1$ . Los sistemas fueron calentados lentamente desde 50 a 310 K, en pasos de 5 picosegundos, en cada uno de ellos incrementando la temperatura de referencia en 50 K. Después de este calentamiento, las simulaciones fueron extendidas a 50 nanosegundos a temperatura constante de 310 K. Todas las simulaciones fueron desarrolladas bajo el paquete de simulación GROMACS, versión 4.0.5 (Hess et al., 2008) y campo de fuerza GROMOS96 43a1 (Scott et al., 1999). En los complejos trombina-oligosacárido, antes de la colección de los datos, se

usaron simulaciones de la dinámica molecular de 10 nanosegundos como para equilibrar, con una restricción inicial de  $5000 \text{ kJ mol}^{-1}$  aplicada a ambas moléculas. Esta fuerza constante fue reducida en  $1000 \text{ kJ mol}^{-1}$  cada 2 nanosegundos, permitiendo que las moléculas de agua y contraiones se asienten alrededor de los complejos.

## **RESULTADOS**

## Capítulo 3 - Actividad anticoagulante del arabinano piranósico de *Codium vermilara*.

### 3.1. Introducción

En numerosas ocasiones se ha evaluado la actividad anticoagulante de polisacáridos sulfatados sintetizados por algas marinas. Los ensayos globales de coagulación, desarrollados como pruebas para el diagnóstico biológico en hemostasia y trombosis, constituyen una primera aproximación en este tipo de trabajos y suelen brindar los primeros indicios en caso de haber actividad de algún tipo. Mientras el Tiempo de Protrombina (TP) se enfoca en la vía extrínseca de la cascada de coagulación, el Tiempo de Tromboplastina Parcial Activada (TTPA) evalúa las vías intrínseca y común y el Tiempo de Trombina (TT) lo hace respecto de la actividad de la trombina y la polimerización de la fibrina (ver **Figura 1** de la Introducción de esta 2° Parte). El Tiempo de Reptilasa (TR), por su parte, se realiza a modo de control del plasma que se utiliza en los ensayos globales, ya que en este ensayo se reemplaza la trombina por un reactivo derivado de veneno ofídico que hidroliza el fibrinógeno permitiendo la formación del coágulo de fibrina. Un alargamiento del tiempo de coagulación en TR en las condiciones de ensayo usadas indicaría alguna interferencia en la polimerización de la fibrina.

Una vez determinada la presencia de actividad anticoagulante a través del alargamiento de los tiempos de coagulación (o al menos en alguno de los ensayos descriptos) y dada la complejidad del proceso de coagulación, cabe preguntarse sobre qué punto/s de dicho proceso podría estar actuando el compuesto, y a través de qué mecanismos se ejerce esa acción. En esta instancia, son diversas las técnicas y enfoques que pueden contribuir a responder esas preguntas. Los resultados que se exponen a continuación se obtuvieron mediante ensayos amidolíticos, electroforesis, modelado molecular, dicroísmo circular y espectroscopía de fluorescencia.

En trabajos previos de nuestro laboratorio se había reportado la actividad anticoagulante del extracto acuoso a temperatura ambiente de *Codium vermilara*, determinada mediante pruebas globales (TTPA y TT) (Ciancia et al., 2007). Habiendo realizado la purificación y caracterización estructural de los principales polisacáridos de la pared

celular de *Codium vermilara* (ver la 1° Parte de esta tesis), se optó por profundizar en los mecanismos de acción del arabinano piranósico sulfatado A1 (obtenido a partir del extracto acuoso a temperatura ambiente V1). Esta elección se basa en reportes que señalan que los polisacáridos ricos en arabinosa son los que mayor actividad anticoagulante presentan entre los polisacáridos sulfatados de algas verdes (Hayakawa et al., 2000). Por otro lado, y a diferencia del galactano sulfatado sintetizado por estas algas, se trata de un compuesto de estructura novedosa, ya que no se ha reportado la existencia de otro polisacárido de arabinosa en forma piranósica en algas ni en ningún otro tipo de organismo.

Por último, si bien muchas de las pruebas se realizaron tanto con trombina bovina como humana y la mayor actividad se detectó en el primer caso, dada la importancia de la trombosis desde el punto de vista de la salud humana, se llevaron a cabo algunos ensayos adicionales sólo con la enzima de origen humano con la finalidad de indagar con mayor profundidad en su interacción con A1..

### **3.2. Ensayos generales de coagulación**

En primer lugar, se realizaron los ensayos generales (TTPA, TP, TT) para evaluar el efecto del A1 sobre el tiempo de coagulación, usando como referencia heparina y dermatán sulfato, dos drogas de conocida actividad anticoagulante a través de potenciación de los inhibidores fisiológicos de la trombina antitrombina (AT) y cofactor de heparina II (HCII), respectivamente (**Tabla 1**). En el caso del TR, no se observaron diferencias en presencia del polisacárido respecto del control. Por otro lado, se realizaron ensayos en presencia de A2 (**Tabla 2**), un arabinano de menor nivel de sulfatación (obtenido a partir del extracto acuoso a 90° C de *Codium vermilara*) y del producto de desulfatación de A1 (A1D) (**Tabla 3**; ver 1° Parte de esta tesis para mayores detalles sobre la estructura de estos tres polisacáridos). En el caso del Tiempo de Protrombina, no se llegaron a observar diferencias significativas, probablemente debido a la rápida cinética del ensayo. Wijesekara y colaboradores (2011) remarcan que en los numerosos reportes de polisacáridos sulfatados de algas marinas con actividad anticoagulante no se suelen registrar alargamientos en TP, sugiriendo poca o nula inhibición de la vía extrínseca por parte de estos compuestos.



**Tabla 1.** Actividad anticoagulante de A1 evaluada por ensayos globales de coagulación (TTPA y TT), comparada con la de heparina y dermatán sulfato. Los resultados se expresan como la razón tiempo ensayo/tiempo control  $\pm$  desvío estándar.

Polisacárido	Concentración (ug/ml)	TTPA	TT
A1	1	1,2 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
	10	4,4 $\pm$ 0,2	>10
	25	>10	>10
Heparina	1	3,6 $\pm$ 0,5	>10
	10	>10	>10
	25	>10	>10
Dermatán sulfato	1	1,2 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,5
	10	2,5 $\pm$ 0,1	>10
	25	5,2 $\pm$ 0,1	>10

**Tabla 2.** Actividad anticoagulante de A1 evaluada por ensayos globales de coagulación (TTPA y TT), comparada con la de su producto de A2 y A1D. Los resultados se expresan como la razón tiempo ensayo/tiempo control  $\pm$  desvío estándar.

Polisacárido	Concentración (ug/ml)	TTPA	TT
A1	5	2,6 $\pm$ 0,2	>10
A2	5	1,5 $\pm$ 0,0	3,8 $\pm$ 0,2
A1D	5	1,0 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,1

**Tabla 3.** Análisis de metilación de A1, A2 y A1D. Los valores expresan moles %.

Monosacárido	Unidad estructural	A1	A2	A1D
2,3,4-Ara *	L-Arap(1 $\rightarrow$	0,7	6,2	3,3
2,4-Ara	$\rightarrow$ 3) L-Arap (1 $\rightarrow$	13,3	35,0	88,0
2-Ara	$\rightarrow$ 3) L-Arap4S (1 $\rightarrow$	25,6	29,7	4,5
4-Ara	$\rightarrow$ 3) L-Arap2S (1 $\rightarrow$	9,7	7,1	3,2
Ara	$\rightarrow$ 3) L-Arap2,4S (1 $\rightarrow$	50,2	22	1,0

\*2,3,4-Ara indica 2,3,4-tri-O-metil-L-arabinopiranososa, etc.

Por último, se realizó un ensayo similar al Tiempo de Trombina utilizando fibrinógeno purificado en lugar de plasma, tanto con trombina humana como bovina (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Ensayo tipo TT, con fibrinógeno purificado en lugar de plasma, usando Trombina Bovina (TB) y Humana (TH) y A1 (5µg/ml). Los resultados se expresan como la razón tiempo ensayo/tiempo control  $\pm$  desvío estándar.

Trombina	Tiempo de coagulación
TB	4,9 $\pm$ 0,2
TH	1,4 $\pm$ 0,2

Al utilizar sólo fibrinógeno (es decir, el sustrato sobre el cual actúa la trombina para generar la fibrina que originará el coágulo) en lugar de plasma, se descarta la intervención de los inhibidores AT y HCII en el alargamiento del tiempo de coagulación. Así, los resultados obtenidos en este ensayo pueden interpretarse como el primer indicio de un mecanismo de inhibición directa de la trombina por parte de A1. Al mismo tiempo, pudo observarse una importante diferencia entre el alargamiento obtenido con las trombinas humana y bovina, diferencia confirmada posteriormente en otros ensayos.

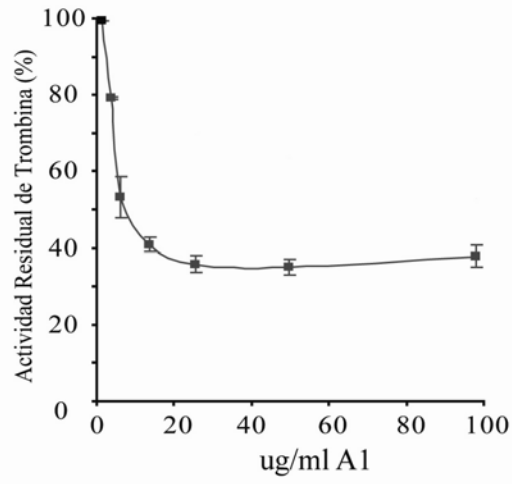
### 3.3. Ensayos amidolíticos con trombina para detectar inhibición directa

Los ensayos amidolíticos permiten indagar en los mecanismos de acción de un compuesto anticoagulante. En el caso de la trombina, se utiliza un sustrato cromogénico (S-2238) con una secuencia que es reconocida por la enzima, permitiendo que ésta se una y lo clive, liberando un cromóforo cuya presencia puede detectarse y cuantificarse mediante la absorbancia de la solución a una determinada longitud de onda. En estas condiciones, una mayor absorbancia debida a una mayor concentración del cromóforo se interpreta como señal de una mayor actividad de la enzima. Una menor absorbancia, por el contrario, estaría indicando que dicha actividad fue inhibida de algún modo.

La trombina bovina se usó en una concentración de 10 U/ml (dilución alcanzada siguiendo las indicaciones del fabricante). Para obtener resultados comparables, antes de realizar los ensayos amidolíticos con trombina humana se buscó igualar la concentración de ambas enzimas, en términos de actividad coagulante. Esto se logró llevando la trombina humana a una concentración tal que se obtuviera el mismo tiempo de coagulación en un ensayo de Tiempo de Trombina que con la trombina bovina 10 U/ml (10,5 segundos  $\pm$  0,3). Este ajuste permitió trabajar con concentraciones equivalentes, y se realizó debido a que están reportadas en la bibliografía diferencias en actividad coagulante y amidolítica entre ambas trombinas, e inclusive entre enzimas del mismo origen animal pero de diferente marca u obtenidas por diferentes procesos (Fareed et al., 1986). Sin ir más lejos, estas soluciones de trombina bovina y humana que mostraron igual comportamiento en TT, presentaron valores de absorbancia significativamente diferentes en los ensayos amidolíticos. Debido a que en cada caso el correspondiente control (buffer + trombina + sustrato) se consideró como el 100 % de actividad de la trombina sobre el sustrato y se tomó como referencia para los demás ensayos, esa diferencia de actividad amidolítica para las dos trombinas no impide la comparación entre los resultados.

### 3.3.1. Trombina bovina

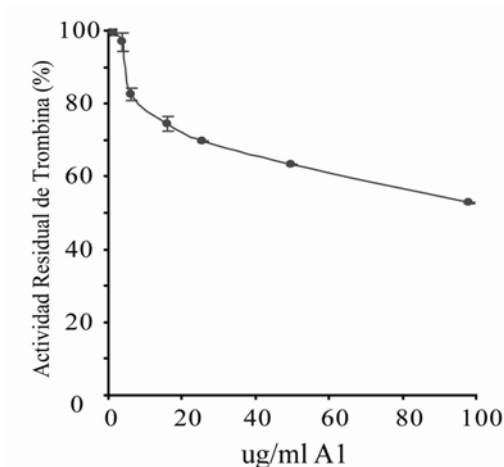
Los ensayos con trombina bovina mostraron que A1 produce una disminución importante de la actividad amidolítica de la enzima, en forma dependiente de la concentración (**Figura 1**). Esto indicaría que el polisacárido actúa en forma directa sobre la trombina bovina, inhibiendo su capacidad para unirse y/o clivar al sustrato cromogénico.



**Figura 1** - Efecto de A1 sobre la actividad de la trombina bovina sobre el sustrato S-2238. Los valores de la curva (media  $\pm$  DE) representan el porcentaje de la correspondiente absorbancia (a 405 nm) respecto de la absorbancia del control (100%; trombina + buffer).

### 3.3.2. Trombina humana

La trombina humana también mostró una disminución significativa de su actividad amidolítica en presencia de A1 (**Figura 2**), aunque el efecto fue menor respecto del observado con la trombina bovina. En este caso también se infiere un efecto inhibitorio directo del polisacárido sobre la enzima.

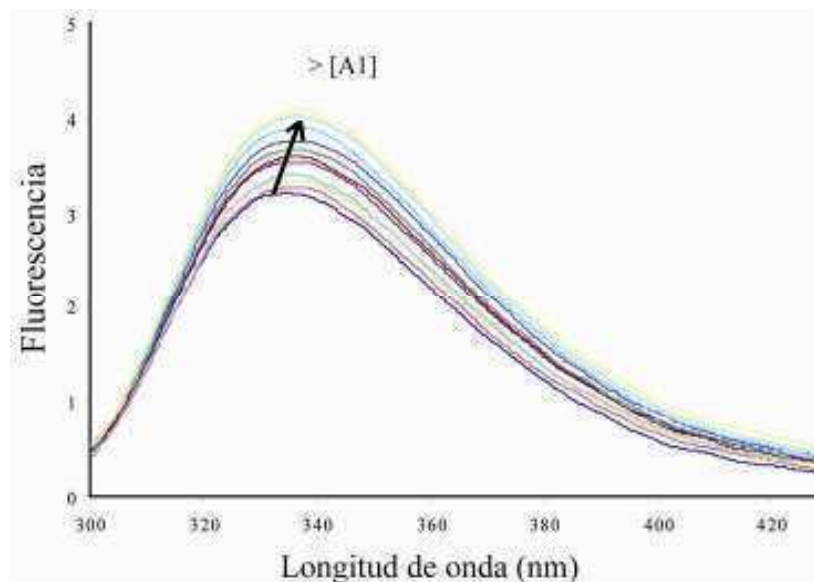


**Figura 2** - Efecto de A1 sobre la actividad de la trombina humana sobre el sustrato S-2238. Los valores de la curva (media  $\pm$  DE) representan el porcentaje de la correspondiente absorbancia (a 405 nm) respecto de la absorbancia del control (100%; trombina + buffer).

### 3.4. Caracterización del complejo polisacárido-trombina humana

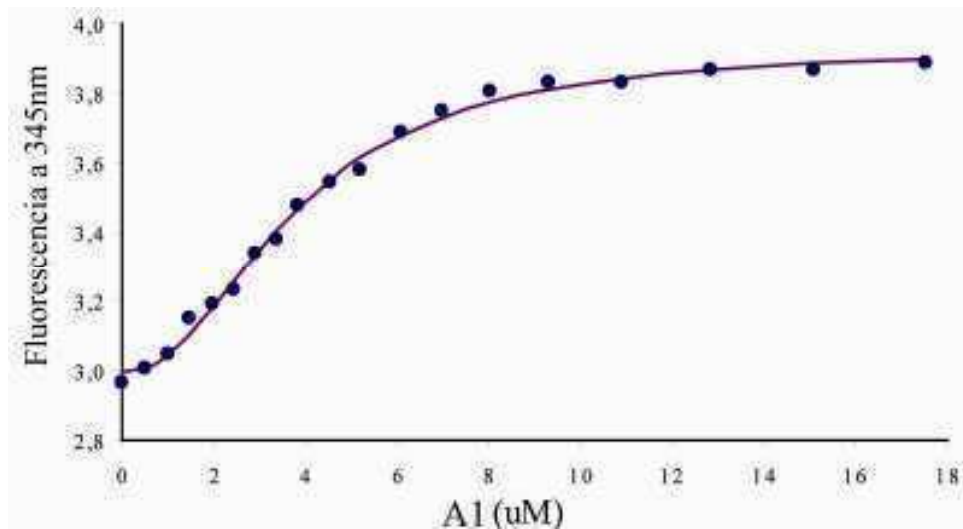
#### 3.4.1. Espectroscopía de fluorescencia

En forma general, un espectro de emisión se obtiene midiendo las diferentes frecuencias de luz fluorescente emitida por una muestra, manteniendo la luz de excitación a una longitud de onda constante. Si una proteína que contiene un único residuo triptofano en su núcleo hidrofóbico se desnaturaliza, se obtiene un cambio en el color del espectro de emisión, observándose un desplazamiento hacia el rojo (es decir, hacia menores longitudes de onda). Esto se debe a la exposición del triptófano a un entorno acuoso en contraposición a su anterior estado donde se encontraba en el interior hidrofóbico de la proteína (Freifelder, 1981). En el caso de la trombina, la fluorescencia se debe a la presencia de nueve residuos triptofano, con entornos muy diferentes, por lo que la interpretación de los cambios en el espectro de emisión resulta dificultosa. Esto origina un espectro de emisión con una banda muy ancha, cuyo máximo se encuentra en 335 nm. Tal como se observa en la **Figura 3**, la unión del arabinano, en concentraciones crecientes, produce en el espectro de la trombina humana un corrimiento hacia el rojo (unos 2 nm para la longitud de onda de máxima emisión) y un incremento en la intensidad de la emisión de alrededor del 20%.



**Figura 3-** Espectro de emisión de la trombina humana con concentraciones crecientes de A1.

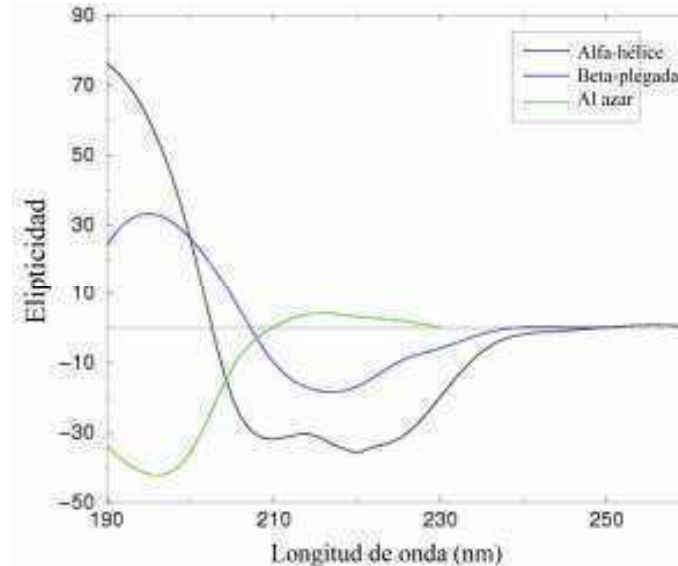
La **Figura 4** muestra la curva elaborada a partir de las intensidades de emisión observadas a 345 nm a medida que se aumentó la concentración de A1. A partir de dicha curva se pudo calcular una  $K_d$  de  $17 \pm 3 \mu\text{M}$ , con un coeficiente cooperativo de  $2,1 \pm 0,2$ . La afinidad de la unión se determinó mediante el ajuste de la curva a un modelo de unión cooperativo que responde a la ecuación de Hill. Un mecanismo con cooperatividad positiva implica que la unión de una primer molécula del sustrato o ligando estimula la unión de más moléculas de su especie (Berg et al., 2007). Esto explica el tipo de curva sigmoidea que se observa en estos casos, donde la pendiente inicial es pequeña como corresponde a una baja afinidad, y luego aumenta, a medida que lo hace la afinidad entre la proteína y el ligando. La ecuación de Hill ( $F = F_0 + \Delta F \cdot [L]^n / (K_d + [L]^n)$ , donde  $F$  es la señal medida,  $F_0$  es la señal en ausencia del polisacárido,  $\Delta F$  es el cambio de señal de la proteína saturada con el polisacárido,  $[L]$  es la concentración del ligando,  $K_d$  es la constante de disociación y  $n$  el coeficiente de Hill) suele usarse para describir cuantitativamente el grado de cooperatividad en una cinética de este tipo. El coeficiente de Hill ( $n$ ) puede tomar valores mayores o menores que uno, indicando una cooperatividad positiva o negativa, respectivamente. Un ejemplo típico de este mecanismo cooperativo (y de curva sigmoidea) es el de la unión del oxígeno a la hemoglobina, donde la desoxihemoglobina tiene una afinidad relativamente baja por el oxígeno, la cual aumenta tras la unión de la primera y segunda moléculas de oxígeno.



**Figura 4-** Intensidad de la fluorescencia de la trombina humana a 345 nm con concentraciones crecientes de A1.

### 3.4.2. Dicroísmo circular

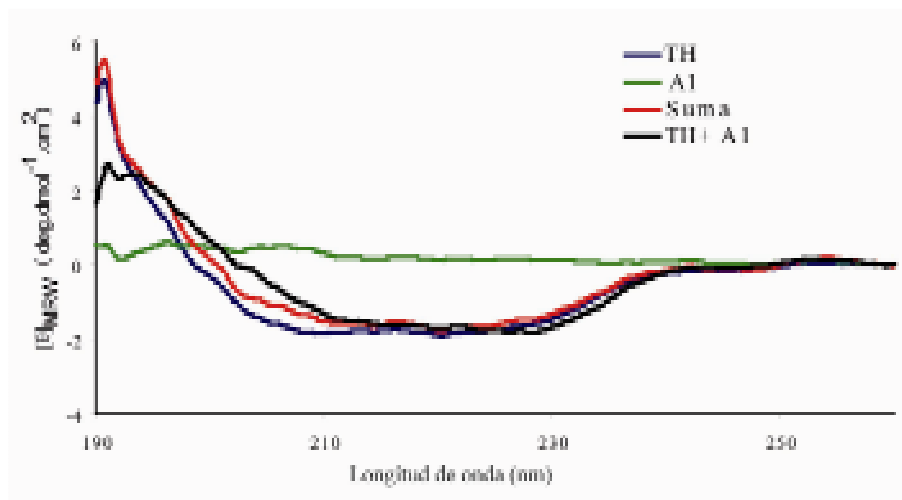
La espectroscopía de dicroísmo circular se basa en la interacción de la luz polarizada con moléculas quirales, midiendo cambios en la amplitud de los haces de luz a través los cambios en la absorción, registrados por un espectropolarímetro (Olsen, 1990). Esta técnica se utiliza para conocer la estructura de proteínas (aunque también se aplica a otras macromoléculas, como ADN), seguir cambios conformacionales y medir la unión de ligandos a proteínas. En la zona de longitudes de onda correspondientes al UV lejano (190-250 nm) se observan principalmente las transiciones correspondientes a los enlaces peptídicos y los enlaces disulfuro de las cistina, mientras que en el UV cercano (250-340 nm) las de los residuos aromáticos (ópticamente inactivos pero ubicados en entornos asimétricos) y los grupos prostéticos. Los espectros en el UV lejano informan acerca de la estructura secundaria de una proteína, ya que las estructuras  $\alpha$ -hélice,  $\beta$ -plegada y al azar tienen espectros característicos (**Figura 5**). En una proteína que combina estas distintas estructuras es posible calcular el contenido de cada una de ellas a partir de la forma de su espectro.



**Figura 5-** Espectros DC-UV lejano característicos de los distintos tipos de estructura secundaria de proteínas.

La aplicación de esta técnica, en longitudes de onda del UV lejano, permitió explorar los cambios estructurales involucrados en la formación del complejo A1-trombina

humana. El espectro de la enzima aislada muestra características tanto de estructura secundaria  $\alpha$ -hélice como  $\beta$ -plegada (**Figura 6**). El análisis de dicho espectro por desconvolución sugiere un 16,5 % del primer tipo de estructura y un 31 % del segundo, lo que coincide con los valores calculados a partir de archivo pdb 1PPB de la trombina humana (15 y 36 %,  $\alpha$ - y  $\beta$ - respectivamente). El agregado de A1 produce un pequeño cambio en el espectro, observándose que el espectro de la mezcla de ambos compuestos no coincide con el calculado para la suma de ambos espectros por separado. Sin embargo, no puede descartarse que las diferencias observadas se deban tanto a cambios conformacionales en la proteína como en el polisacárido.



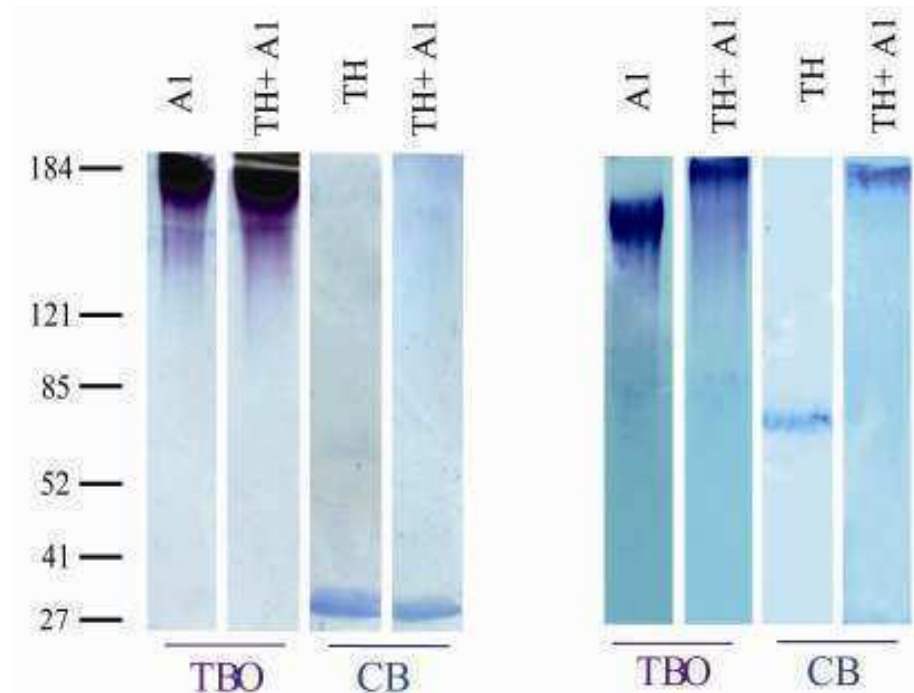
**Figura 6-** Espectro de dicroísmo circular en el UV lejano de la trombina humana (TH), de A1, y de la mezcla de ambos. El espectro calculado a partir de la suma de los espectros de ambos compuestos por separado también se muestra.

### 3.4.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Para indagar en la posible formación de un complejo A1-TH, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en diferentes condiciones. Al realizar la electroforesis en condiciones desnaturizantes (con agregado de SDS y tratamiento de la muestra a alta temperatura), no se vieron cambios en los patrones electroforéticos de la trombina y del polisacárido cuando fueron incubados juntos (**Figura 7**). Por el contrario, en condiciones nativas la incubación de ambos compuestos produjo cambios notorios en ambos casos (**Figura 7**). Esto puede observarse mediante el uso de dos tinciones diferentes: azul de *O*-Toluidina para polisacáridos aniónicos, y azul de



Coomasie para proteínas. Los diferentes resultados obtenidos en uno y otro tipo de PAGE sugieren que tras la incubación (30 segundos) de ambos compuestos, se forma un complejo A1-TH, y que ese complejo estaría estabilizado por interacciones tales que si bien permiten su detección en condiciones nativas, no son los suficientemente fuertes como para resistir las condiciones propias del SDS-PAGE (como sí lo serían, por ejemplo, las uniones covalentes).



**Figura 7-** SDS-PAGE (izquierda) y PAGE nativa (derecha); trombina humana incubada con el arabinano sulfatado de *Codium vermilara*. TBO: azul de *O*-Toluidina, tinción para polisacáridos aniónicos; CB: Coomassie Blue, tinción para proteínas.

### 3.5. Acoplamiento molecular (*docking*) y modelado molecular

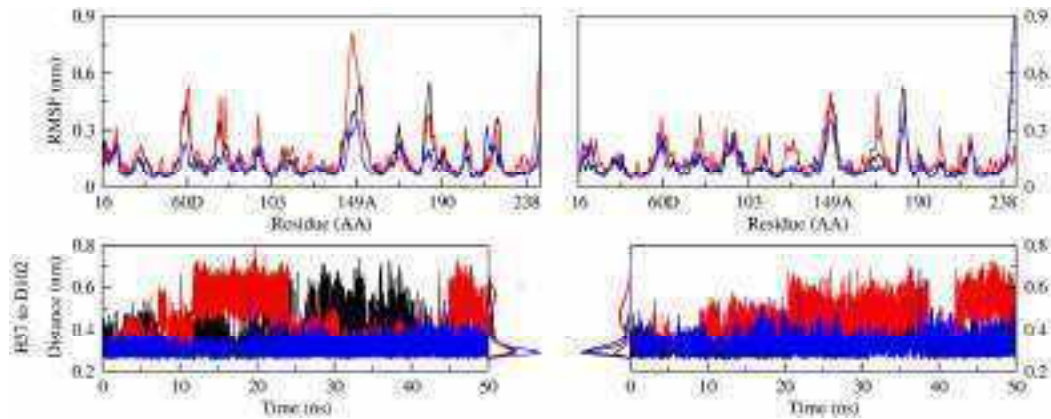
La identificación del rol de grupos específicos en la unión de un ligando a su receptor requiere la determinación de la estructura tridimensional del complejo, lo cual puede lograrse experimentalmente (por RMN y cristalografía de rayos X) o por métodos teóricos de modelado molecular (Becker et al., 2007). Entre estos últimos se incluye el procedimiento de acoplamiento molecular o *docking*. Consiste en una simulación computacional que permite predecir la orientación preferencial de una molécula

respecto de otra cuando ambas forman un complejo estable. Este conocimiento es a su vez usado luego para predecir la fuerza de esa unión (es decir, la afinidad entre ambas moléculas) y realizar las simulaciones de la dinámica molecular.

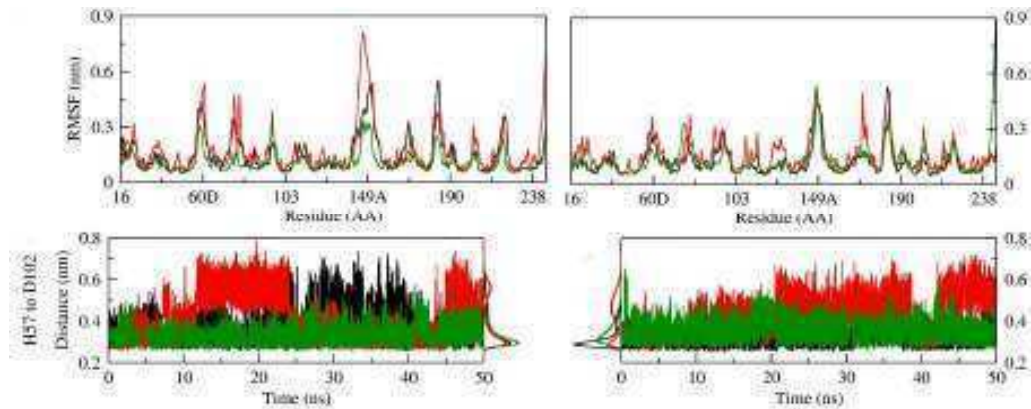
Las orientaciones obtenidas por acoplamiento molecular para los octasacáridos de unidades disulfatadas y sin sulfatar sobre la superficie de las enzimas (trombina bovina y humana) involucran al exosítio 2. Estas orientaciones se superponen mayormente con la que adquiere la heparina sobre la superficie de la trombina, como se ha observado previamente en estructuras cristalinas (Li et al., 2004). Estos complejos fueron luego refinados a través de simulaciones de dinámica molecular, que ofrecieron información sobre la dinámica de los complejos trombina-oligosacárido.

En comparación con el exosítio 2, la complejación del exosítio 1 con el fragmento de arabinano no produce cambios conformacionales en el sitio activo de la enzima, tal como se interpreta a partir de la medición de la distancia entre los residuos His 57 y Asp 102 de la tríada catalítica. Al unirse el oligosacárido al exosítio 1, la TH ve algo reducida su flexibilidad (**Figura 8**), mientras que la TB sólo sufre algunas diferencias puntuales respecto de la enzima sin complejar. Por esta razón, y en conjunto con los restantes datos obtenidos, la unión al exosítio 1 se consideró irrelevante por su aporte al mecanismo de inhibición directa de trombina por parte del arabinano, y se profundizó el análisis de la interacción de este compuesto con el exosítio 2.

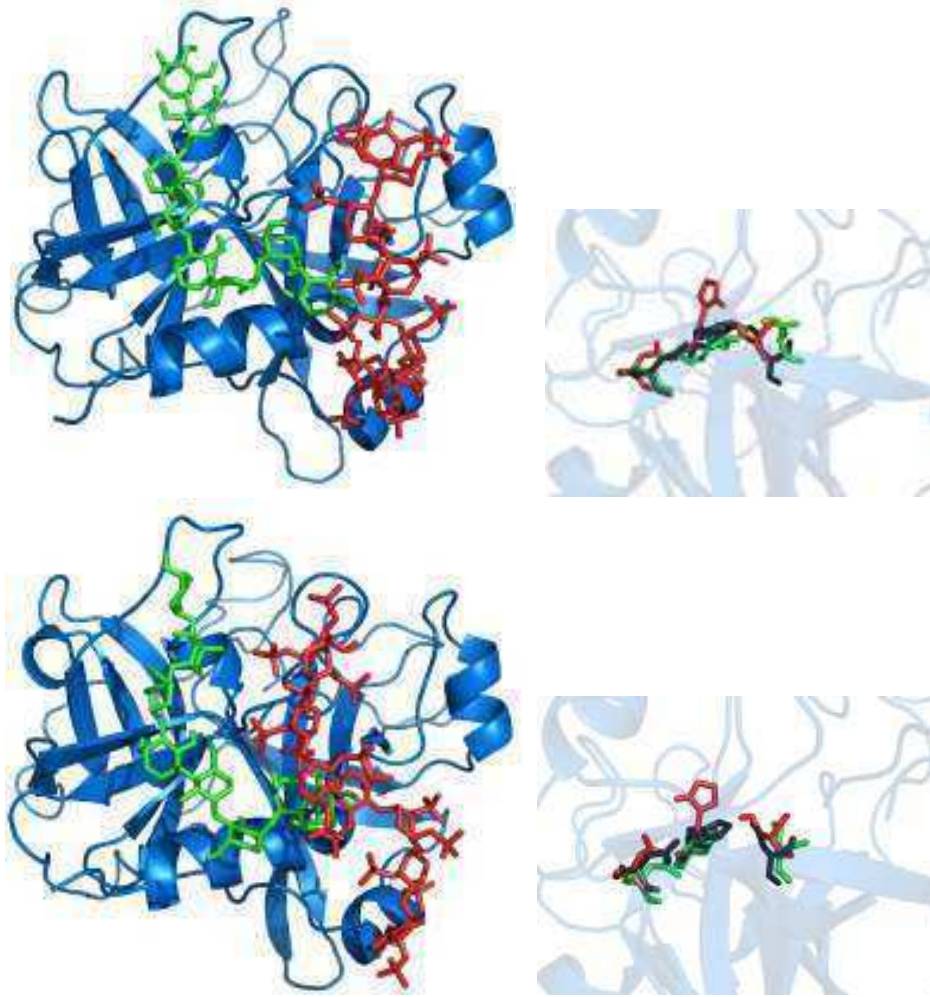
Por el contrario, la unión del octasacárido disulfatado al exosítio 2 de la TH y la TB (**Figura 9**) afecta la flexibilidad de varios sectores de la estructura proteica. En particular la región comprendida entre los residuos 60 y 77, cercana al sitio activo de la trombina, incluye bucles cuya plasticidad se incrementa en presencia del oligosacárido. Como consecuencia de esto aumenta la distancia entre los átomos His57 ND1 y Asp 102 OD1, que forman parte de la tríada catalítica, siendo esta modificación conformacional mayor en el caso de la enzima bovina que en el de la humana (**Figuras 9 y 10**). .



**Figura 8-** Perfiles de la trombina humana (izquierda) y la trombina bovina (derecha) durante las simulaciones de dinámica molecular, sin complejar (negro), y complejadas con el octasacárido de unidades disulfatadas de arabinosa mediante el exosito 1 (azul) y el exosito 2 (rojo). Arriba: raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF, por *root mean square fluctuation*) para la cadena pesada (cadena B) de la trombina. Abajo: distancia entre los átomos ND1 de His57 y OD1 de Asp102, que componen la tríada catalítica de la trombina.



**Figura 9-** Perfiles de la trombina humana (izquierda) y la trombina bovina (derecha) durante las simulaciones de dinámica molecular, sin complejar (negro), y complejadas mediante el exosito 2 con los octasacáridos de unidades de arabinosa disulfatadas (rojo) y no sulfatadas (verde). Arriba: raíz de la fluctuación cuadrática media (RMSF, por *root mean square fluctuation*) para la cadena pesada (cadena B) de la trombina. Abajo: distancia entre los átomos ND1 de His57 y OD1 de Asp102, que componen la tríada catalítica.



**Figura 10-** Arreglos finales de ambos octasacáridos respecto de la cadena pesada de la trombina humana (arriba) y bovina (abajo) junto con el estado final de la tríada catalítica. La cadena liviana se omite para mayor claridad.

Los valores de contribución entálpica para la interacción entre la proteína completa y cada carbohidrato fueron los siguientes:

Trombina humana - octasacárido de unidades disulfatadas:  $\Delta H_{int} = -740 \pm 154$  kJ/mol  
- octasacárido de unidades no sulfatadas:  $\Delta H_{int} = -333 \pm 35$  kJ/mol

Trombina bovina - octasacárido de unidades disulfatadas:  $\Delta H_{int} = -698 \pm 125$  kJ/mol  
- octasacárido de unidades no sulfatadas:  $\Delta H_{int} = -297 \pm 43$  kJ/mol

El análisis de la interacción entre los oligosacáridos de arabinosa y TB o TH indica que la mayoría de los contactos proteína-carbohidrato se produce a través de aminoácidos básicos sobre la superficie de la enzima (**Tabla 5**); más del 60% de esos contactos involucran residuos que forman parte del exosítio 2. Los grupos sulfato unidos al C-2 de las unidades de arabinosa interactúan más intensamente con la enzima que aquellos ubicados sobre C-4 (**Tabla 6**). Por otro lado, el octasacárido de unidades no sulfatadas presenta contactos debilitados o nulos, aunque se mantiene cierta interacción con el exosítio 2, a la par que se observan cambios en la orientación del oligosacárido respecto de la superficie de la trombina, debido a la ausencia de los grupos sulfato.

**Tabla 5.** Contribución entálpica para la interacción entre los residuos de aminoácidos de TH y TB y los oligosacáridos de unidades de arabinosa disulfatadas y sin sulfatar.

Residuos de aminoácidos (TH/TB)	Contribución entálpica para la interacción (kJ.mol <sup>-1</sup> )			
	Octasacárido con unidades disulfatadas		Octasacárido con unidades no sulfatadas	
	TH	TB	TH	TB
His91 / His91	-2 ± 2	-5 ± 9	-24 ± 7	-9 ± 6
Arg93 / Arg93	-133 ± 29	-101 ± 45	-12 ± 7	-2 ± 3
Arg97 / Lys97	-30 ± 41	0	0	0
Arg101 / Arg101	-93 ± 27	-51 ± 29	-7 ± 6	-3 ± 5
Arg126 / Lys126	-98 ± 30	-94 ± 46	0	0
Arg165 / Arg165	-39 ± 33	0	0	0
Arg233 / Arg233	-48 ± 34	-46 ± 33	-6 ± 5	-4 ± 8
Lys235 / Lys235	-58 ± 29	-3 ± 5	-2 ± 2	-1 ± 1
Lys236 / Lys236	-91 ± 38	-136 ± 43	-20 ± 12	-6 ± 8
Arg240 / Lys240	-17 ± 25	-125 ± 53	-20 ± 5	-18 ± 8
Gln244 / Arg244	0	-90 ± 61	-14 ± 8	-7 ± 11
<b>SUB-TOTAL</b>	<b>-570 ± 99</b>	<b>-650 ± 117</b>	<b>-104 ± 18</b>	<b>-49 ± 20</b>
<b>TOTAL</b>	<b>-740 ± 154</b>	<b>-698 ± 125</b>	<b>-333 ± 35</b>	<b>-297 ± 43</b>

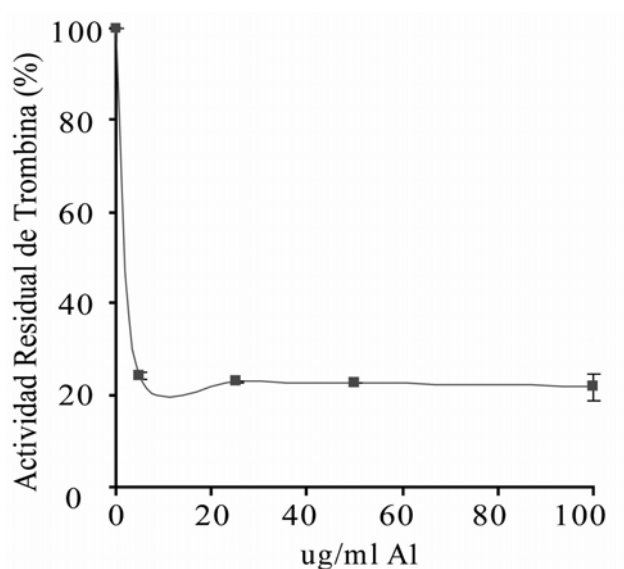
**Tabla 6.** Contribución entálpica para la interacción entre grupos sulfato unidos a C-2 y C-4 de unidades de arabinosa disulfatadas y trombina humana y bovina.

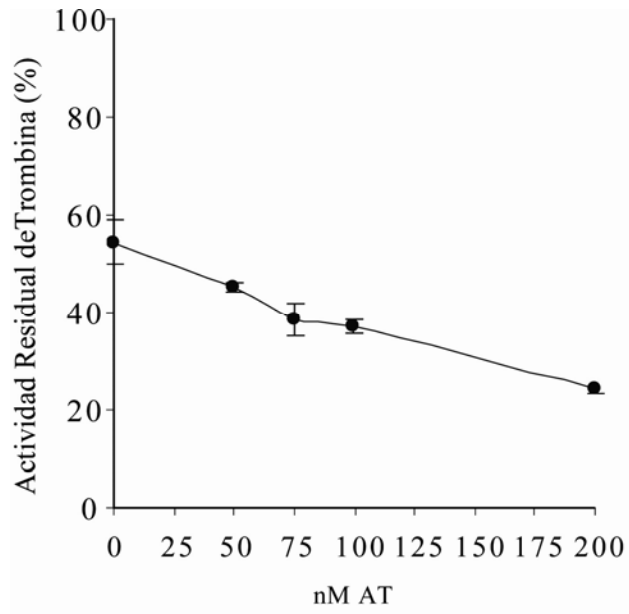
Posición del grupo sulfato	Contribución entálpica para la interacción (kJ.mol <sup>-1</sup> )	
	TH	TB
C-2	-436 ± 84	-381 ± 102
C-4	-221 ± 98	-270 ± 78

### 3.6. Ensayos amidolíticos en presencia de inhibidores fisiológicos de trombina

#### 3.6.1. Inhibición de trombina mediada por AT

En presencia de antitrombina, la actividad amidolítica de la trombina bovina disminuyó en forma significativa por efecto de A1 (**Figura 11**). Este efecto mostró ser dependiente de la concentración del polisacárido (5-100 µg/ml) para una determinada concentración de AT (200 nM). Por otro lado, el efecto también varió al mantener fija la concentración de A1 (5 µg/ml) y variar la de AT (50-200 nM). Estos resultados permiten afirmar que además de la inhibición directa, el polisacárido de *Codium vermilara* ejerce su efecto anticoagulante a través de un mecanismo mediado por AT. Cabe señalar que en estos ensayos estarían actuando ambos efectos juntos (inhibición directa y potenciación de AT), por lo que la magnitud de cada uno de ellos por separado no puede estimarse.

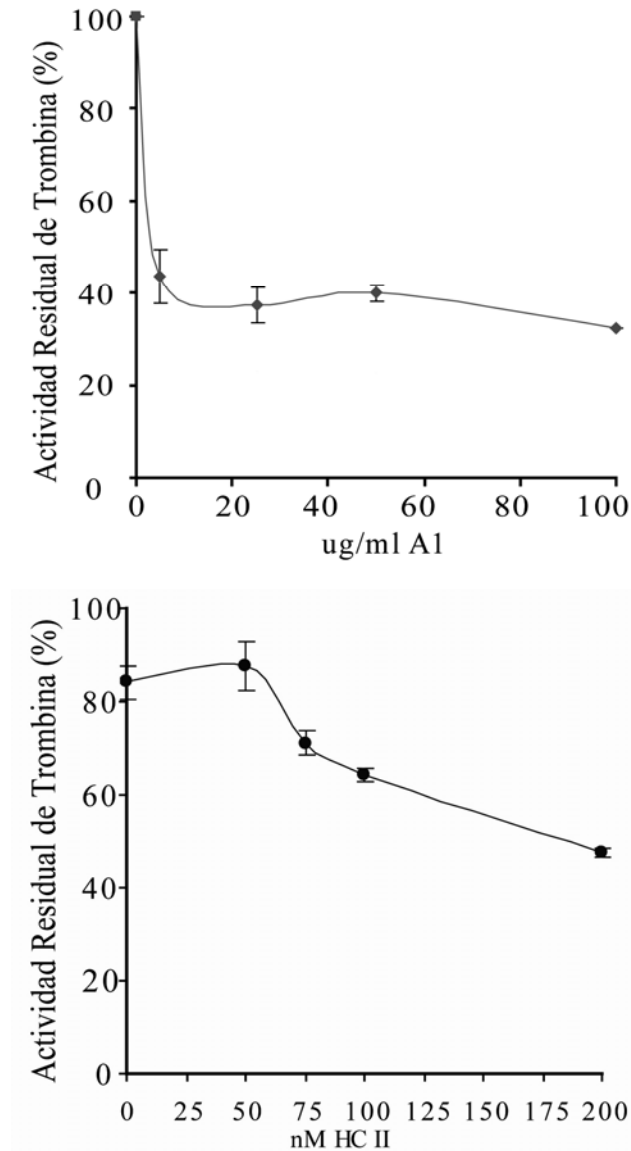




**Figura 11**– Efecto de A1 sobre la actividad de la trombina bovina sobre el sustrato S-2238, en presencia de AT. Arriba: con concentraciones crecientes de A1 y AT 200 nM. Abajo: con concentraciones crecientes de AT y A1 constante (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Los valores de la curva (media  $\pm$  DE) representan el porcentaje de la correspondiente absorbancia (a 405 nm) respecto de la absorbancia del control (100%; trombina + AT + buffer).

### 3.6.2. Inhibición de trombina mediada por HCII

En presencia del cofactor II de la heparina, la actividad amidolítica de la trombina humana disminuyó en forma significativa por efecto de A1 (**Figura 12**). Este efecto mostró ser dependiente de la concentración del polisacárido (5-100  $\mu\text{g/ml}$ ) para una determinada concentración de HCII (200 nM). Por otro lado, el efecto también varió al mantener fija la concentración de A1 (5  $\mu\text{g/ml}$ ) y variar la de HCII (50-200 nM). Estos resultados permiten afirmar que además de la inhibición directa y mediada por AT, el arabinano sulfatado de *Codium vermilara* ejerce su efecto anticoagulante a través de un mecanismo mediado por HCII. También en este caso puede suponerse que actúan tanto la inhibición directa como la potenciación de HCII, por lo que la magnitud de cada efecto por separado no puede estimarse.



**Figura 12** - Efecto de A1 sobre la actividad de la trombina humana sobre el sustrato S-2238, en presencia de HCII. Arriba: con concentraciones crecientes de A1 y HCII 200 nM. Abajo: con concentraciones crecientes de HCII y A1 constante (5  $\mu\text{g/ml}$ ). Los valores de la curva (media  $\pm$  DE) representan el porcentaje de la correspondiente absorbancia (a 405 nm) respecto de la absorbancia del control (100%; trombina + HCII + buffer).

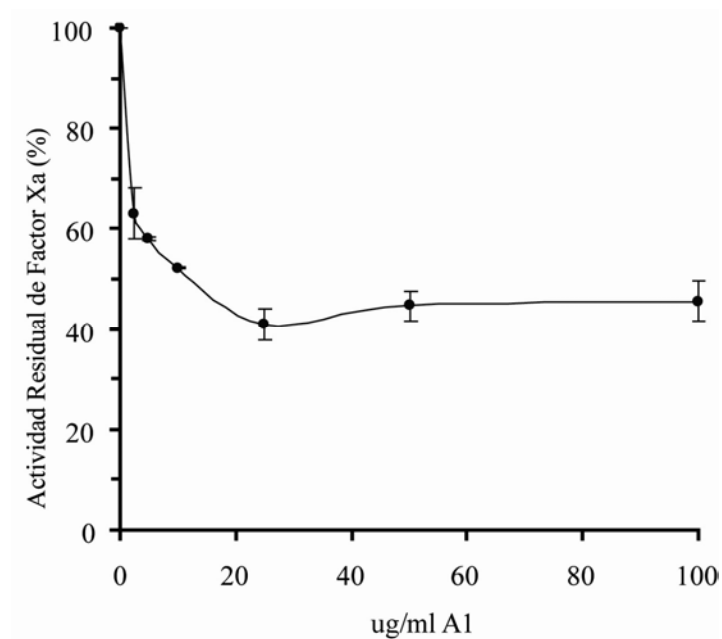
### 3.7. Ensayos amidolíticos con Factor Xa para detectar inhibición directa

Se realizaron ensayos amidolíticos usando sustrato cromogénico S-2222. De modo similar a lo descrito para los ensayos con trombina y sustrato S-2238, la enzima actúa sobre el sustrato liberando un cromóforo cuya presencia puede detectarse y cuantificarse



midiendo la absorbancia de la solución a una determinada longitud de onda (405 nm). En estas condiciones, una mayor absorbancia debida a una mayor concentración del cromóforo se interpreta como señal de una mayor actividad de la enzima. Una menor absorbancia, por el contrario, indica que dicha actividad se encuentra inhibida.

Los ensayos con Factor Xa mostraron que A1 produce una disminución importante de la actividad amidolítica de la enzima, en forma dependiente de la concentración (**Figura 13**). Esto indicaría que el polisacárido actúa en forma directa sobre el Factor Xa, inhibiendo su capacidad para unirse y/o clivar al sustrato S-2222.



**Figura 13** - Efecto de A1 sobre la actividad del Factor Xa sobre el sustrato S-2222. Los valores de la curva (media  $\pm$  DE) representan el porcentaje de la correspondiente absorbancia (a 405 nm) respecto de la absorbancia del control (100%; FXa + buffer).

## **Resumen de los resultados 2° Parte:**

-A1 mostró una importante actividad anticoagulante a través de cuatro mecanismos, en forma dependiente de la concentración:

- inhibición directa de trombina
- inhibición directa de Factor Xa
- potenciación de AT
- potenciación de HCII

Se profundizó el análisis del primero de estos mecanismos.

-La inhibición directa de trombina se relacionaría con cambios en la geometría de la tríada catalítica producidos por la unión del polisacárido al exosítio 2 de la enzima. Por el contrario, la unión al exosítio 1 no provocaría alteraciones importantes.

-Los cambios en la geometría del sitio activo son mayores en el caso de la trombina bovina que en el de la humana. Esta diferencia se observó también en los porcentajes de inhibición alcanzados con ambas enzimas en los ensayos amidolíticos.

-La actividad de A1 sobre la trombina se debe al alto grado de sulfatación por predominio de unidades disulfatadas, y particularmente a las interacciones establecidas por los grupos sulfato en posición C-2 sobre las unidades de arabinopiranosas.

-En el mismo sentido, se observó que A2, con menor contenido de sulfato y diferente patrón de sulfatación tiene menor efecto sobre la trombina. El producto de desulfatación A1D, por su parte, no presenta actividad.

## **VISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

**Hemostasia, trombosis y polisacáridos sulfatados como alternativa.**

La hemostasia es el mecanismo fisiológico que regula el sangrado, a fin de evitar la pérdida excesiva de sangre, mientras que la trombosis como proceso patológico representa una respuesta fisiológica excesiva que conlleva graves consecuencias debido a la formación de trombos en la circulación arterial (Pinto et al., 2010). La trombosis constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad a nivel mundial, y algunos glicosaminoglicanos, fundamentalmente la heparina y sus derivados, se encuentran entre las drogas de uso más difundido en las terapias antitrombóticas (Melo et al., 2004). No obstante, la heparina puede inducir varios efectos colaterales perjudiciales, como trombocitopenia, embolismo arterial y complicaciones por sangrado además de otras relacionadas con su origen animal, como enfermedades priónicas (Kelton & Warkentin, 2008). Eso explica el interés en el desarrollo de nuevas drogas anticoagulantes, y en particular de inhibidores directos de trombina. Varios inhibidores directos de trombina se encuentran actualmente disponibles o en diversos estadios de desarrollo: hirudina (un péptido que se encuentra en la saliva de las sanguijuelas), bivalirudina (un péptido sintético similar al anterior), argatroban (sintético, derivado de L-arginina) y melagatran (un pequeño péptido sintético), entre otros (Di Nisio et al., 2005). Otra estrategia apunta al desarrollo de inhibidores de Factor Xa, tanto directos como indirectos, debido a la posición clave de esta enzima en la serie de reacciones que forman parte del proceso de coagulación.

Se ha investigado y reportado la actividad anticoagulante de polisacáridos sulfatados de algas rojas y pardas, y en menor grado, de algas verdes (Ciancia et al., 2010). Las notorias diferencias en los mecanismos de acción encontrados pueden atribuirse a la diversidad de estructuras y al hecho de que un mismo compuesto puede tener actividad sobre más de una proteasa. Estas diferencias ponen de relieve la importancia del conocimiento de las características estructurales específicas de estos compuestos y de su interacción con las diferentes proteínas involucradas en el proceso de coagulación para la comprensión de dicho proceso y el desarrollo de nuevos agentes antitrombóticos (Ansell, 2007; Pinto et al., 2010).

Varias especies del género *Codium* sintetizan polisacáridos sulfatados con actividad anticoagulante (Jurd et al., 1995). La actividad de los compuestos aislados de especies

de *Codium* fue en general atribuida a la potenciación de AT y/o HCII, mientras que no se ha reportado el efecto directo sobre los sitios catalíticos de la trombina ni el FXa (Shanmugam y Mody, 2000). Un proteoglicano de *Codium pugniformis* mostró inhibición de trombina tanto directa como mediada por AT (Matsubara et al., 2000). Por otro lado, polisacáridos sulfatados de especies de *Codium* con inhibición de trombina dependiente de HCII exhibieron mayor efectividad que la heparina o el dermatán sulfato. Dicho efecto fue más potente en el caso de arabinanos sulfatados que en el de galactanos sulfatados (Hayakawa et al., 2000). Se obtuvieron arabinanos sulfatados a partir de *C. divaricatum*, *C. adharence*, *C. latum*, y *C. fragile* (con una razón molar sulfato/arabinosa, entre 0,5 y 0,8), y se analizó su actividad anticoagulante, pero sin determinar detalles estructurales (Hayakawa et al., 2000). Shanmugam y Mody (2000) también resaltan que entre los polisacáridos obtenidos de las especies *C. dwarkense* y *C. tomentosum* los arabinanos sulfatados fueron los más activos. En *Codium dwarkense*, la actividad fue atribuida a un arabinano sulfatado (Shanmugam et al., 2001), y su incremento se relacionó con las etapas reproductivas del alga, cuando la fracción de polisacáridos sulfatados solubles en agua se encuentra enriquecida en azúcares y sulfato y con menor contenido de proteínas y ácidos urónicos. En el caso de *Codium fragile* ssp. *atlanticum* se observó que la actividad es directamente proporcional al contenido de carbohidratos y sulfato e inversamente proporcional al contenido de proteínas (Rogers et al., 1990). Por otro lado, la mayor actividad se encontró en los componentes de mayor peso molecular. La formación del complejo polisacárido sulfatado/proteína implicada en estos mecanismos fue atribuida a interacciones polares no específicas entre los grupos cargados negativa y positivamente en el polisacárido y la proteína, respectivamente. Este complejo sería luego estabilizado por interacciones de corto rango (Ciancia et al., 2010).

### **Inhibición directa de trombina.**

En este contexto, se encaró el estudio de la actividad anticoagulante de A1 con el objetivo de dilucidar sus mecanismos de acción. Los mecanismos encontrados fueron: potenciación de los inhibidores fisiológicos de la coagulación antitrombina y cofactor II de la heparina, inhibición directa de Factor Xa e inhibición directa de trombina. En el último caso se realizaron análisis adicionales con el objetivo de profundizar la comprensión de la relación estructura-actividad. Esto fue posible gracias al detallado

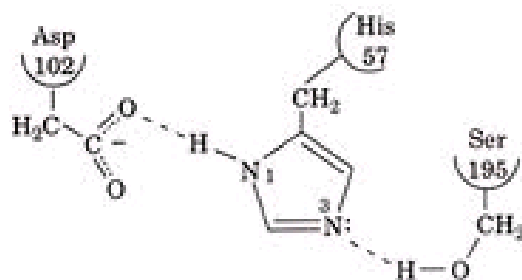
estudio estructural del polisacárido, cuyos resultados se encuentran expuestos en la 1° Parte-A de esta tesis. Muchos trabajos destacan la importancia de analizar las relaciones entre estructura y actividad (Pereira et al., 2002; Melo et al., 2004; Becker et al., 2007; Fonseca et al., 2009). La combinación del análisis estructural con ensayos de actividad anticoagulante es un enfoque fundamental en este campo.

La prolongación del TTPA observada sugiere un efecto inhibitorio sobre la vía intrínseca y/o común de la coagulación, mientras que el Tiempo de Trombina fuertemente extendido indica inhibición de trombina (directa o mediada por AT y/o HCII) o algún impedimento en la polimerización de la fibrina. Con la idea de dilucidar, al menos en parte, cuál sería el mecanismo anticoagulante más probable en A1, se llevó a cabo el ensayo tipo TT usando fibrinógeno purificado en lugar de plasma. Este tipo de ensayo ya fue usado anteriormente para indagar el modo de acción de otros polisacáridos sulfatados con efecto anticoagulante (Shanmugam y Mody, 2000). En este caso también se observó una prolongación en el tiempo de coagulación, siendo éste el primer indicio de un posible mecanismo de inhibición directa sobre la actividad de la trombina, teniendo en cuenta que los inhibidores fisiológicos AT y HCII no estaban presentes en el ensayo. Los ensayos amidolíticos en ausencia de AT y HCII confirmaron esa posibilidad, ya que se obtuvo una importante disminución en la actividad residual de trombina con A1. La inhibición directa de trombina fue determinada experimentalmente tanto para la trombina humana como para la bovina, siendo el efecto considerablemente mayor en el último caso.

Estos resultados se complementan con el análisis de simulación de la dinámica molecular. Para este análisis se trabajó con octasacáridos formados por unidades de arabinopiranososa en su forma más abundante ( ${}^4C_1$ ) disulfatadas y sin sulfatar ([L-Arap2,4S-(1→3)-L-Arap2,4S]<sub>4</sub> y [L-Arap-(1→3)-L-Arap]<sub>4</sub>, respectivamente). Ambas trombinas, humana y bovina, fueron modeladas sin complejar, y complejadas con cada uno de los octasacáridos en los exositos 1 y 2 de la enzima.

En el caso del exosito 1, la unión con los oligosacáridos de arabinosa no produce modificaciones significativas en la estructura de la enzima. Respecto del exosito 2, los oligosacáridos adoptan un arreglo espacial sobre la superficie de la trombina similar a lo observado con la heparina (Li et al., 2004). La unión del octasacárido con unidades

disulfatadas al exosito 2 de ambas enzimas (TH y TB) afecta la flexibilidad de varias regiones de la proteína. En particular, la región entre los residuos 66 y 77, cercana al sitio activo, ve aumentada su flexibilidad. Como consecuencia de esto, aumenta la distancia ente los grupos laterales de los residuos His 57 y Asp 102 de la tríada catalítica. El sitio activo de la trombina (y de otras serín proteasas como la elastasa y la quimotripsina) se conforma por plegamiento de la proteína e interacciones tipo puente de hidrógeno entre cadenas laterales. La tríada catalítica está compuesta por los residuos Asp 102, His 57 y Ser 195. La formación de un puente de hidrógeno entre el aspartato y la histidina induce a esta última a tomar un protón de la serina (**Figura 13**). De este modo un grupo normalmente no reactivo (el CH<sub>2</sub>OH de la serina) se torna activo, con la posibilidad de formar un enlace covalente con el sustrato de la enzima e hidrolizar un enlace peptídico.



**Figura 13-** Tríada catalítica de la trombina. La formación de un puente de hidrógeno ente el aspartato 102 y la histidina 57 provoca la activación de la serina 195.

Se observó entonces que el arabinano produce una alteración de la tríada catalítica del sitio activo, y que dicho efecto es de mayor magnitud en la trombina bovina que en la humana. Esta alteración de la geometría del sitio activo, vía interacción con el exosito 2, podría explicar la disminución de la actividad enzimática sobre el fibrinógeno y sobre el sustrato cromogénico observada en los ensayos globales de coagulación y amidolíticos, y atribuida a un mecanismo de inhibición directa de la trombina. Estos resultados van en sentido contrario a lo planteado por Shanmugam y Mody (2000), quienes sostienen que en los casos en los que se ha detectado cierto grado de inhibición directa de la trombina por polisacáridos sulfatados, ésta se debería a que los polímeros ocupan el sitio de unión al fibrinógeno (es decir, el exosito 1), dificultando la acción de la trombina que lo convierte en fibrina. Por otro lado, un mecanismo de inhibición no

competitivo como el aquí planteado explica además que no se alcance la inhibición total de la actividad de la enzima, tal como se observa en los resultados de los ensayos amidolíticos.

### **Interacción trombina-polisacárido.**

No obstante el mayor efecto observado sobre la trombina bovina, la interacción ente el arabinano sulfatado y la trombina humana fue estudiada en mayor detalle debido a su potencial interés para la salud humana.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas mostró la formación de un complejo estable entre A1 y la trombina humana, al menos en las condiciones experimentales usadas, al observarse cambios en los patrones de migración del polisacárido y la proteína. Al incubar ambos compuestos, se visualizó una banda que los contiene a ambos, lo que puede apreciarse gracias a la tinción en paralelo con azul de *O*-Toluidina y azul de Coomasie. Por el contrario, cuando la electroforesis se realizó en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) no se visualizó la banda correspondiente al complejo. Estos resultados sugieren la formación de un complejo A1-TH por medio de interacciones que lo estabilizan y permiten su observación en PAGE nativo. Sin embargo, estas interacciones no serían lo suficientemente fuertes como para resistir las condiciones del SDS-PAGE, como sí lo podrían hacer enlaces covalentes entre ambas moléculas.

Adicionalmente, la unión de A1 a la trombina humana fue evaluada por los cambios en sus espectros de fluorescencia intrínseca. El agregado del ligando (A1) indujo un corrimiento y un incremento en la emisión de la enzima. Se calculó una  $K_d$  de  $17 \pm 3$   $\mu\text{M}$  a partir de un modelo de unión cooperativo. Finalmente, el espectro de dicroísmo circular del complejo A1-TH sugiere que la unión del ligando induce un pequeño cambio conformacional en la enzima, aunque en rigor no puede descartarse la posibilidad de que las diferencias observadas podrían deberse a cambios en el polisacárido debidos a la unión con la enzima.

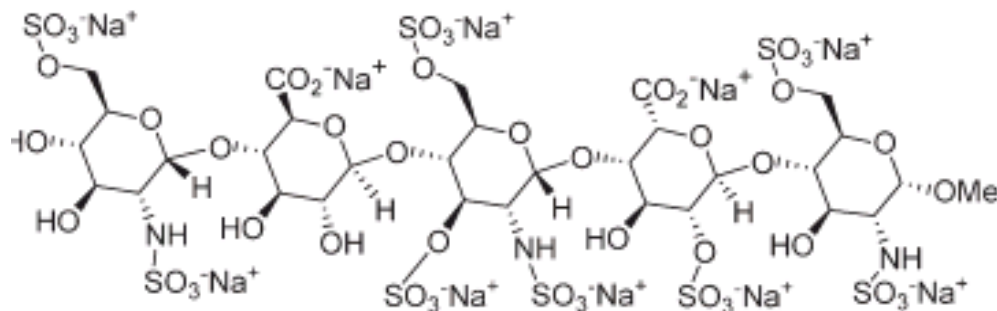
Se ha reportado anteriormente inhibición directa de trombina para otros polisacáridos sulfatados de algas: fucanos muy ramificados de algas pardas (Pereira et al., 1999),



ulvanos de *Ulva conglobata* (Mao et al., 2006) y galactanos y proteoglicanos de otras especies de *Codium* (Matsubara et al., 2000; 2001). En estos casos, sin embargo, no hay disponible información detallada acerca de los mecanismos de acción a nivel molecular. Los inhibidores directos de trombina (DTIs, por sus siglas en inglés) actualmente disponibles bloquean la interacción de la enzima con sus sustratos uniéndose al sitio activo y el exosito 1 (DTIs bivalentes) o sólo al sitio activo (DTIs univalentes) (DiNisio, 2005). Por otro lado, la heparina interactúa con el exosito 2 de la trombina, pero sólo es capaz de inhibirla mediante un mecanismo dependiente de AT, mientras que el dermatán sulfato potencia al HCII sin necesidad de unirse a la trombina. El arabinano sulfatado de *C. vermilara* parece actuar por otro mecanismo en su inhibición directa de la trombina, generando modificaciones en el sitio activo a través de interacciones con el exosito 2.

#### **Factor Xa.**

En ensayos con sustrato cromogénico S-2222 (y sin los inhibidores AT y HCII) se observó que en presencia de A1 el Factor Xa también ve disminuida su actividad amidolítica, en forma dependiente de la concentración. De modo similar a lo observado en el caso de la trombina y el sustrato S-2238, no se alcanza la inhibición total de la actividad de la enzima con concentraciones mayores de A1. Esto sugiere que en este caso también podría tratarse de un mecanismo de inhibición no competitivo. El FXa está compuesto por dos cadenas unidas por un puente disulfuro (Kamata et al., 1998) y desempeña un rol clave en la regulación de la generación de trombina: de acuerdo al modelo tradicional de la cascada de coagulación, en él convergen las vías extrínseca e intrínseca y se inicia la vía común. La activación de una molécula de FX tiene como resultado el surgimiento de mil moléculas de trombina (Ansell, 2007). Esto explica el potencial y atractivo del FXa como blanco para anticoagulantes específicos, en una estrategia de desarrollo de drogas que ha demostrado ser efectiva y segura (Pinto et al., 2010). Los inhibidores de FXa de aplicación parenteral (como el fondaparinux, **Figura 14**, que es un pentasacárido sulfatado, y otros compuestos similares) actúan mediante potenciación de AT. Al igual que sucede en el caso de la trombina, el desarrollo de inhibidores directos permitiría superar limitaciones relacionadas con la dependencia de los inhibidores fisiológicos que no son efectivos contra el FXa unido al complejo protrombinasa ni contra la trombina unida a fibrinógeno.



**Figura 14-** Estructura del fondaparinux

Algunos polisacáridos sulfatados de algas y otros organismos producen inhibición del FXa mediante potenciación de AT, generalmente en combinación con otros mecanismos anticoagulantes: un galactano del alga roja *Gelidium crinale*, fucoidanos de algas pardas, ulvanos y ramnanos de algas verdes (Ciancia et al., 2010) un proteoglicano de *Codium fragile* (Jurd et al., 1995), galactanos y fucanos de invertebrados marinos (Pereira et al, 2002).

El sitio de unión al sustrato del FXa está determinado por los subsitios S1 y S4 y sus residuos vecinos. Los ligandos que más fuertemente se unen a esta enzima lo hacen interactuando con ambos subsitios (Pinto et al., 2010). El carácter hidrofóbico de S1 y S4 sugiere que la inhibición directa que provoca el arabinano fuertemente negativo debería involucrar otro tipo de interacciones con otros fragmentos de la enzima, que probablemente originen modificaciones en el sitio activo. La estructura terciaria del FXa es sensible a interacciones alostéricas inter- e intradominio, y la conformación de su sitio activo puede verse alterada por cambios estructurales que se producen en otros dominios, (Husten et al., 1987). En el caso del inhibidor directo DX-9065a (sintético, de bajo peso molecular), Brandstetter y colaboradores (1996) encontraron que la formación del complejo con FXa involucra interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que se ven acompañadas por cambios de conformación locales en el sitio activo. Por otro lado, en la cadena liviana del FXa se ubica el dominio Gla, una zona de modificaciones post-traduccionales que media la unión al fosfolípido de membrana cargado negativamente (necesaria para la formación del complejo protrombinasa), en presencia de iones de calcio (Kamata et al., 1998).

### **Potenciación de antitrombina y cofactor II de heparina.**

Además de la inhibición directa de trombina y Factor Xa, se encontró potenciación de los inhibidores fisiológicos AT y HCII, en ensayos amidolíticos con trombina como enzima proteolítica. La potenciación de AT parece depender del peso molecular y/o el contenido de sulfato, mientras que en el caso del HCII lo hace de la densidad de cargas (Shanmugam y Mody, 2000). La importancia relativa de estos efectos de A1 no pudo ser claramente establecida, dado que en ambos casos los mecanismos de inhibición directa y mediada estarían actuando juntos en los ensayos amidolíticos.

La heparina ejerce su acción por medio de dos mecanismos: produce la activación conformacional de la AT gracias a una secuencia específica de cinco unidades y en segundo lugar hace de puente entre la AT la trombina (Streusand et al., 1995). Este último mecanismo no depende de una determinada secuencia sino de la estructura tridimensional y el volumen de la cadena. Para un galactano sulfatado de algas rojas se propuso que la potenciación de AT se daría por un mecanismo del tipo del segundo descrito, ya que no se observan cambios en el espectro de fluorescencia de la AT al agregar el polisacárido, como ocurriría de estar actuando el mecanismo de activación conformacional (Pereira et al., 2002).

### **Relación estructura-actividad**

Con el objetivo de indagar en la relación entre estructura y actividad, se compararon los resultados de los ensayos de TTPA y TT realizados con A1, A2 y A1D (**Tabla 3**). Estos ensayos mostraron, en primera instancia, que los arabinanos menos sulfatados son menos activos. Sin embargo, A2 no sólo tiene un menor contenido total de sulfato, si no que en su patrón de sulfatación predominan las unidades monosulfatadas en C-4 (y no las disulfatadas en C-2 y C-4 como en el arabinano 1). Su menor actividad, por lo tanto, estaría relacionada con esta característica estructural, teniendo en cuenta que el análisis de la unión carbohidrato-enzima mostró que las interacciones más fuertes con el exosítio 2 se producen a través de los grupos sulfatos en posición C-2. En cuanto a A1D, la interacción con la trombina resultaría demasiado débil como para producir cambios en la actividad de la enzima. Estas diferencias podrían vincularse con las intensidades de la energía de interacción entre las moléculas de trombina y los distintos

polisacáridos y a las diferentes orientaciones que adoptan las cadenas de arabinano con unidades di-, monosulfatadas y no sulfatadas en relación a la trombina. Se ha reportado previamente que la actividad anticoagulante de los polisacáridos no es consecuencia solamente del contenido de sulfato sino también del patrón de sulfatación (Melo et al., 2004; Ciancia et al., 2010). Uchiyama y colaboradores (1990) mostraron que la sobresulfatación de la heparina no sólo no incrementaba su actividad sino que la disminuía notablemente, posiblemente debido a la presencia de grupos sulfato en posiciones que naturalmente no se encuentran sustituidas en la molécula original. La existencia de un par de grupos sulfato vecinos sobre unidades disulfatadas parece ser determinante para la actividad anticoagulante de estos polímeros (Ciancia et al., 2010). La potente actividad anticoagulante de un galactano sulfatado del alga roja *Botryocladia occidentalis* fue atribuida a la presencia de unidades sulfatadas en C-2 y C-3, que corresponden a un tercio del total (Farias et al., 2000). Pereira y colaboradores (2002) evaluaron la actividad de una serie de fucanos de invertebrados marinos y encontraron que ésta se incrementaba a medida que aumentaba la proporción de unidades disulfatadas en las posiciones C-2 y C-4. En el caso de estos fucanos, la actividad está mediada por AT, y los autores consideran que los residuos de fucosa sulfatados en C-2 y C-4 son el “motivo amplificador” del efecto observado. De modo similar, y teniendo en cuenta las diferencias observadas para A1 y A2, puede pensarse que las unidades de arabinopiranosas disulfatadas en C-2 y C-4 son las principales responsables de la actividad anticoagulante en este caso.

Recientemente, Fonseca y colaboradores (2009) compararon la actividad de dos compuestos que comparten la misma unidad estructural de fucosa sulfatada en C-2 y C-4 pero en diferente ubicación. Por un lado, un fucano sulfatado de PM >100 kDa donde dicha unidad es parte del tetrasacárido repetitivo de una cadena lineal con enlaces  $\alpha$ -L-(1→3), mientras que en el condroitín sulfato fucosilado (40 kDa) está en los extremos no reductores de cadenas laterales. Encontraron diferencias en los mecanismos por los cuales actúan, ya que el primer compuesto produce potenciación sobre AT y HCII, y el segundo sólo sobre HCII, además de presentar ambos un mecanismo no dependiente de los inhibidores fisiológicos de serín proteasas. Los requerimientos estructurales para esta actividad son estereoespecíficos, sostienen los autores, e involucran tanto a los enlaces como a la posición de los grupos sulfato. Mientras las unidades disulfatadas en C-2 y C-4 definirían la actividad mediada por AT, el grupo sulfato en posición 4 sería

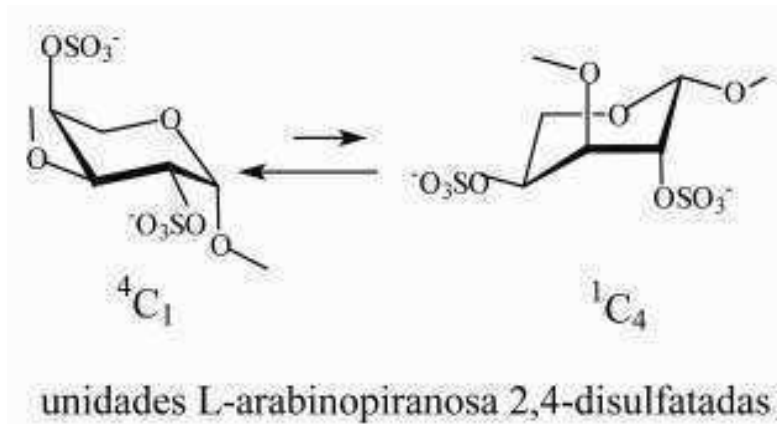
responsable de la potenciación de HCII, y las unidades monosulfatadas en C-2 tendrían un efecto deletéreo (Fonseca et al., 2009). En el caso del arabinano sulfatado de *Codium vermilara*, aunque la presencia de unidades disulfatadas también parece ser determinante de la actividad, los grupos sulfato ubicados en C-2 serían los responsables de las principales interacciones con la trombina.

Las interacciones entre polisacáridos sulfatados y proteínas ocurren a distintos niveles de especificidad (Mulloy, 2005). Pueden unirse inespecíficamente a través de sus zonas cargadas negativas y positivas en interacciones de poca significación fisiológica, o de modo muy específico a través de subestructuras de los polisacáridos que interactúan con proteínas particulares. Ejemplos de esto último serían el patrón de sustitución del dermatán sulfato que permite su unión al HCII, el pentasacárido de la heparina con alta afinidad por la AT y los fucanos que impiden la fecundación interespecífica en equinodermos marinos. Las diferencias en la estructura del polisacárido y el patrón de sulfatación determinan un cierto espaciado entre los grupos sulfato que es el adecuado para los intervalos entre residuos de aminoácidos básicos de una cierta proteína (Pereira et al., 2002). De este modo, las interacciones específicas polisacárido-proteína están determinadas por la complementariedad superficial y de cargas entre ambas moléculas (Raman et al., 2003). Por último, un grado intermedio de especificidad se ha encontrado en el heparán sulfato, un glicosaminoglicano presente en superficies celulares, sobre el cual distintos patrones de sulfatación tridimensionales (y no de secuencia) determinan afinidades variables hacia distintos factores de crecimiento y morfógenos (Mulloy, 2005).

La mayor parte de las actividades biológicas de los polisacáridos sulfatados se inicia con la formación de un complejo proteína-polisacárido a través de interacciones electrostáticas no específicas (Olson et al., 1991) entre zonas con grupos cargados negativamente en el polisacárido y zonas con aminoácidos básicos en la proteína (Margalit et al., 1993). Una vez comenzada la interacción, ambas zonas de unión se reordenan de forma tal que los grupos que interactúan encuentren la disposición adecuada. De este modo, las disposiciones espaciales óptimas son alcanzadas mediante adaptaciones conformacionales mutuas entre las moléculas de ambos compuestos. Respecto del polisacárido, las adaptaciones pueden consistir en cambios en la configuración de los ciclos y/o en los ángulos de torsión de los enlaces glicosídicos.

Esto incluye la formación de pliegues en la cadena de oligo o polisacárido que aumentan la complementariedad superficial con la zona de unión sobre la proteína; esto se observó, por ejemplo, para la unión de oligosacáridos derivados de la heparina a la antitrombina (Raman et al., 2003). Finalmente, el complejo es estabilizado mediante interacciones de rango corto: puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas (Raman et al., 2003). En el caso de A1, la presencia de grandes cantidades de grupos sulfato y un esqueleto de carbohidratos con unidades estructurales capaces de adoptar conformaciones óptimas para posicionarse e interactuar con los grupos básicos de proteínas sugiere la existencia de sitios de unión a proteína y posibilita su actividad biológica.

Tanto la naturaleza de los enlaces glicosídicos como el patrón de sulfatación influyen en la conformación de los compuestos (y de las unidades que los forman, en primera instancia), no sólo por la posición que ocupan los sustituyentes sino según se dispongan éstos en forma axial (a) o ecuatorial (e). Polisacáridos de pared como los glucanos y xilanos poseen enlaces  $\beta$ -(1e→4e) y unidades en forma de silla  ${}^4C_1$  que determinan una conformación tipo cinta, mientras que aquellos con enlaces  $\beta$ -(1e→3e) entre galactosa o glucosa y  $\alpha$ -(1a→3e) entre glucosa se disponen como hélices (Ciancia et al., 2010). De este modo, estos polímeros se comportan como moléculas ordenadas, cuya forma extendida facilita la exposición de zonas de unión y el contacto con otras macromoléculas. A diferencia de ellos, los glucanos con uniones  $\beta$ -(1→2) o  $\beta$ -(1→6) tienen una mayor libertad de rotación alrededor de sus enlaces, lo que dificulta que adopten disposiciones ordenadas, aunque la presencia de grupos sulfato puede hacer que estas moléculas se extiendan debido a la repulsión entre las cargas. En el arabinano sulfatado de *Codium vermilara* tanto la silla de forma  ${}^4C_1$  (enlace  $\beta$ -(1a→3e)) como la  ${}^1C_4$  (enlace  $\beta$ -(1e→3a)) de las unidades predominantes disulfatadas en C-2 y C-4, tienen un grupo sulfato en posición axial y uno en posición ecuatorial (**Figura 15**), por lo cual son similares en términos de energía, y se encuentran en equilibrio. Por el contrario, las unidades sin sustituir o monosulfatadas ven desplazado ese equilibrio hacia la forma  ${}^4C_1$ .



**Figura 15-** Equilibrio entre las conformaciones  ${}^4C_1$  y  ${}^1C_4$  de la  $\alpha$ -L-arabinopiranososa disulfatada en C-2 y C-4.

Como resultado, la cadena de L-arabinano sulfatado unido por enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) adoptaría una conformación tipo hélice, extendida a causa de la repulsión entre los sulfatos y donde la flexibilidad del enlace estaría restringida por los grupos sulfato ecuatoriales adyacentes a la unión y los grupos sulfato axiales adyacentes al oxígeno glicosídico. Esta forma posibilitaría las interacciones involucradas en los mecanismos de actividad anticoagulante descritos para el polímero.

### **Perspectiva.**

El mecanismo de inhibición directa de trombina propuesto en esta tesis para A1 (es decir, interacción con el exosito 2 que altera el sitio activo sin mediación de AT) resulta novedoso y podría ser de interés en el contexto del desarrollo de nuevas drogas y estrategias antitrombóticas que tienen a la trombina como blanco. Lo mismo puede decirse acerca de la potenciación de AT y HCII y la inhibición directa de FXa. La profundización en el estudio de estos mecanismos podría aportar resultados interesantes en el marco de la comprensión de las relaciones entre estructura y actividad.

## **BIBLIOGRAFÍA**



Ansell J. 2007. "Factor Xa or thrombin: is factor Xa a better target?" *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(1):60-64.

Baglin T.P, Carrell R.W., Church F.C., Esmon C.T. y Huntington J.A. 2002. "Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(17):11079-11084.

Becker C.F., Guimarães J.A., Mourão P.A.S. y Verli H. 2007. "Conformation of sulfated galactan and sulfated fucan in aqueous solutions: implications to their anticoagulant activities" *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26:391-399.

Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A. y Haak J.R. 1984 "Molecular dynamics with coupling to an external bath" *Journal of Chemical Physics* 81, 3684-3690.

Berg J.M., Stryer L. y Tymoczko L. 2007. "Biochemistry" 6° edición, Freeman and Company, Nueva York, EE.UU.

Bock P.E, Panizzi P. y Verhamme M.A. 2007. "Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions" *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5(1):81-94.

Bode W. 2006 . "Structure and interaction modes of thrombin" *Blood Cells, Molecules and Diseases* 36:122-130.

Bode W., Mayr I., Baumann U., Huber R., Stone S.R. y Hofsteenge J. 1989. "The refined 1.9Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment" *EMBO Journal* 8:3467-3475.

Brandstetter H., Kühne A., Bode W., Huber R., von der Saal W., Wirthensohn K. y Engh N.A. 1996. "X-ray structure of active site-inhibited clotting Factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition" *Journal of Biological Chemistry* 271(47):29988-29992.

Brozovic M. 1991. En: J.V. Dacie, S.M. Lewis (Eds.), Practical Haematology, Churchill Livingstone, Edinburgh, England, pp. 279–292.

Bussi G., Donadio D. y Parrinello M. 2007. “Canocnical sampling through velocity rescaling” Journal of Chemical Physics 126:014101.

Cardozo K.H.M., Guaratini T., Barros M.P., Falcão V.R., Tonon A.P., Lopes N.P., Campos S., Torres M.A., Souza A.O., Colepicolo P. y Pinto E. 2007. “Metabolites from algae with economical impact” Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 146 60–78.

Carrell R., Skinner R., Wardell M. y Whisstock J. 1995. “Antithrombin and heparin” Molecular Medicine Today 1(5): 226-231.

Ciancia M., Quintana I. y Cerezo A.S. 2010. “Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweed in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds”. Current Medicinal Chemistry 17(23): 2503-2529.

Ciancia M., Quintana I., Vizcargüénaga M.I., Kasulin L., de Dios A., Estevez J.M. y Cerezo A.S. 2007. “Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis” International Journal of Biological Macromolecules 41:641–649.

Colliec S., Fischer A.M., Tapon-Breaudiere J., Boisson C., Durand P. y Jozenfovcz J. 1991. “Anticoagulant properties of a fuciodan fraction” Thrombosis Research 64:143-154.

Costa L.S., Fidelis G.P., Cordeiro S.L., Oliveira R.M., Sabry D.A., Câmara R.B.G., Nobre L.T.D.B., Costa M.S.S.P., Almeida-Lima J., Farias E.H.C., Leite E.L. y Rocha H.A.O. 2010. “Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds” Biomedicine & Pharmacotherapy 64:21–28.

Darden T., York D. y Pedersen L. 1993. “Particle mesh Ewald: an  $W \log(N)$  method for Ewald sums in large systems” Journal of Chemical Physics 98:10089-10092.

Deacon-Smith R.A., Lee Potter J.P. y Rogers D.J. 1985. "Anticoagulant activity in extracts of British marine algae" *Botanica Marina* 28:333-338.

Di Cera E., Dang Q.D. y Ayala Y.M. 1997. "Molecular mechanisms of thrombin function" *Cellular and Molecular Life Sciences* 53:701-730.

Di Nisio N., Middeldorp S. y Büller H.R. 2005. "Direct thrombin inhibitors" *New England Journal of Medicine*, 353:1028-40.

Fareed J., Walenga J.M., Svendsen L.G. y Bermes EW Jr. 1986. "Coagulant versus amidolytic properties of human and bovine thrombins: implications in standardization and diagnostic usage" *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 12:310-317.

Farias W.R.L., Valente A.P., Pereira M.S. y Mourão P.A.S. 2000. "Structure and anticoagulant activity of sulfated galactans. Isolation of a unique sulfated galactan from the red algae *Botryocladia occidentalis* and comparison of its anticoagulant action with that of sulfated galactans from invertebrates" *Journal of Biological Chemistry* 275:29299-29307.

Fernandes C.L., Sachett L.G., Pol-Fachin L. y Verli H. 2010. "GROMOS96 43a1 performance in predicting oligosaccharide conformational ensembles with glycoproteins" *Carbohydrate Research* 345:663-671.

Fonseca R.J.C., Santos G.R.C. y Mourão P.A.S. 2009. "Effect of polysaccharides enriched in 2,4-disulfated fucose units on coagulation, thrombosis and bleeding" *Thrombosis and Haemostasis* 103:829-836.

Freifelder D. 1981. "Técnicas de bioquímica y biología molecular" Ed. Reverté, Barcelona, España.

Gray E., Mulloy B. y Barrowcliffe T.W. 2008. "Heparin and low-molecular-weight heparin" *Thrombosis and Haemostasis* 99:807-818.

Hayakawa Y., Hayashi T., Lee J., Srisomporn P., Maeda M., Ozawa T. y Sakuragawa N. 2000. "Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides from green algae" *Biochimica et Biophysica Acta* 1543:86-94.

Hess B., Kutzner C., van der Spoel D. y Lindahl E. 2008. "GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced and scalable molecular simulation" *Journal of Chemical Theory and Computation* 4:435-447

Hess B., Bekker H., Berendsen H.J.C., Fraaije J.G.E.M. 1997. "LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations" *Journal of Computational Chemistry* 18:1463-1472.

Hoffman M. y Monroe D.M. 2001. "A cell-based model of hemostasis" *Trombosis and Haemostasis* 85:958-965.

Husten E.J., Esmon C.T. y Johnson A.E. 1987. "The active site of blood coagulation Factor Xa. Its distance from the phospholipid surface and its conformational sensitivity to components of the prothrombinase complex" *Journal of biological Chemistry* 262(27):12953-12961.

Jiao G., Yu G., Zhang J. y Ewart S. 2011. "Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae" *Marine Drugs* 9:196-223.

Jurd K.M., Rogers D.J., Blunden G. y McLellan D.S. 1995. "Anticoagulant properties of sulphated polysaccharides and a proteoglycan from *Codium fragile* ssp. *atlanticum*" *Journal of Applied Phycology* 7:339-345.

Kamata K., Kawamoto H., Honma T., Iwama T. y Kim S. 1998. "Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:6630-6635.

Kelton J.G. y Warkentin T.E. 2008. "Heparin-induced thrombocytopenia: a historical perspective" *Blood* 112:2607-2616.

Kelton J.G. y Hirsh J. 1980. "Bleeding associated with antithrombotic therapy" *Seminars in Hematology* 17:259-291.

Lahaye M. y Robic A. 2007. "Structure and functional properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds" *Biomacromolecules* 8(6):1766-1774.

Laurienzo P. 2010. "Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview" *Marine Drugs* 8:2435-2465.

Li W., Johnson D.J., Esmon C.T. y Huntington J.A. 2004. "Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin" *Natural Structural and Molecular Biology* 11:857-862.

Mao W., Li H., Li Y., Zhang H., Qi X. Y Sun H. 2009. "Chemical characteristic and anticoagulant activity of the sulfated polysaccharide isolated from *Monostroma latissimum* (Chlorophyta)" *International Journal of Biological Macromolecules* 44:70-74.

Mao W., Fang F., Li H., Qi X., Sun H., Chen Y. y Guo S. 2008. "Heparinoid-active two sulfated polysaccharides isolated from marine green algae *Monostroma nitidum*". *Carbohydrate Polymers* 74(4):834-839.

Mao W., Zang X., Li Y. Y Zhang H. 2006. "Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobulata* and their anticoagulant activity" *Journal of Applied Phycology* 18(1):9-14.

Margalit M., Fischer N. y Ben-Sasson S.A. 1993. "Comparative analysis of structurally defined heparin binding sequences reveals a distinct spatial distribution of basic residues" *Journal of Biological Chemistry* 268:19228-19231.

Matsubara K. 2004. "Recent advances in marine algal anticoagulants" *Current Medicinal Chemistry – Cardiovascular & Hematological Agents* 2(1):13-19.

Matsubara K., Matsuura Y., Bacic A., Liao M.L., Hori y Miyazawa K. 2001. "Anticoagulant properties of a sulfated galactan preparation from a marine green alga, *Codium cylindricum*" International Journal of Biological Macromolecules 28:395-399.

Matsubara K., Matsuura Y., Hori J. y Miyazawa K. 2000. "An anticoagulant proteoglycan from the marine alga *Codium pugniformis*" Journal of Applied Phycology 12:9-14.

Melo F.R., Pereira M.S., Foguel D. y Mourão P.A.S. 2004. "Antithrombin-mediated anticoagulant activity of sulfated polysaccharides. Different mechanisms for heparin and sulfated galactans" Journal of Biological Chemistry 279(20):20824-20835.

Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S. y Olson A.J. 2009. "AutoDock 4 and AutoDockTool4: automated docking with selective receptor flexibility" Journal of Computational Chemistry 30:2785-2791.

Mulloy B. 2005. "The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides" Anais da Academia Brasileira de Ciências 77(4):651-664.

Norris L.A. 2003. "Blood coagulation" Best Practice and Research - Clinical Obstetrics and Gynaecology 17(3):369-383.

Olsen, E. 1990. "Métodos ópticos de análisis" Ed. Reverté, Barcelona., España.

Olson S.T., Halvorson H.R. y Björk I. 1991. "Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models" Journal of Biological Chemistry 266: 6342-6352

Pereira M.S., Melo F.R. y Mourão P.A.S. 2002. "Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans?" Glycobiology 12(10):573-580.

Pereira M.S., Mulloy B. y Mourão P.A.S. 1999. "Structure and Anticoagulant Activity of sulfated fucans: comparison between the regular, repetitive, and linear fucans from

- echinoderms with the more heterogeneous and branched polymers from brown algae”  
Journal of Biological Chemistry, 274(12):7656-7667.
- Pinto D.J.P., Smallheer J.M., Cheney D.L., Knaab R.M. y Wexler R.R. 2010. “Factor Xa inhibitors: next-generation antithrombotic agents” Journal of Medicinal Chemistry 53:6243-6274.
- Pol-Fachin L., Serrato R.V. y Verli H. 2010. “Solution conformation and dynamics of exopolysaccharides from *Burkholderia* species” Carbohydrate Research 345:1922-1931.
- Raman R., Venkataraman G., Ernst S., Sasisekaran V. y Sasisekaran R. 2003. “Structural specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of protein” Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 100, 2357-2363.
- Rogers D.J., Jurd K.M., Blunden G., Paoletti S. y Zanetti F. 1990. “Anticoagulant activity of a proteoglycan in extract of *Codium fragile* ssp. *atlanticum*” Journal of Applied Phycology 2:357-361.
- Rossi E.B., Duboscq C.L. y Kordich L.C. 1999. “Cofactor II de la heparina (HCII), un inhibidor de trombina cuyo rol fisiológico no está completamente esclarecido” Medicina 59:95-104.
- Schechter I. y Berger A. 1967. “On the size of the active site in proteases:I. Papain” Biochemical and Biophysical Research Communication 27:157-162.
- Scott W.R.P., Hünenberger P.H., Tironi I.G., Mark A.E., Billeter S.R., Fennen J., Torda A.E., Huber T., Krüger P. y van Gunsteren W.F. 1999. ”The GROMOS biomolecular simulation program package” Journal of Physical Chemistry A 103:3596-3607.
- Shanmugam M., Mody K.H., Oza R.M. y Ramavat B.K. 2001. “Blood anticoagulant activity of green marine algae *Codium dwarkense* (Codiaceae, Chlorophyta) in relation to its growth stages” Indian Journal of Marine Species 30:49-52.

Shanmugam M. y Mody K.H. 2000. "Heparinoid-active sulphated polysaccharides from marine algae as potential food anticoagulant agents" *Current Science* 79(12):1672-1683.

Shuman M.A., Tollefsen D.M. y Majerus P.W. 1976. "The binding of human and bovine thrombin to human platelets" *Blood* 47:43-54.

Siddhanta A.K., Shanmugam M., Mody K.H., Goswami A.M. y Ramabat B.K. 1999. "Sulphated polysaccharides of *Codium dwarkense* Boergs. from the west coast of India : Chemical composition and blood anticoagulant activity" *International Journal of Biological Macromolecules* 26:151-154.

Streusand V.J., Björk I., Gettins P.G.W., Petitou M. y Olson S.T. 1995. "Mechanism of acceleration of antithrombin-proteinase reactions by low affinity heparin: role of antithrombin binding pentasaccharide in heparin rate enhancement" *Journal of Biological Chemistry* 270:9043-9051.

Tollefsen D.M., Pestka C.A. y Monafó W.J. 1983. "Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate" *Journal of Biochemical Chemistry* 258(11):6713-6716.

Uchiyama H., Metori A., Ogamo A. y Nagasawa K. 1990. "Contribution of chemical 6-*O*-sulfation of the aminodeoxyhexose residues in whale heparin with high affinity for antithrombin III to its anticoagulant properties" *Journal of Biochemistry* 107(3):377-380.

Uehara T., Takeshita M. y Maeda M. 1992. "Studies on anticoagulant-active arabinan sulfates from the green alga *Codium latum*" *Carbohydrate Research* 235:309-311.

van de Locht A., Lamba D., Bauer M., Huber R., Friedrich T., Kröger B., Höffken W. y Bode W. 1995 "Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kasal inhibitor rhodniin in complex with thrombin" *EMBO Journal* 14:5149-5157



Wijesekara I., Pangestuti, R. y Kim S. 2011. "Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae" *Carbohydrate Polymers* 84:14-21

**Conclusiones generales:**

-El alga verde marina *Codium vermilara* sintetiza paredes celulares complejas formadas por una porción fibrilar y una matriz de polisacáridos sulfatados. La localización *in situ* de los componentes reveló una estructura tipo sándwich, con dos capas fibrilares (donde también se encuentran HRGPs) que encierran una zona central donde se concentran los polisacáridos sulfatados.

-La porción fibrilar de la pared está formada por un  $\beta$ -(1→4)-D-manano lineal insoluble en agua.

-Los principales polisacáridos sulfatados son:

-galactanos similares a los de otras especies del género: ramificados, sustituidos con grupos sulfato y ácido pirúvico, con un esqueleto básico formado por unidades  $\beta$ -(1→3)-D-Galp.

-arabinanos lineales altamente sulfatados (en las posiciones C-2 y/o C-4), con unidades  $\beta$ -(1→3)-L-Arap. Se trata del primer reporte de un polisacárido formado por unidades de arabinosa en forma piranósica.

- Se aisló además, con bajo rendimiento, un manano con grado intermedio de sulfatación cuya estructura básica es la misma que en el caso del manano fibrilar, aunque se encuentran grupos sulfato en posición C-2 en algunas de las unidades Manp. Se propone para este polímero un rol de interfase entre la porción fibrilar neutra y la matriz sulfatada de la pared.

-Se detectó la presencia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) del tipo arabinogalactano proteínas y extensinas. Estas glicoproteínas se ubican en las capas externa e interna que delimitan la zona central de la matriz de la pared.

-Se analizó la variabilidad geográfica y temporal de los componentes de la pared celular de *C. vermilara*:

-El análisis de las muestras tomadas en el mismo momento del año en las tres localidades (La Farola, San Antonio Oeste y Bahía Arredondo) mostró que el

contenido relativo de arabinosa aumenta en sentido norte-sur, mientras que el de manosa lo hace en sentido contrario, aunque en menor medida.

-El análisis de la variabilidad temporal en las muestras de La Farola indicó que si bien hay diferencias significativas en las cantidades relativas de cada polisacárido, el nivel de sulfatación total de la pared se mantiene constante.

-Esto sugiere la existencia de mecanismos complejos de regulación del nivel de sulfatación, remarcando la importancia de esta característica como adaptación al ambiente marino.

-En cuanto a la metodología usada, la caracterización química y el análisis por FTIR acoplado a Análisis de Componentes Principales dan información diferente y complementaria sobre la pared celular. Mientras la composición de monosacáridos da la proporción relativa de los polisacáridos presentes, el análisis basado en IR da idea del grado relativo de sulfatación de cada uno de ellos.

-La combinación del análisis químico con la espectroscopía infrarroja asociada a técnicas estadísticas de compresión constituye un enfoque valioso para el estudio de variaciones espacio-temporales en los componentes de las paredes celulares.

-El arabinano piranósico altamente sulfatado (A1) mostró una importante actividad anticoagulante a través de cuatro mecanismos, en forma dependiente de la concentración: inhibición directa de trombina, inhibición directa de Factor Xa, potenciación de AT y potenciación de HCII.

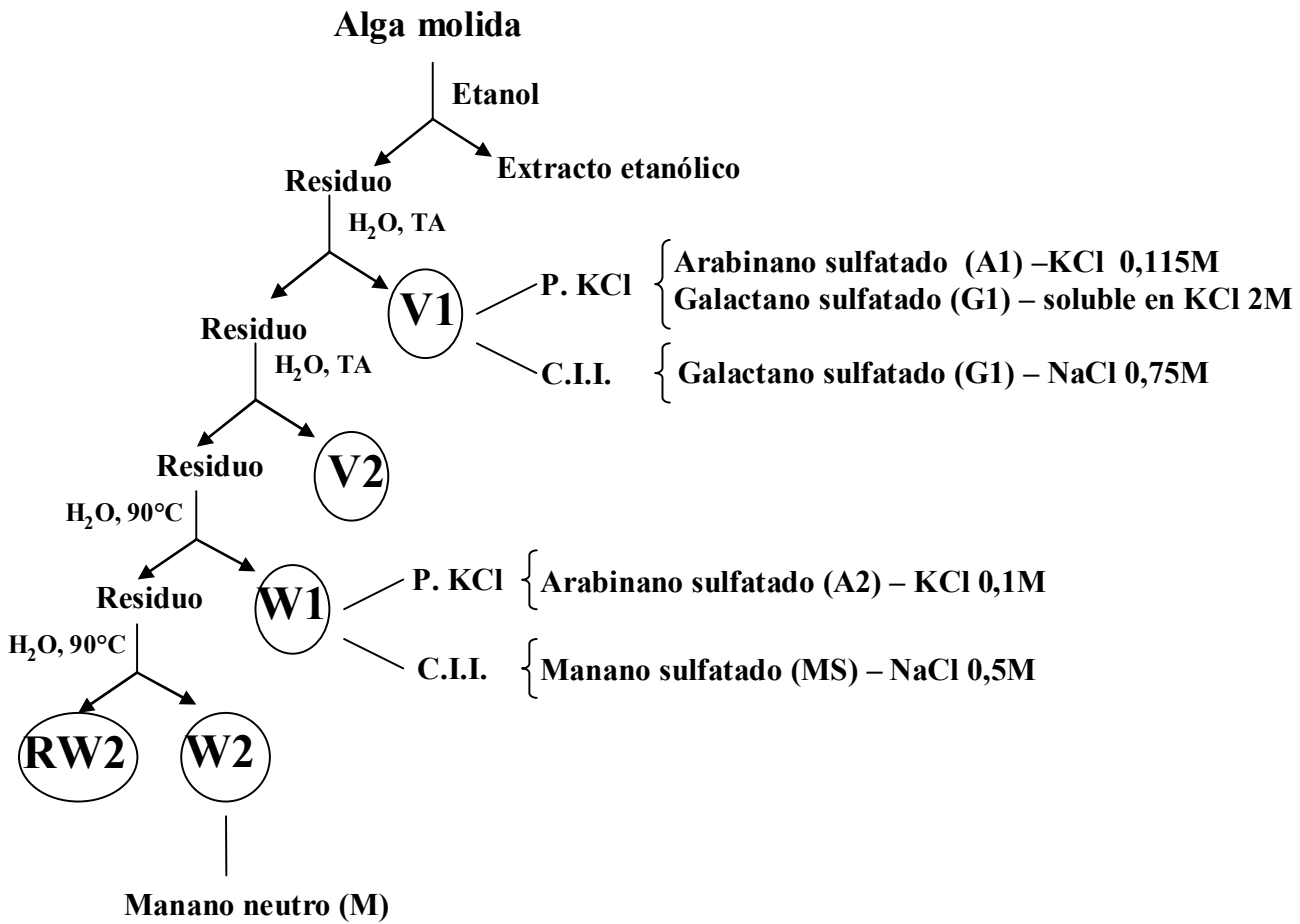
-La inhibición directa de trombina se relacionaría con cambios en la geometría de la tríada catalítica producidos por la unión del polisacárido al exosito 2 de la enzima. Los cambios en la geometría del sitio activo son mayores en el caso de la trombina bovina que en el de la humana. Esta diferencia se observó también en los porcentajes de inhibición alcanzados con ambas enzimas en los ensayos amidolíticos.

-La actividad de A1 sobre la trombina se debe al alto grado de sulfatación por predominio de unidades disulfatadas, y particularmente a las interacciones establecidas por los grupos sulfato en posición C-2 sobre las unidades de arabinopiranosas.

**Anexo 1- FTIR: longitudes de onda asociadas a grupos funcionales presentes en polisacáridos sulfatados**

<b>Longitud de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Grupo funcional</b>
1380-1355	sulfato
1250-1230	O=S=O (estiramiento asimétrico)
1190	S=O (estiramiento asimétrico)
1160-1155	C-O-C (estiramiento asimétrico)
1125	enlace glicosídico (estiramiento asimétrico)
1090	S-O (estiramiento simétrico)
1080-1040	C-O + C-OH
1045	C-OH + S=O
1026	S=O en C2 (estiramiento pseudo-simétrico)
1012	S=O en C6 (estiramiento pseudo-simétrico)
1002	enlace glicosídico
970-965	enlace glicosídico
930	C-O-C en 3,6-anhidrogalactosa
900-890	C6 en β-D-galactosa
850-840	grupo C4-O-S en galactosa (estiramiento)
830-825	C2-O-S galactosa
820-810	C6-O-S (estiramiento)
805-800	C2-O-S 3 en 3,6-anhidrogalactosa

Adaptado de Prado-Fernández et al., 2003.



TA: temperatura ambiente  
 P.KCl: precipitación con cloruro de potasio  
 C.I.I.: cromatografía de intercambio iónico

Fe de erratas:

p 94- Tabla 2 (valor de media  $\pm$  DE de Ara para los ápices) donde dice “ $34 \pm 1$ ” debe decir “ $4 \pm 1$ ”.

p 167- Tabla 2, donde dice “comparada con la de su producto A2 y A1D” debe decir “comparada con la de A2 y A1D”