

TESIS DEFENDIDA POR

**Ángeles del Pilar Bonilla Gutiérrez**

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

---

Dra. Ana Denise Re Araujo

*Director del Comité*

---

Dr. Fernando Díaz Herrera

*Miembro del Comité*

---

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro

*Miembro del Comité*

---

Dra. Maricela Flores Ibarra

*Miembro del Comité*

---

M.C. Luis Mendoza Garcilazo

*Miembro del Comité*

---

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

*Coordinadora del programa de posgrado en  
Ciencias*

---

Dr. David Hilario Covarubias Rosales

*Director de Estudios de Posgrado*

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**Análisis de la respuesta inmune para ESAT-6 en ratones con  
polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera***

**TESIS**

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**Presenta:**

**Ángeles del Pilar Bonilla Gutiérrez**

Ensenada, Baja California, México, 20 de enero de 2010.

**RESUMEN** de la tesis de Ángeles del Pilar Bonilla Gutiérrez, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Enero 2010.

Resumen aprobado por:

---

Dra. Ana Denise Re Araujo

### **Resumen:**

Los compuestos que son capaces de interactuar con el sistema inmune para regular aspectos específicos de la respuesta del huésped pueden ser clasificados como inmunomoduladores o modificadores biológicos de dicha respuesta (BRM's por sus siglas en inglés). Los inmunomoduladores pueden regular la respuesta inmune positivamente (inmunopotenciadores) o de manera negativa (inmunosupresores).

En cuanto a la extracción de polisacáridos solubles de *M. pyrifera*, la fracción A se obtuvo, en una proporción promedio de 13.20 % w/w con respecto a la muestra total de alga seca, y de acuerdo a la prueba de análisis de varianza de una sola vía, hay diferencias altamente significativas entre las réplicas. La proporción promedio de la fracción B con respecto a la muestra inicial fue de 3.14 %, con una desviación estándar de 1.32. y de acuerdo a la prueba t-student se observan diferencias altamente significativas entre las réplicas.

En cuanto a la determinación de la respuesta humoral por medio de un inmunoensayo ELISA indirecto, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las tres concentraciones de extracto, ni en los grupos inoculados sólo con las fracciones de polisacárido. En los grupos inoculados junto con ESAT-6 recombinante no se observaron diferencias significativas dentro de este grupo, por lo que para posteriores ensayos se sugiere usar un rango más amplio de concentraciones.

**Palabras Clave:** inmunomoduladores, BRM's, polisacáridos, *Macrocystis pyrifera*, ESAT-6, humoral, ELISA, macrófagos

**Abstract:**

Compounds capable of interact with the immune system to regulate specific aspects of the immune response of the host can be classified as immunomodulators or biological response modifiers (BRM's). Immunomodulators can upregulate the immune response (immunostimulators) or downregulate (immunosupresors).

In the extraction of soluble polysaccharides of *M. pyrifera*, fraction A was obtained at an average proportion of 13.20 % w/w with respect to the total weight of the dried seaweed sample, according of the one way analysis of variance, there are highly significant differences between replicates. The average proportion of fraction B with respect to the initial sample was 3.14 %, with a standard deviation of 1.32, and according to the t-student test there are highly significant differences between replicates.

Regarding the determination of the humoral response by an indirect ELISA immunoassay we found no statistically significant differences between the three concentrations of extract, or within the groups injected only with fractions of polysaccharide. In the groups inoculated with recombinant ESAT-6 and polysaccharide simultaneously there are no significant differences within this group, so subsequent tests are suggested using a wider range of concentrations.

**Keywords:** immunomodulators, BRM's, polysaccharides, *Macrocystis pyrifera*, ESAT-6, humoral, ELISA, macrophages.

## **Dedicatorias**

A mis padres, por apoyarme todos estos años, y porque a pesar de la distancia siempre se sienten muy cerca.

A mi hermano, por ser el mejor del mundo.

A mi familia de Ensenada, por todos los momentos irrepetibles que hemos compartido.

A Saso, por hacerme sonreír cada día...

## **Agradecimientos.**

Al centro de investigación científica y estudios superiores de Ensenada (CICESE) por brindarme los medios para realizar este proyecto.

Al Dr. Alexei Licea por todo por su guía y apoyo en todo momento.

A Tanya y a Pavel, porque más que compañeros han sido los mejores maestros y amigos.

A la Dra. Denise Re y a todos los miembros del comité por su tiempo.

A mis compañeros, porque no habría ciencia sin diferentes puntos de vista.

Y a mis amigos, los acumulados en toda una vida, y a los que esta aventura académica me permitió conocer, porque todo logro sabe mejor acompañado.

## CONTENIDO

Resumen: .....	i
Abstract: .....	ii
CONTENIDO .....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	ix
I. Introducción .....	1
II. Antecedentes.....	10
II. 1. Polisacáridos de origen botánico con actividad biológica.....	10
II. 2. Fucoidán.....	11
II. 3. $\beta$ -D-Glucanos .....	13
III. Justificación .....	20
IV. Hipótesis:.....	20
V. Objetivos.....	21
V. 1. Objetivo General .....	21
V. 2. Objetivos particulares.....	21
VI. Materiales y Métodos.....	22
VI. 1. Extracción de polisacáridos solubles en agua de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Rioux, Turgeon, & Beaulieu, 2007). .....	22
VI. 2. Expresión y purificación de ESAT-6 recombinante: .....	23
VI. 3. Animales y esquema de administración de la proteína modelo y el extracto de polisacáridos de <i>M. pyrifera</i> .....	25
VI. 4. Medición de la respuesta inmune humoral.....	27
VI.4.1 Separación del suero sanguíneo .....	27
VI.4.2 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de reconocimiento..	27
VI. 5. Tratamiento de datos .....	28
VII. Resultados.....	30
VII. 1. Extracción de polisacáridos solubles en agua de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Rioux, Turgeon, & Beaulieu, 2007). .....	30

## CONTENIDO (continuación)

VII. 2.	Expresión de ESAT-6 recombinante (Lugo-Fabres, 2009) .....	32
VII. 3.	ELISA de reconocimiento.....	35
VIII.	Discusión .....	38
IX.	Conclusiones .....	42
IX. 1.	Con respecto al objetivo general:.....	42
IX. 2.	Con respecto a los objetivos particulares:.....	42
X.	Referencias.....	43

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Activación de las diferentes respuestas de los macrófagos en presencia de polisacáridos de origen botánico (Schepetkin & Qunn, 2006). .....	4
Figura 2.- Estructura general de los glucanos (Soltanian, Struyven, Cox, Sorgeloos, & Bossier, 2009). .....	5
Figura 3.- Modelo de Pankter de la estructura promedio del fucoidán (Li, Lu, Wei, & Zhao, 2008) .....	6
Figura 4.-Estructura básica del ácido algínico (Percival, 1979). .....	6
Figura 5.- <i>Macrocystis pyrifera</i> (kelp). .....	7
Figura 6.- Distribución mundial de los bosques de Kelp Gigante. ....	8
Figura 7.-Estructura del complejo CFP-10 . ESAT-6 (A) CFP-10 en rojo y ESAT-6 en azul. (B) Representación de cintas, la cual ilustra las dos estructuras hairpin hélice-vuelta-hélice formadas por las proteínas individuales. La orientación es la misma que en A. ( <a href="http://www.le.ac.uk/by/research/images/mdc12/Slide1.GIF">http://www.le.ac.uk/by/research/images/mdc12/Slide1.GIF</a> ).....	9
Figura 8.- Receptores involucrados en el reconocimiento de los $\beta$ -D-Glucanos (Soltanian, Struyven, Cox, Sorgeloos, & Bossier, 2009). .....	15
Figura 9.- Procedimiento para la obtención del extracto de polisacáridos solubles de <i>Macrocystis pyrifera</i> (Zvyagintseva, et al., 1999). .....	23
Figura 10.- Procedimiento propuesto para verificar el efecto inmunopotenciador de un extracto de polisacáridos solubles de <i>M. pyrifera</i> . .....	28
Figura 11.- Rendimiento del procedimiento de extracción de polisacáridos solubles de <i>M. pyrifera</i> (w/w) con respecto a la muestra inicial. ....	31
Figura 12.- Gel de agarosa al 2% de las clonas L3 y L4 para verificar la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 (Lugo-Fabres, 2009). (Carril 1: escalera, carril 2: control negativo, carril 3: inserto de ESAT-6 como control positivo, carril 4: clona L3; carril 5: clona L4). .....	32
Figura 13.- ELISA directo de expresión para las clonas L3 y L4 resultado de la ligación del inserto que codifica para la proteína ESAT-6 recombinante. (el control positivo es la proteína ESAT-6 purificada por Lugo-Fabres (2009)). .....	33

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

- Figura 14.- ELISA directo de expresión de ESAT-6 recombinante después de la purificación en columna por afinidad con metales. .... 34
- Figura 15.- Concentración de la proteína recombinante ESAT-6 purificada, por el método de micro BCA<sup>TM</sup>. .... 35
- Figura 16.-ELISA indirecto de expresión para determinar la respuesta humoral (cantidad de anticuerpos IgG para ESAT-6) a las fracciones A y B de polisacáridos solubles de *M. pyrifera* medida en suero de ratones inyectados intraperitonealmente. .... 36
- Figura 17.- Diagrama de cajas para los diferentes grupos experimentales para determinar la respuesta inmune humoral de los extractos de polisacáridos solubles de *M. pyrifera*. (Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras representan la media más la desviación estándar). .... 37

## LISTA DE TABLAS

Tabla I.-Esquema de administración. ....	26
Tabla II.- Rendimiento en la extracción por solventes en condiciones alcalinas para la fracción A de polisacáridos de <i>M. pyrifera</i> . ....	31
Tabla III.- Rendimiento en la extracción por solventes en condiciones ácidas para la fracción B de polisacáridos de <i>M. pyrifera</i> . ....	31
Tabla IV.- ANOVA de una vía para dentro de cada grupo con un intervalo de confianza del 95% .....	36

## I. INTRODUCCIÓN

---

Los compuestos que son capaces de interactuar con el sistema inmune para regular aspectos específicos de la respuesta inmunológica del huésped pueden ser clasificados como inmunomoduladores o modificadores biológicos de esta respuesta (BRM's por sus siglas en inglés). Los inmunomoduladores pueden regular la respuesta inmune positivamente (inmunopotenciadores) o de manera negativa (inmunosupresores).

La estrategia básica de la inmunomodulación es identificar los aspectos de la respuesta del huésped que pueden ser aumentados o suprimidos de tal manera que se obtenga la respuesta inmune deseada.

Esto tiene algunas ventajas que son: (i) permitir mecanismos de defensa del huésped mejorando la respuesta inmune y (ii) no involucrar el uso de antibióticos, lo cual es importante dado el gran número de patógenos que han desarrollado resistencia a los agentes antimicrobianos (Tzianabos, 2000).

De acuerdo a su naturaleza, los inmunomoduladores pueden clasificarse en tres grupos: 1) microbios intactos (por ejemplo BCG) y componentes de células microbianas (endotoxinas de microorganismos Gram-negativos (LPS), muramylidipéptido (MDP), polisacáridos de hongos (zymosan,  $\beta$ -glucanos), polinucleótidos, bestatina); 2) Componentes naturales de un sistema inmune normal (hormonas tóxicas, linfocinas, monocinas, etc); y 3) Compuestos

sintéticos (levamisol, isoprinosina, dietildithiocarbamato) (Novak y Vetvicka, 2008).

Se han identificado numerosos tipos de inmunomoduladores, incluyendo proteínas de mamíferos como el interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), el factor estimulador de colonia, y el factor estimulador de macrófagos-monocitos (GM-CSF). En las últimas décadas, algunos polisacáridos aislados de fuentes botánicas (hongos, algas, líquenes y plantas superiores) han captado la atención de los investigadores ya que éstos poseen un amplio espectro de propiedades terapéuticas y toxicidad relativamente baja (Schepetkin y Qunn, 2006). Dichos polisacáridos se clasifican farmacológicamente BRM's (Soltanian, Struyven, Cox, Sorgeloos, y Bossier, 2009).

La respuesta inmune en los humanos es compleja y en múltiples niveles, donde una gran variedad de células están involucradas y tienen roles distintos pero que de alguna manera se superponen. Las células más importantes en la respuesta a la invasión de patógenos son los fagocitos (neutrófilos, monocitos y macrófagos), los cuales son participantes clave en la respuesta inmune innata. Los macrófagos son las células más viejas y filogenéticamente conservadas en los organismos multicelulares y junto con los neutrófilos, representan la primera línea de defensa después de la barrera epitelial. Adicionalmente, los macrófagos pueden funcionar como células presentadoras de antígenos, los cuales interactúan con los linfocitos T para modular la respuesta inmune adaptativa. Estas células además, llevan a cabo funciones microbicidas, incluyendo la inspección, quimiostasis, fagocitosis y destrucción de células infectadas por hongos, bacterias o virus (Schepetkin y Qunn, 2006).

En los animales superiores como los mamíferos, la mayoría de los polisacáridos exógenos son considerados como antígenos independientes de los linfocitos T, los cuales no inducen la respuesta inmune mediada celularmente. Sin embargo, la mayoría de los polisacáridos bacterianos provocan una respuesta en la inmunidad humoral, lo que da como resultado la inducción de inmunoglobulina M de baja afinidad (IgM) y algunos anticuerpos IgG. Esta respuesta es en un tiempo corto debido a la ausencia de linfocitos T ayudadores responsables del desarrollo de memoria inmunológica y la falta de respuesta de anticuerpos que hagan el cambio de isotipo entre IgM a IgG. Todo esto sucede debido a la inhabilidad de las células presentadoras para procesar y presentar los polisacáridos, sin embargo, ciertos polisacáridos de origen bacteriano han demostrado que pueden actuar como potentes inmunomoduladores con actividad específica tanto para linfocitos T, como para células presentadoras como monocitos y macrófagos (Tzianabos, 2000).

En estudios realizados en polisacáridos de origen botánico sobre la respuesta de los macrófagos, se demostró que éstos pueden aumentar la actividad citotóxica de los macrófagos contra células tumorales y microorganismos, aumentar las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de óxido nítrico (NO), además de mejorar la producción de citocinas y quimiocinas, como el factor  $\alpha$  de necrosis de tumores (TNF- $\alpha$ ), las interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  e IFN- $\beta$ 2 (Figura 1).

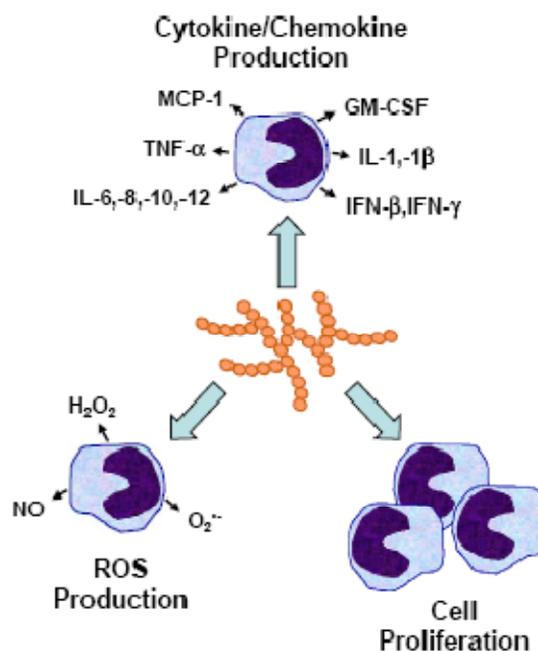


Figura 1.- Activación de las diferentes respuestas de los macrófagos en presencia de polisacáridos de origen botánico (Schepetkin & Qunn, 2006).

Las algas son consideradas las plantas con la organización química más simple. Muchas de ellas son unicelulares, y algunas no tienen pared celular. Sin embargo, la mayoría difiere considerablemente de las plantas superiores en estructura y composición. Así pues, a lo largo del tiempo se han encontrado diferentes polisacáridos procedentes de una gran variedad de algas, los cuales son ya sea reservas de alimento o constituyentes importantes de la pared celular. (Percival, 1979).

En las algas del pardas (Phaeophyceae) los materiales de reserva son generalmente azúcares poli-alcohólicos, manitol, y el glucano  $\beta$ -1,3 laminarián (Figura 2) (Percival, 1979). El término laminarián describe un grupo de (1→3),(1→6)- $\beta$ -D-glucanos de reserva, solubles en agua, de bajo peso molecular, aislados de algas pardas como *M. pyrifera*. En las diferentes

especies varían considerablemente en su estructura y composición. Los  $\beta$ -(1-3)-Glucanos son homopolímeros de glucosa purificados de hongos, levaduras y algas. Son unidades repetitivas unidas por enlaces 1-3 ramificadas en 1-6. El estudio de estos glucanos es de importancia ya que toman participación importante en los sistemas de defensa de muchos organismos (Zvyagintseva, et al., 1999).

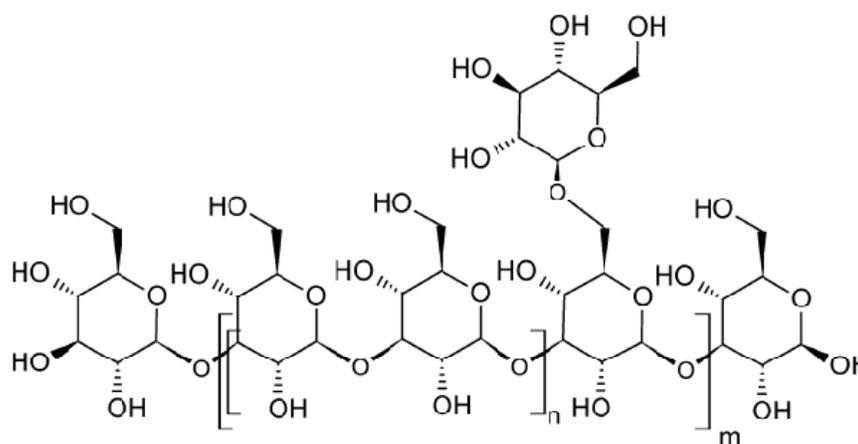


Figura 2.- Estructura general de los glucanos (Soltanian, Struyven, Cox, Sorgeloos, y Bossier, 2009).

El fucán sulfatado (fucoidán) (Figura 3), es uno de los polisacáridos estructurales más abundantes en las algas pardas. Es uno de los constituyentes mayoritarios de la pared celular, la cual está compuesta principalmente por ácido algínico (Figura 4), celulosa y fucoidán. El ratio de estos componentes es 3:1:1. Los polímeros de celulosa forman una red insoluble de fibrillas. El ácido algínico y el fucoidán se encuentran embebidos en la red de celulosa como una matriz amorfa. El ácido algínico es un polisacárido cargado negativamente con una composición variable de ácidos glucurónico y malurónico. El fucoidán es un polímero de L-fucosa unida por un enlace  $\alpha$ -1,2 y con una sulfatación en la

posición O-4. Las variaciones estructurales incluyen los enlaces glicosídicos  $\alpha$ -1,3 y  $\alpha$ -1,4, unidades repetitivas de hexasacáridos con sulfatación 2-O y acetilación 2-O. Además de contener L-fucosa, los fucanos sulfatados suelen contener xilosa, galactosa, manosa, glucosa, rhamnosa y ácido D-glucurónico (Leung, Liu, Koon, & Fung, 2006). Los fucoidanes son polielectrolitos no tóxicos. Poseen varias actividades farmacológicas: antibacterial, antiviral, antitumoral, inmunomoduladora, antipéptica, antilipémica, antigemostática y anticoagulante. El ácido algínico puede ser usado para unión a metales pesados y como inmunoestimulante (Zvyagintseva, et al., 1999).

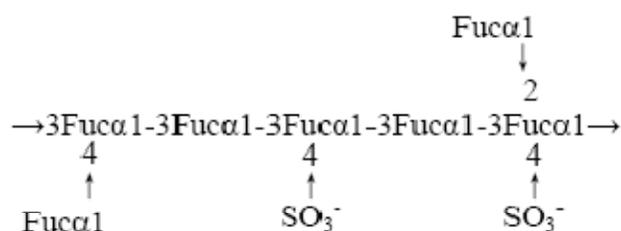


Figura 3.- Modelo de Pankter de la estructura promedio del fucoidán (Li, et al, 2008)

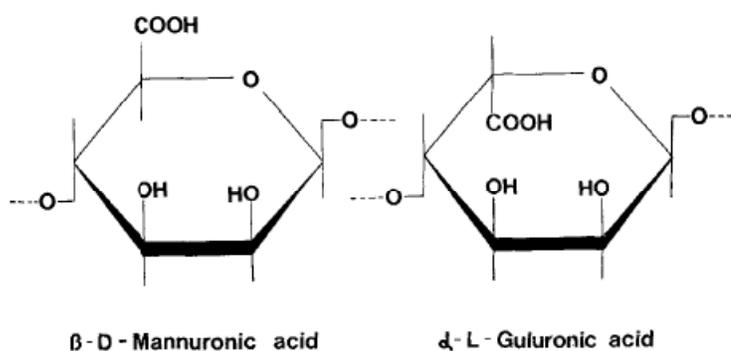


Figura 4.-Estructura básica del ácido algínico (Percival, 1979).

La flora algal marina de Baja California es una de las más estudiadas del Pacífico de México. Un total de 619 especies han sido registradas, de las cuales, 444 son Rhodophyta, 109 Phaeophyta y 66 Chlorophyta (Rosas-Aguilar, Aguilar-Rosas, y González-Yajimovich, 1999).

*Macrocystis pyrifera* (L.) C. Agardh (kelp gigante) (Figura 5) es un alga parda de la clase Phaeophyceae, orden Laminariales, familia Lessoniceae (Boraso & Saixso), la cual puede alcanzar hasta los 60 m de altura. Su hábitat son las aguas someras a profundidades máximas de 40 m, y temperaturas menores a 20°C, crece sobre sustrato rocoso, con intensidad de luz del 1 %. Su distribución en el hemisferio Norte va desde Alaska hasta las costas de aguas de surgencia en Baja California, México y en el hemisferio sur en Perú, Chile, Argentina, Sudáfrica, Nueva Zelanda, y Tasmania (Figura 6).



Figura 5.-*Macrocystis pyrifera* (kelp).

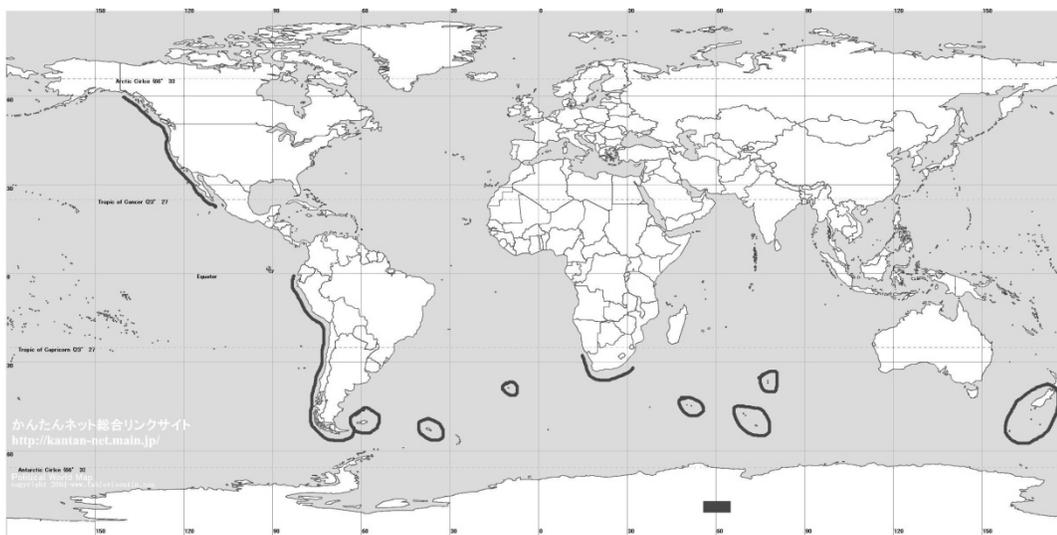


Figura 6.- Distribución mundial de los bosques de Kelp Gigante.

En la década de los años 90 se estimaba que existía una biomasa potencial cosechable de *M. pyrifera* en las costas de la Península de Baja California de 100,000 t, lo cual lo convierte en un recurso aprovechable gracias a su fácil explotación y rápida recuperación. Esta especie se cosecha comercialmente en México desde 1956, con una extracción promedio de 36, 000 t anuales (peso fresco), las cuales en su mayoría se exportan a los Estados Unidos de América para la producción de alginatos (Hernández-Carmona, 1996), sin embargo, no se han considerado otros componentes como el laminarián y el fucoidán con un uso potencial como modificadores de la respuesta biológica (Mayer, et al, 1987).

El complejo de proteínas de secreción CFP-10 y ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 7), pertenecen a una familia de proteínas micobacteriales, y forman un complejo 1:1 unido con una  $K_d \leq 1.1 \times 10^{-8}$  M). Éstas desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de esta mycobacteria (Renshaw, et al., 2005), por lo que pueden usarse como proteína modelo para determinar variaciones en la respuesta inmune adaptativa.

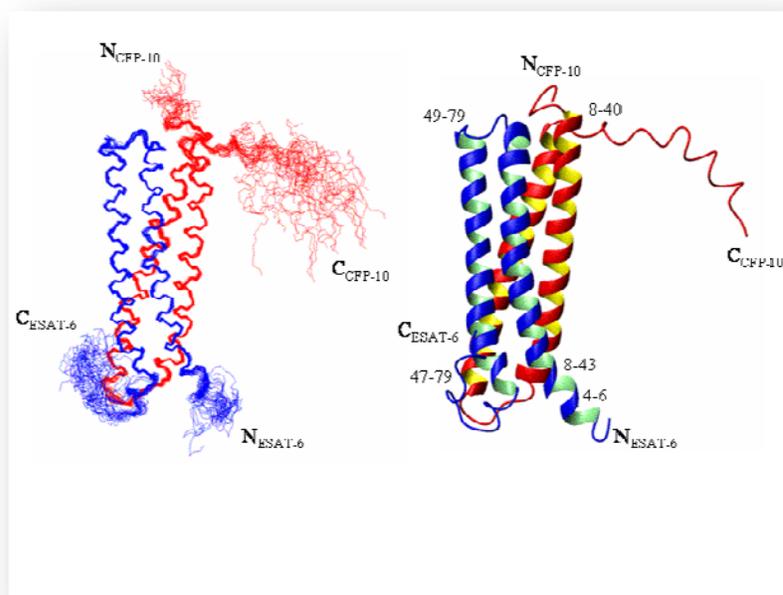


Figura 7.-Estructura del complejo CFP-10 . ESAT-6 (A) CFP-10 en rojo y ESAT-6 en azul. (B) Representación de cintas, la cual ilustra las dos estructuras hairpin hélice-vuelta-hélice formadas por las proteínas individuales. La orientación es la misma que en A. (<http://www.le.ac.uk/by/research/images/mdc12/Slide1.GIF>).

## II. ANTECEDENTES

---

### II. 1. Polisacáridos de origen botánico con actividad biológica

La habilidad innata para detectar patógenos es esencial para la existencia multicelular, y ha sido alcanzada a través de la evolución de los receptores evolucionados a partir de las líneas germinales, los cuales pueden reconocer estructuras como no propias, las llamadas “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs por sus siglas en inglés) Estos receptores involucrados en reconocer productos conservados del metabolismo microbiano producido por los microorganismos patógenos y no por el huésped. El reconocimiento de estas estructuras moleculares permite al sistema inmune diferenciar lo infeccioso de lo no infeccioso. Las estructuras reconocidas por estos receptores, llamadas “patrones moleculares asociadas a patógenos” (PAMPs por sus siglas en inglés) generalmente son esenciales para la supervivencia de los microbios patógenos pero no se encuentran en los metazoa. Ejemplos de PAMPs son los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), los peptidoglicanos, los ácidos lipoprotéicos, los mananos, el DNA bacteriano, el RNA de doble hélice, y  $\beta$ -glucanos de hongos. El reconocimiento de estas estructuras detona las respuestas diseñadas para proteger al huésped del agente patógeno invasor como parte del sistema inmune innato en los animales superiores (Brown y Gordon, 2005).

Recientemente, algunos polisacáridos de origen bacteriano, han sido descritos como inmunomoduladores con actividad específica tanto para células T y células presentadoras de antígenos como monocitos y macrófagos (Tzianabos, 2000).

## II. 2. Fucoidán

Los fucoidanes, polisacáridos los cuales contienen porcentajes altos porcentajes de L-fucosa y grupos éster sulfato, son constituyentes de las algas pardas y de algunos invertebrados marinos (erizo y pepino marino). Este polisacárido fue llamado “fucoidin” al ser aislado por primera vez de un alga parda por Kylin en 1913. En la actualidad se nombra fucoidán de acuerdo a las reglas de la IUPAC, pero también en ocasiones se define como fucán, fucosán o fucán sulfatado (Li, et al, 2008).

Estos polisacáridos, compuestos principalmente de L-fucosa sulfatada, se pueden extraer fácilmente de la pared celular de las algas pardas (i.e., Phaeophyceae) con agua caliente o soluciones ácidas (Rioux, et al, 2007) y pueden constituir hasta el 40 % del peso seco de la pared celular (Berteau y Mulloy, 2003).

Los fucanos aislados de algas pardas, usualmente llamados fucoidanes son conocidos por actuar como moduladores de la coagulación y se han propuesto como una alternativa de la heparina, ya que al igual que ésta pueden modificar varias respuestas biológicas como la inflamación, la proliferación celular y adhesión, infecciones virales, y fertilización (Boisson-Vidal, et al, 1995).

Los fucoidanes algales están presentes en varios órdenes, principalmente en las Fucales y Laminariales, pero también en las Chordariales, Dictyotales, Dictyosiphonales, Ectocarpales y Scytosiphonales (Berteau y Mulloy, 2003).

En la década pasada, el fucoidán aislado de diferentes especies de algas pardas ha sido estudiado extensivamente por sus variadas actividades biológicas, incluyendo las actividades anticoagulante, anti-trombótica, antiviral, antitumoral, inmunomoduladora, antiinflamatoria, reductora de lípidos en la sangre, antioxidante, actividad anti hepatopatías, uropatías, sus efectos protectivos del sistema gastrointestinal y su potencial terapéutico en cirugía.

Desde el primer fucoidán aislado por Kylin en 1913, se han investigado las estructuras de los fucoidanes de diferentes algas pardas, éstas han resultado ser muy variadas, por ejemplo, el de *Fucus vesiculosus*, tiene una estructura química simple, compuesta principalmente por fucosa y sulfato. Sin embargo, la composición de los diferentes fucoidanes puede ser más compleja y contener además otros monosacáridos como manosa, galactosa, glucosa, xilosa, etc (Li, et al, 2008).

En 1962 Scweiger aisló un polisacárido de *Macrocystis pyrifera* con un radio de fucosa-galactosa de 18:1, y fue el primero en reportar que el fucoidán no era un fucán sulfatado puro, sino un heteropolímero de fucosa, galactosa y xilosa.

El fucoidán puede actuar como ligando tanto de las L- o P-selectinas, las cuales interactúan con los oligosacáridos sulfatados. El fucoidán actúa de manera similar a la heparina como se menciono anteriormente o al heparán sulfato (HS), presentando un patrón espacial de estructura de sacárido sulfatado, éste limita la agrupación de oligosacáridos fucosilados en la superficie celular. Sin embargo, en la mayoría de los estudios de este tipo, no se usa fucoidán purificado, por lo cual es difícil definir cuál es la estructura involucrada en este proceso (Berteau y Mulloy, 2003).

El fucoidán es ligando para algunos de los receptores “carroñeros” o “scavenger”, éstos son un grupo de proteínas involucradas en la captación de sustancias de desecho en los macrófagos, como por ejemplo, lipoproteínas oxidadas, células dañadas, o los microorganismos invasores. El fucoidán dispara una vía de señalización dependiente de proteincinasas. La unión del azurocidín derivado de neutrófilos (también conocida como de unión a la heparina) a los monocitos es inhibida por el fucoidán, el cual deroga el efecto del azurocidín en la producción del TNF- $\alpha$ . Sin embargo, el mismo estudio revela que el fucoidán per se puede estimular la producción de TNF- $\alpha$  en los monocitos (Berteau y Mulloy, 2003).

### **II. 3. $\beta$ -D-Glucanos**

Los glucanos son polisacáridos naturales compuestos por unidades D-piranosil y pueden ser encontrados en una gran variedad de cereales, plantas, algas, bacterias, hongos y levaduras. La estructura macromolecular de los glucanos depende tanto de la fuente como del método de aislamiento. Los parámetros de caracterización de los  $\beta$ -D-glucanos, los cuales son importantes en su actividad biológica incluyen: estructura primaria, solubilidad, grado de ramificación (DB por sus siglas en inglés), masa molecular, y la carga polimérica y/o conformación en solución (conformación triple hélice, hélice simple y giro al azar) (Soltanian, et al, 2009). Dependiendo de su estructura, los  $\beta$ -glucanos pueden dividirse en tres grupos principales con propiedades diferentes: solubles, formadores de geles y particulados. La solubilidad de estos compuestos depende siempre del grado de polimerización, tipo de enlaces y grado de ramificaciones y derivaciones químicas (Soltanian, et al, 2009). Los glucanos solubles han demostrado tener una mejor capacidad inmunoestimuladora que los insolubles (Xiao, et al, 2004)

Los polisacáridos, particularmente los glucanos, tienen una larga historia como inmunomoduladores. El interés en los glucanos aumentó después de que experimentos de Riggi mostraron que el zymosan estimula los macrófagos vía el sistema de complemento. Se ha encontrado que una gran variedad de  $\beta$ -1,3 glucanos se unen a los receptores de monocitos, macrófagos, neutrófilos y células NK. Estos compuestos han sido estudiados extensivamente por sus efectos inmunológicos y farmacológicos. Hay más de 600 artículos que describen la actividad biológica de los glucanos, y se han demostrado efectos inmunomoduladores en modelos animales como: gusanos, camarones, peces, ratones, ratas, conejos, coballos, borregos, puercos, ganado y humanos (Soltanian, et al, 2009). Basado en estos resultados se ha concluido que los  $\beta$ -1,3-glucanos representan un tipo de inmunoestimulante que es activo a través del espectro evolutivo, representando una alternativa conservada en la respuesta inmune innata directa contra hongos patógenos (Vetvicka y Yvin, 2004).

En los vertebrados la capacidad inmunomoduladora de los  $\beta$ -glucanos es a través de su habilidad para activar a los leucocitos (Brown y Gordon, 2005).

Se han identificado diferentes receptores implicados en el reconocimiento de los  $\beta$ -glucanos siendo los más importantes: Dectina-1, CR3, lactoseramidas, receptores scavenger, y los receptores Toll-like 2 y 6 (Figura 8) (TLR por sus siglas en inglés) (Brown y Gordon, 2003). Cuando el receptor está unido al glucano, las células tienen mayor actividad en internalizar, matar y digerir las bacterias al mismo tiempo que secretan moléculas señalizadoras (citocinas), las cuales estimulan la atracción y formación de nuevas células sanguíneas blancas y activan a éstas (Gartner, et al, 2003).

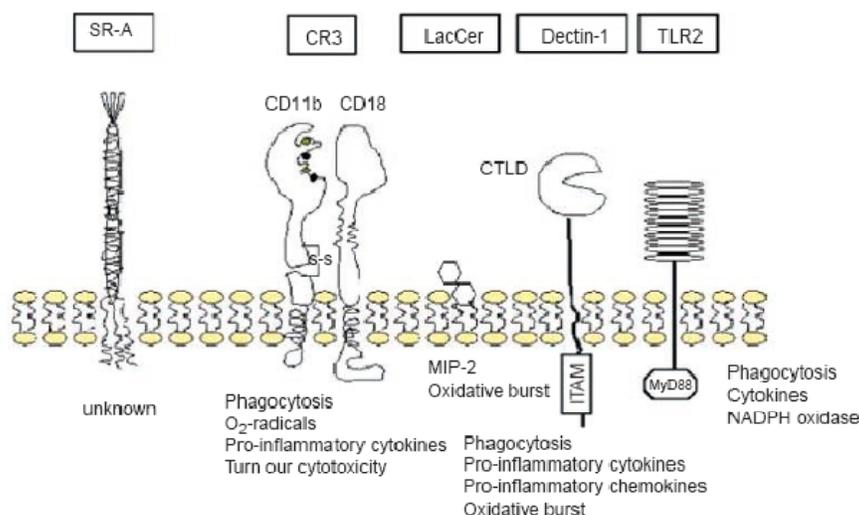


Figura 8.- Receptores involucrados en el reconocimiento de los  $\beta$ -D-Glucanos (Soltanian, Struyven, Cox, Sorgeloos, & Bossier, 2009).

Aunque los mecanismos de acción de los beta glucanos en los vertebrados no están completamente descritos aún, se sabe que la unión de los glucanos a un receptor de reconocimiento de patrones es crucial para su actividad. Los receptores para estos compuestos en vertebrados descritos en la actualidad son el CR3, LacCer, SR, Dectina-1, y TLR 2. CR3 funciona como un receptor fagocítico para un amplio rango de patógenos opsonizados y no opsonizados incluyendo al iC3b-beta glucano particulado opsonizado. Cuando los  $\beta$ -glucanos se unen al dominio de lectina de CR3, hay un cambio conformacional vía tirosina cinasa en un mecanismo dependiente de magnesio, de tal manera que el epítipo queda expuesto y se activa el receptor. Esta activación trae como consecuencia la fagocitosis y la producción de radicales de  $O_2$  y citocinas (Ross, et al, 1999). El receptor Dectina-1 reconoce  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos, hongos y levaduras intactos, y ligandos indefinidos en los linfocitos T (Adams, et al., 2008). Dectina-1 juega un papel importante en el reconocimiento no opsonizado, en contraste con MR y CR3.

Inmediatamente después de unirse a su ligando, Dectina-1 lleva a cabo la fagocitosis y endocitosis de su ligando, y comienza una cascada de señales que inicia en el citoplasma a través del motivo ITAM citoplasmático, pero de manera independiente a la syk cinasa (Brown & Gordon, Immune recognition of fungal  $\beta$ -glucans, 2005). De tal manera que la syk cinasa se requiere para la reacción oxidativa antimicrobiana a través de la Dectina-1 y parcialmente para la producción de citocinas en los macrófagos (Soltanian, et al, 2009).

El receptor Dectina-1, se ha identificado que trabaja en conjunto con el TLR2 en los macrófagos y células dendríticas para la producción de citocinas proinflamatorias en respuesta a ciertos estímulos como los  $\beta$ -glucanos (Gartner, et al, 2003). Los TLRs no reconocen a los glucanos por sí mismos, las señales de éstos junto con la Dectina-1 se requieren para la activación de NF- $\kappa$ B y la producción de citocinas. La generación de esta respuesta ocurre en la superficie celular y requiere de un motivo ITAM intacto de la Dectina-1. La ligación de ambos receptores da como consecuencia la fosforilación del motivo ITAM-like de señalización con subsecuentes señales las cuales generan fagocitosis y activación de la NADH oxidasa, resultando en la muerte del microbio (Soltanian, et al, 2009).

Se han aislado glucanos de diferentes especies de levaduras (zymosan, Macrogard, etc), hongos (Lentinan) y algas pardas (Phycarina, Laminarin) (Soltanian, et al, 2009). Estos polisacáridos han atraído especial interés en los últimos años en la industria alimentaria y farmacéutica debido a sus efectos positivos en la salud animal y humana.

La mayor reserva de polisacáridos de reserva en los euglenoides (paramylon), algas pardas (laminarián), diatomeas (chrisolaminarián), y

chrysophytes (leucosin, chrysolaminarián) son glucanos que contienen enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3).

El laminarián es un extracto de carbohidratos, similar al almidón de las plantas verdes, el cual se obtiene de las algas pardas. Estos laminarianes (llamados también laminarines) son un tipo de  $\beta$ -glucanos de reserva de baja masa molecular. La estructura de los laminarianes extraídos del kelp como subproductos de la extracción comercial de alginatos ha sido ampliamente estudiada.

Un aspecto importante de la actividad inmunológica de los  $\beta$  glucanos es su efecto adyuvante. En general, el sistema inmune reacciona con una mejor y mayor respuesta cuando los beta glucanos “ceban” este sistema. Muchos estudios se han centrado en la posibilidad de este uso en conjunto con vacunas virales, bacterianas y parasíticas (Jung, et al, 2004). Los glucanos aumentan la inmunidad humoral (Sakurai, et al, 1992) y la inmunidad celular (Xiao, et al, 2004). Además de esto, los  $\beta$ -glucanos tienen un efecto aditivo o hasta sinérgico con una variedad de agentes (Reynolds, et al, 1980). Numerosos reportes han documentado la habilidad de los (1 $\rightarrow$ 3),(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucanos para activar los componentes celulares y humorales en el sistema inmune del huésped. Primero, estas moléculas aumentan la actividad antimicrobiana de las células mono nucleares y los neutrófilos y amplifican la actividad funcional de los macrófagos. Además, estimulan la proliferación de monocitos y macrófagos y tienen potentes actividades hematopoyéticas (Tzianabos, 2000).

Cleary y colaboradores, en 1999, demostraron que los ratones inyectados con glucanos de bajo, medio, y alto peso molecular indujeron la activación

celular intraperitoneal. El tratamiento con éstos resultó en el aumento de la proporción de neutrófilos y eosinófilos y una alteración en la morfología de los macrófagos. Los macrófagos también presentaron un aumento en la actividad de fosfatasa y la producción de citocinas estimulada por lipopolisacáridos (Tzianabos, 2000).

Los (1→3),(1→6)-β-D-glucanos han sido evaluados en modelos experimentales de infecciones por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Mycobacterium leprae*. En cada caso, el tratamiento con (1→3),(1→6)-β-D-glucano tuvo efectos benéficos en la reducción de mortalidad y le disminución del conteo de bacterias en los animales infectados (Tzianabos, 2000).

Williams y colaboradores mostraron que la administración de (1→3)-β-D-glucano tiene múltiples efectos. Aumenta significativamente el número de neutrófilos circulantes en animales y aumenta la proliferación en la médula ósea. Los neutrófilos en ratones tratados con glucanos mostraron incremento en la fagocitosis de *E. coli in vitro*. El tratamiento profiláctico dio como resultado la reducción de la mortalidad asociada con la sepsis intra-abdominal. Sólo se encontraron algunos microorganismos presentes en el cultivo sanguíneo en los animales tratados con PGG-glucano (Betafectina), y los estudios en ratas y ratones mostraron un aumento en el conteo total de leucocitos (Tzianabos, 2000).

Evidencias recientes sugieren que el PGG-glucano (Betafectina) obtenido en levaduras, modula la producción de citocinas proinflamatorias de linfocitos y monocitos durante la sepsis. Los linfocitos extraídos de ratones tratados con PGG-glucano produjeron menos TNF-α y otras citocinas proinflamatorias

cuando son estimulados *in vivo* por lipopolisacáridos (LPS) o un superantígeno. Además, el tratamiento con glucano aumenta el nivel de apoptosis celular, lo que sugiere que las células inflamatorias inducidas en el proceso séptico fueron eliminadas de la circulación (Adams, et al, 1997).

Neyrick y colaboradores probaron la hipótesis de que el laminarín (LAM), un polisacárido  $\beta$  -(1→3) extraído de algas pardas, puede modular la respuesta a la inflamación sistémica. Ellos alimentaron ratas infectadas con un lipopolisacárido (LPS) de *E. coli*, y en las ratas tratadas con LAM disminuyó el número de monocitos circulantes, los nitritos, y el factor alfa de necrosis de tumores (TNF- $\alpha$ ). LAM también moduló las células inmunes intra-hepáticas: disminuyó la ocurrencia de células peroxidasa-positivas (que corresponden a los monocitos/neutrófilos) y, en contraste, aumentó el número de células ED2-positivas, que corresponden a los macrófagos hepáticos residentes. La respuesta pudo ser ocasionada por el efecto directo del  $\beta$ -glucano, o simplemente de manera indirecta a través de sus propiedades de fibra dietética (Neyrinck, et al, 2007).

### III. JUSTIFICACIÓN

---

El uso de moduladores del sistema inmune representa una buena alternativa de bajo costo para la prevención y el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas.

### IV. HIPÓTESIS:

---

Los diferentes polisacáridos solubles en agua de *Macrocystis pyrifera* tienen un efecto de inmunomodulador con respecto a la respuesta inmune humoral producida por la proteína modelo ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*, en ratones de la cepa Hsd:ICR.

## V. OBJETIVOS

---

### V. 1. Objetivo General

- Estudiar la modificación en la respuesta inmune con respecto a la proteína modelo ESAT-6 de *M. tuberculosis* en ratones de la cepa Hsd:ICR, al inyectar un extracto de polisacáridos hidrosolubles de *Macrocystis pyrifera*.

### V. 2. Objetivos particulares

- Obtener un extracto de polisacáridos solubles en agua de *M. pyrifera*.
- Determinar las diferencias en la producción de anticuerpos IgG contra ESAT-6 al inyectar un extracto de *M. pyrifera* en ratones de la cepa Hsd:ICR.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### VI. 1. Extracción de polisacáridos solubles en agua de *Macrocystis pyrifera* (Rioux, Turgeon, & Beaulieu, 2007).

Los polisacáridos fueron extraídos de acuerdo a Percival (1973) adaptado por Rioux (2007). El procedimiento de extracción se muestra en la Figura 9. Los polisacáridos fueron obtenidos a partir de algas secas y molidas (30 g), usando una extracción selectiva por solventes con agitación constante a  $455 \pm 5$  rpm en una plancha de calentamiento y agitación. La temperatura fue controlada con un baño maría. Primero se extrajeron los pigmentos y proteínas con 100-150 ml de etanol al 85 % (v/v) a 23 °C (2 x 12 hrs) y posteriormente a 70 °C (2 x 12 hrs). Se separó el sobrenadante de la muestra residual por filtración al vacío usando un filtro Whatman #4. Las algas residuales fueron tratadas con 100 ml de  $\text{CaCl}_2$  2% (w/v) a 70 °C (3 x 3 hrs) para precipitar y descartar los alginatos. La solución se centrifugó a 4500 rpm x 15 min a 23 °C en una centrífuga Heraeus Multifuge 1 S-R para obtener en el sobrenadante una mezcla de polisacáridos (Fracción A). Finalmente, se realizó una última extracción con 100 ml de HCl (0.01 M), pH=2, a 70°C, de donde se obtuvo la segunda fracción de polisacáridos (Fracción B) después de centrifugar en las mismas condiciones que en el paso anterior. Ambas fracciones se filtraron con un filtro Whatman #4, se liofilizaron y conservaron a -20°C hasta su uso.

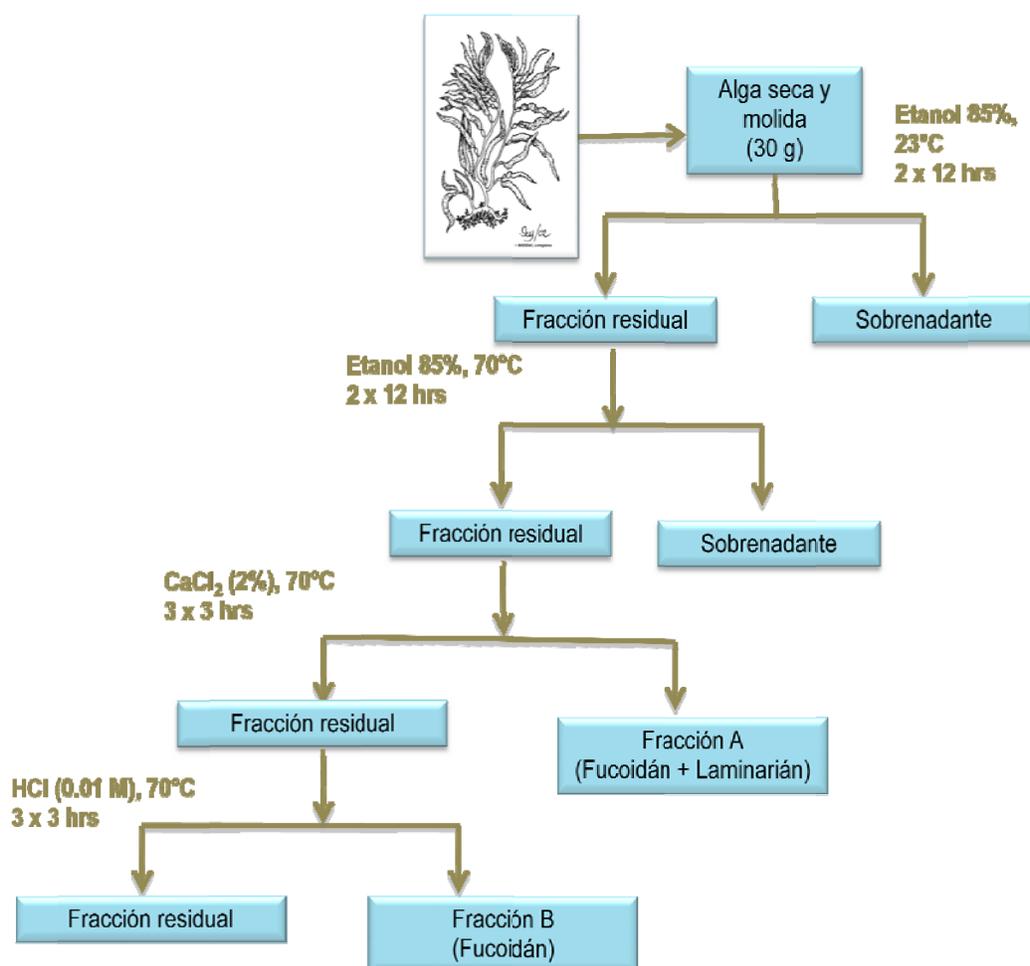


Figura 9.- Procedimiento para la obtención del extracto de polisacáridos solubles de *Macrocyctis pyrifera* (Rioux, et al, 2007).

## VI. 2. Expresión y purificación de ESAT-6 recombinante:

El laboratorio de inmunología del Centro de Investigaciones Científicas y Estudios Superiores de Ensenada cuenta con el gen que codifica para la proteína ESAT-6. La obtención de la clona de *E. coli* TOP 10, la cual

expresó la proteína recombinante se realizó de acuerdo al método descrito por Lugo-Fabres (2009) a partir de la selección de la clona transformada que expresaba dicha proteína. Las clonas producto de la ligación se inocularon en medio LB sólido con carbencilina y se incubaron 24 hrs a 37 °C. Se realizó un PCR de colonia con la polimerasa GoTaq™ para tener DNA suficiente para su detección. Se verificó que la transformación fuera satisfactoria por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2%, en el cual se usó una clona TOP-10 sin transformar como control negativo, y una clona transformada previamente y almacenada a -70 °C en glicerol (10 %) como control positivo.

Una vez verificada la presencia del gen, las clonas se inocularon en medio líquido LB con carbencilina (0.1mg ml<sup>-1</sup>) y se incubaron a 37°C durante 24 hrs. Se verificó la expresión de la proteína ESAT-6 recombinante por medio de un inmunoensayo ELISA, y se seleccionó la clona con mejor expresión.

Una vez comprobada la expresión de ESAT-6 se procedió a la inducción de la producción de la proteína incubando a 37 °C en medio LB adicionado con MgCl<sub>2</sub> (0.2 M) hasta obtener una densidad óptica de ≈0.7 (600 nm). Posteriormente indujo la producción de la proteína adicionando con IPTG (0.6 mM), y se incubó a 30 °C durante 5 horas. Finalmente, se realizó la extracción periplásmica generando un shock osmótico en la célula con buffer PPB (sacarosa 20%) y MgSO<sub>4</sub> (0.125 mM).

El lisado celular se dializó en PBS 1x para eliminar el exceso de sales de la inducción y extracción periplásmica y así evitar las interferencias iónicas en la purificación.

La purificación se realizó en una columna HisTrap™ HP de 5 ml, la cual consiste en una matriz de agarosa al 6% con un ligando quelante de níquel y ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) la cual purifica proteínas recombinantes con un marcaje de 6 histidinas en tándem las cuales se unen a los sitios de coordinación de Ni<sup>2+</sup> y posteriormente se eluyen por competencia con imidazol.

Se volvió a dializar en PBS 1x para eliminar todos los excesos de sales de la purificación.

Finalmente, se determinó la concentración de la proteína por espectrofotometría con un kit de MicroBCA™ Thermo midiendo la reacción colorimétrica a 545 nm, usando BSA (albúmina sérica bovina) como estándar.

### **VI. 3. Animales y esquema de administración de la proteína modelo y el extracto de polisacáridos de *M. pyrifera***

Se emplearon ratones Hsd:ICR hembras con un peso aproximado de 21-24 gr procedentes de Harlan Laboratories S.A. de C.V., garantizándoles condiciones ambientales estables y un suministro de agua y alimento *ad libitum*. Las unidades experimentales que recibieron las diferentes dosis de polisacáridos y/o proteína modelo ESAT-6 recombinante se conformaron a razón de 3 animales por cada una.

El diseño experimental incluyó un grupo con ESAT-6 disuelto en PBS 1x (grupo 1) y otro más con solución de ESAT-6 emulsificado con adyuvante incompleto (grupo 2) (Tabla I) como controles positivos.

Tabla I.-Esquema de administración.

Unidad experimental	ESAT-6 (1 µg/ratón)	Fracción A (µg/ratón)	Fracción B (µg/ratón)	Adyuvante incompleto	Adyuvante completo
1	✓				
2	✓			✓	
3A5	✓	5		✓	
3A50	✓	50		✓	
3A100	✓	100		✓	
3B5	✓		5	✓	
3B50	✓		50	✓	
3B100	✓		100	✓	
4A5		5		✓	
4A50		50		✓	
4A100		100		✓	
4B5			5	✓	
4B50			50	✓	
4B100			100	✓	
5	✓				✓
Control (-)				✓	

El día 1 se administraron por vía intraperitoneal las dos fracciones del extracto de *M. pyrifera* en dosis 5, 50 y 100 µg/ratón, disueltas en agua inyectable (destilada, estéril y libre de pirógenos) de manera simultánea con la proteína modelo ESAT-6, disuelta en solución salina fisiológica (PBS 1x), en dosis 1 µg/ratón (grupo 3), en ambos casos en una emulsión 1:1 con adyuvante incompleto de Freund

Para el grupo 4 se inyectaron las dos fracciones del extracto de *M. pyrifera* en dosis 5, 50 y 100 µg/ratón en una emulsión 1:1 con adyuvante incompleto de Freund.

El diseño experimental contempló además un control positivo con ESAT-6 disuelta en PBS 1x y adyuvante completo de Freund (grupo 5) y un grupo control negativo con PBS 1x con adyuvante incompleto de Freund (grupo 6).

Se llevó a cabo un esquema de refuerzo del antígeno ESAT-6 en los días 14, 35 y 42 hasta obtener una concentración suficiente de anticuerpos IgG contra el antígeno ESAT-6.

#### **VI. 4. Medición de la respuesta inmune humoral**

##### **VI.4.1 Separación del suero sanguíneo**

Cuatro días después de la inoculación del antígeno ESAT-6, se tomó muestra de sangre caudal de alrededor de 0.5 ml. La sangre se transfirió a un tubo limpio y se incubó alrededor de 2 horas a 37°C hasta obtener la retracción completa del coágulo. Posteriormente fue refrigerada a 4 °C y luego centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos. Finalmente se separó el suero (sobrenadante) y fue conservado en refrigeración hasta su uso posterior.

##### **VI.4.2 ELISA (Enzime-Linked Immunosorbent Assay) de reconocimiento.**

La determinación de la respuesta inmune humoral se llevó a cabo por medio de una serie de ensayos ELISA indirectos (Figura 10).

En una placa de poliestireno de 96 pozos se agregaron 50 µl de ESAT-6 recombinante, se cubrió con papel aluminio y se incubó a 37°C durante 1 hr. Se descartó la muestra y se fijó con 150 de BSA al 3% y se volvió a incubar a 37°C una hora. Después de esto se descartó el contenido de placa, se lavó tres veces

con Tween 20 al 0.05% en PBS1x y se añadieron 50  $\mu$ l de suero de ratón (en una dilución 1:50), y se volvió a incubar durante una hora. Después de esto, se realizó otro lavado con solución de Tween 20 y se agregaron 50  $\mu$ l de anticuerpo anti-IgG de ratón específico para Fc –peroxidasa, producido en cabra (Sigma Aldrich) y se incubó 1 hr a 37°C. Se hizo otro lavado con Tween y se agregaron 50  $\mu$ l de solución de ABTS (2,2'-azino-bis(ácido 3-ethylbenzthiazolina-6-sulfónico)) en buffer de citratos. Finalmente se incubó 20 minutos a 37°C y se leyó la absorbancia a 405 nm.

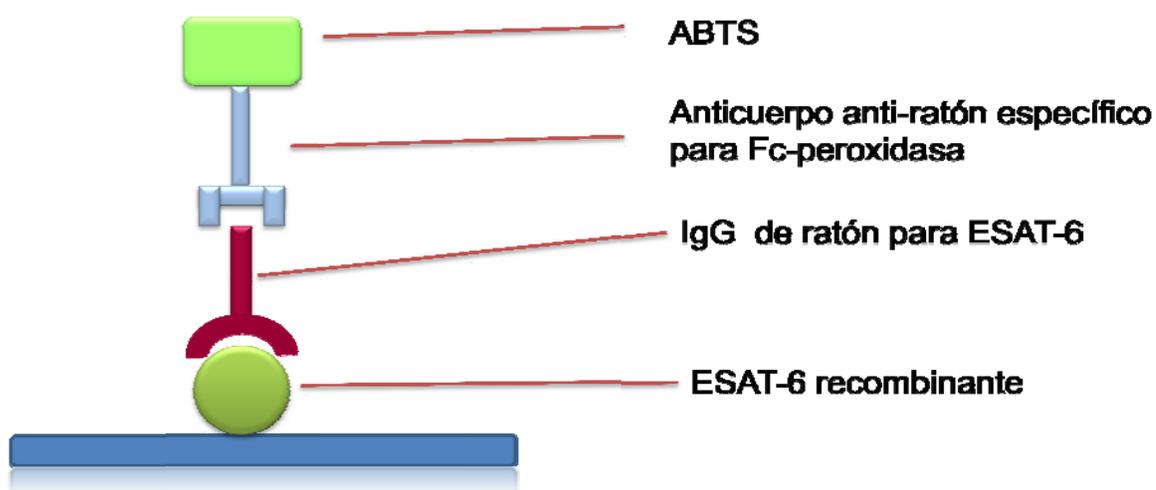


Figura 10.- Procedimiento propuesto para verificar el efecto inmunopotenciador de un extracto de polisacáridos solubles de *M. pyrifera*.

## VI. 5. Tratamiento de datos

Los resultados de la extracción de la proteína ESAT-6, del extracto algal y de la inmunización en ratones fueron colocados en una hoja de cálculo Excel y se analizaron con pruebas de estadística descriptiva y ANOVAs de una sola vía usando la paquetería Sigma Plot 11 y Sigma Stat. 3.1.

Se aplicaron las pruebas estadísticas sugeridas en Sigma Plot y Sigma Stat para determinar si existía una diferencia significativa en el rendimiento en la extracción de las fracciones de polisacáridos de *M. pyrifera*.

Se aplicó además una prueba estadística no paramétrica (ANOVA de una vía), con un intervalo de confianza del 95%, para determinar el efecto inmunomodulador del extracto de polisacáridos solubles de *M. pyrifera*. En el caso de que los datos no cumplieren con los supuestos de normalidad y de homocedasticidad se aplicaron pruebas no paramétrica.

## VII. RESULTADOS

---

### VII. 1. Extracción de polisacáridos solubles en agua de *Macrocystis pyrifera* (Rioux, et al, 2007).

La extracción de las dos fracciones de polisacáridos solubles de *M. pyrifera* fue una modificación del procedimiento propuesto por Rioux *et al.* (2007). El procedimiento se realizó tres veces para verificar la reproducibilidad, y en todos los casos se usaron 30.00 g de *M. pyrifera*, secada al sol y molida, colectada en la localidad de Eréndira, Baja California México., en la estación de otoño. Después de las extracciones sucesivas con etanol para remover los pigmentos y las proteínas, cuyo sobrenadante fue desechado, se procedió a la extracción en condiciones básicas con cloruro de calcio al 2%, en donde se obtuvo la fracción A, a una proporción promedio de 13.20 % w/w con respecto a la muestra total de alga seca, y con una desviación estándar de 5.43 (Tabla II). Los datos presentan normalidad, y de acuerdo a la prueba de análisis de varianza de una sola vía ( $F = 49495.88^{***}$ ,  $P < 0.001$ ) hay diferencias altamente significativas entre las réplicas, con un intervalo de confianza del 95%, las cuales se deben probablemente a que la extracción se realizó en un baño de agua, con algunas fluctuaciones de temperatura.

La proporción promedio de la fracción B con respecto a la muestra inicial fue de 3.14, con una desviación estándar de 1.32. Los datos presentan normalidad y de acuerdo a la prueba t-student ( $t = -76.410^{***}$  con 4 G.L.,  $P = < 0.001$ ) se observan diferencias altamente significativas entre las réplicas (Tabla III).

Tabla II.- Rendimiento en la extracción por solventes en condiciones alcalinas para la fracción A de polisacáridos de *M. pyrifera*.

	Fracción A obtenida(g)	Volumen inicial (ml)	Volumen total (ml)	Proporción (w/w) %
A1	4.55	350.00	166.00	15.17
A2	2.12	300.00	131.00	7.06
A3	5.21	300.00	194.00	17.37
Promedio	3.96	316.67	163.67	13.20
StDv	1.63	28.87	31.56	5.43

Tabla III.- Rendimiento en la extracción por solventes en condiciones ácidas para la fracción B de polisacáridos de *M. pyrifera*.

	Fracción B obtenida (g)	Volumen inicial (ml)	Volumen total (ml)	Proporción (w/w) %
B1	0.66	360.00	188.00	2.21
B2	1.22	300.00	232.00	4.07
Promedio	0.94	330.00	210.00	3.14
StDv	0.39	42.43	31.11	1.32

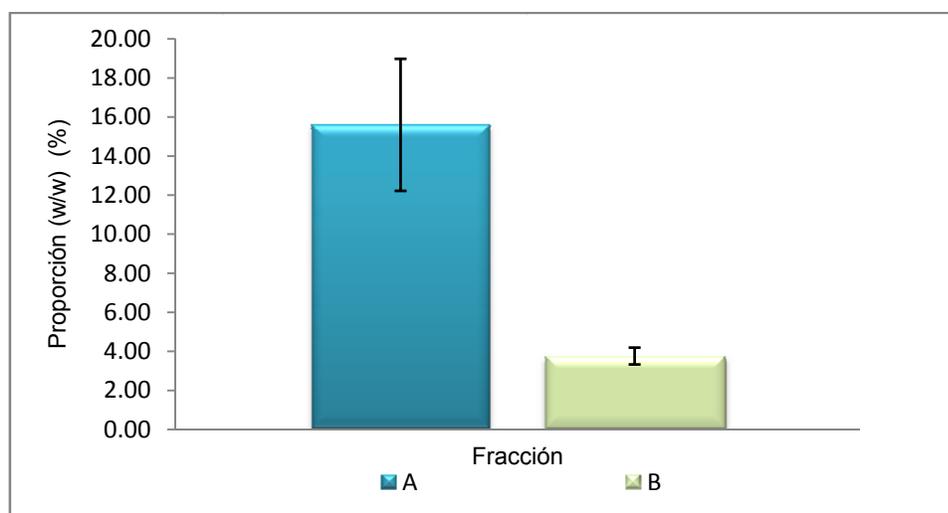


Figura 11.- Rendimiento del procedimiento de extracción de polisacáridos solubles de *M. pyrifera* (w/w) con respecto a la muestra inicial.

## VII. 2. Expresión de ESAT-6 recombinante (Lugo-Fabres, 2009)

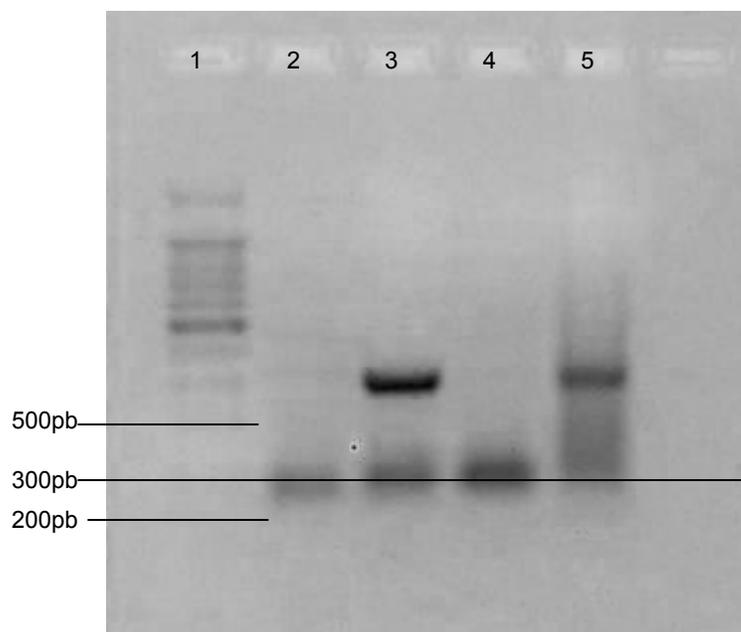


Figura 12.- Gel de agarosa al 2% de las clonas L3 y L4 para verificar la expresión de la proteína recombinante ESAT-6 (Lugo-Fabres, 2009). (Carril 1: escalera, carril 2: control negativo, carril 3: inserto de ESAT-6 como control positivo, carril 4: clona L3; carril 5: clona L4).

Las clona L4 dio positiva a la presencia del gen que codifica para ESAT-6 recombinante fue la clona L4, observándose una banda de 300 pb (Figura 12).

Por medio del ELISA directo se verificó la presencia de la proteína ESAT-6 y se determinó que las clonas L3 y L4 expresaban la proteína de interés (Figura 13); sin embargo, se seleccionó L4 para posteriores ensayos debido a que presentaba una mejor eficiencia.

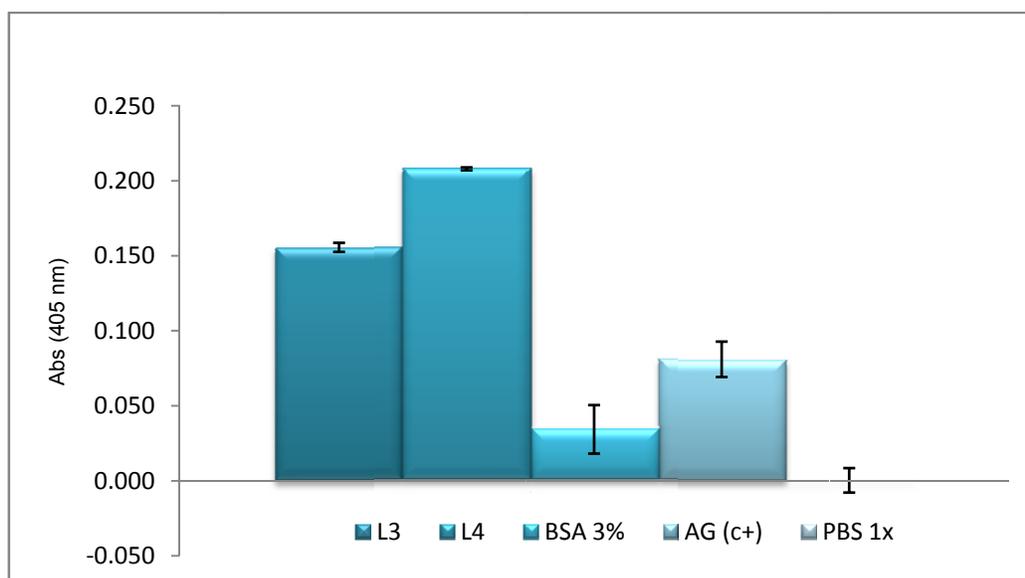


Figura 13.- ELISA directo de expresión para las clonas L3 y L4 resultado de la ligación del inserto que codifica para la proteína ESAT-6 recombinante. (el control positivo es la proteína ESAT-6 purificada por Lugo-Fabres (2009)).

Después de purificar por cromatografía de afinidad a metales, se observó mediante un ELISA directo de expresión que aunque se encontró la presencia de ESAT-6 recombinante en los buffers de cargado, equilibrado y lavado debido a la baja eficiencia del método, la fracción purificada presenta la proteína de interés (Figura 14).

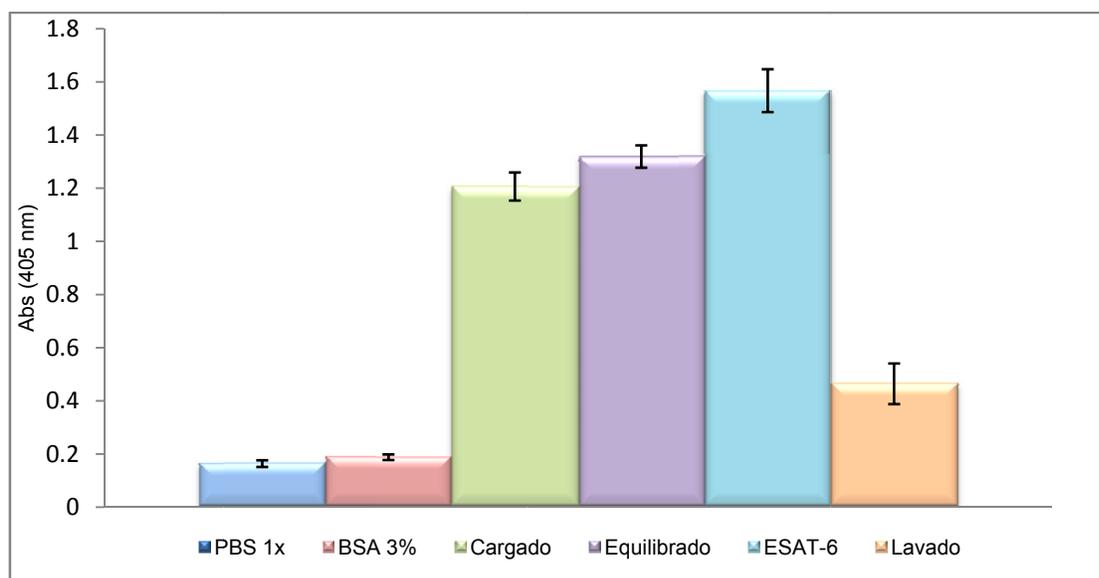


Figura 14.- ELISA directo de expresión de ESAT-6 recombinante después de la purificación en columna por afinidad con metales.

En cuanto a la determinación de la concentración de la proteína purificada, la regresión lineal de la curva de calibración de estándares de albúmina sérica presentó una  $r^2$  de 0.9951 y dentro de ésta se interpoló el valor de absorbancia medido en la muestra (Figura 15). La concentración final de ESAT-6 recombinante purificada fue de 9.92  $\mu\text{g/ml}$ .

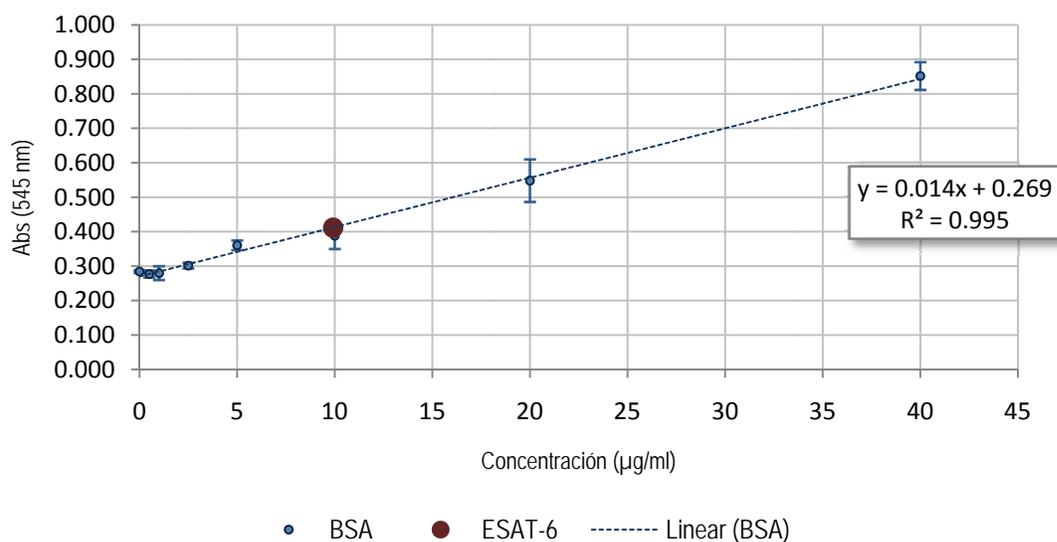


Figura 15.- Concentración de la proteína recombinante ESAT-6 purificada, por el método de micro BCA™.

### VII. 3. ELISA de reconocimiento

Los resultados obtenidos por medio del inmunoensayo ELISA para medir anticuerpos IgG contra ESAT-6 en el suero de ratones inyectados intraperitonealmente con las fracciones del extracto de polisacáridos solubles de *M. pyrifera*, no presentan diferencias significativas aparentes después de hacer un análisis estadístico descriptivo de los datos (Figura 16).

Las fracciones A y B fueron administradas en tres dosis 5, 50 y 100 µg/ratón y al realizar una prueba ANOVA de una vía no se encontraron diferencias estadísticas significativas dependientes de la dosis (Tabla IV).

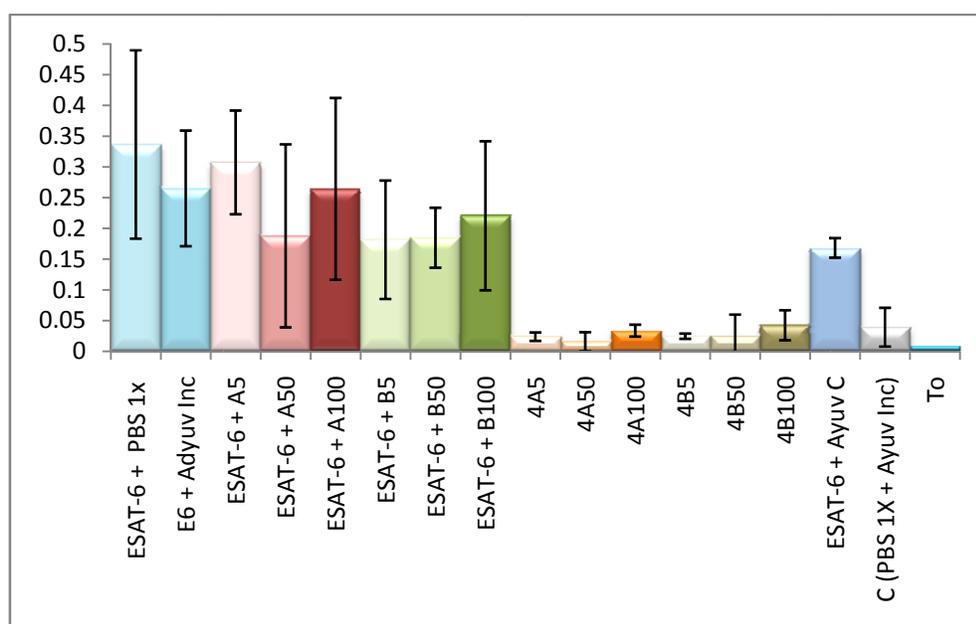


Figura 16.-ELISA indirecto de expresión para determinar la respuesta humoral (cantidad de anticuerpos IgG para ESAT-6) a las fracciones A y B de polisacáridos solubles de *M. pyriferus* medida en suero de ratones inyectados intraperitonealmente.

Tabla IV.- ANOVA de una vía para dentro de cada grupo con un intervalo de confianza del 95%

Grupo	F	P	Diferencia
A+ESAT-6	0.645	0.558	No hay diferencias significativas
A	1.924	0.226	No hay diferencias significativas
B+ESAT-6	0.160	0.856	No hay diferencias significativas
B	1.101	0.392	No hay diferencias significativas

De acuerdo a la prueba de Turkey de múltiples comparaciones entre grupos, no se observaron diferencias significativas entre los extractos y el control negativo (suero no inmune), sin embargo, sí hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos inyectados con la proteína recombinante (incluyendo a los controles positivo con ESAT-6 + PBS 1x, y ESAT-6 recombinante + adyuvante incompleto de Freund) (Figura 17).

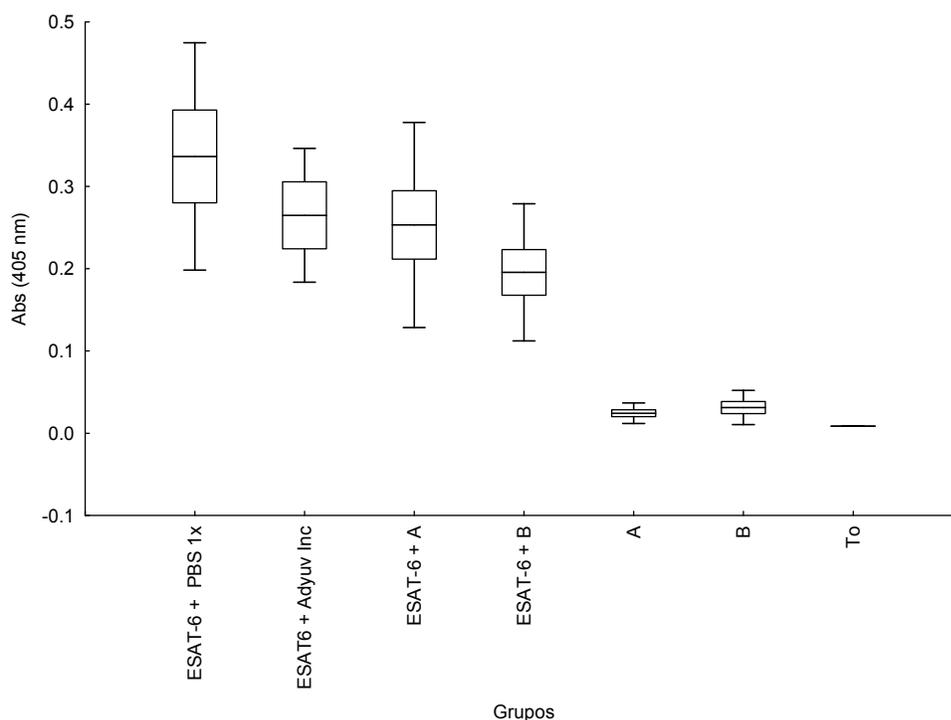


Figura 17.- Diagrama de cajas para los diferentes grupos experimentales para determinar la respuesta inmune humoral de los extractos de polisacáridos solubles de *M. pyrifera*. (Las cajas representan la media más el error estándar, y las barras representan la media más la desviación estándar).

## VIII. DISCUSIÓN

---

Los rendimientos de extracción para las fracciones A y B de polisacáridos solubles de *M. pyrifera* fueron muy diferentes a los reportados por Rioux *et al* (2007) para diferentes especies de algas analizadas por el mismo método.

Se observan diferencias altamente significativas entre las réplicas de ambas fracciones, a partir de que el procedimiento de extracción no está descrito detalladamente, y las diferencias pueden ser atribuibles a la variación en el protocolo de extracción (Rioux, et al, 2007).

Rioux y colaboradores caracterizaron las fracciones de polisacáridos solubles de tres especies de algas; *Ascophyllum nodosum* y *Fucus vesiculosus* pertenecientes a la familia Fucaceae y *Saccharina longicuris*, de la familia Laminariaceae (al igual que *M. pyrifera*) y obtuvieron mediante el mismo método usado en el presente trabajo que la fracción A representaba  $\approx 2\%$ , y la fracción B  $\approx 1.3\%$  con respecto al peso seco total de la muestra de alga, los cuales fueron consistentes con los trabajos previos de Souchet (2004) y Percival (1973) (Rioux, et al, 2007).

Los laminarianes, fucoidanes y ácidos algínicos son los polisacáridos más abundantes en las algas pardas; su contenido varía del 40-80 % del peso seco de la biomasa total del alga. El contenido y la estructura de los polisacáridos solubles en agua de las diferentes fuentes depende de muchos factores

ambientales como la localización y las diferencias estacionales (Zvyagintseva, et al, 2003), además del método de extracción de éstos (Leung, et al, 2006).

Castro-González y colaboradores hicieron un estudio para determinar la composición de *M. pyrifera* procedente de Bahía Tortugas, Baja California México, y encontraron que los carbohidratos son los componentes principales de esta alga en diferentes estaciones, sin embargo, determinaron que la proporción de éstos en invierno ( $\approx 50.6\%$ ) aumenta con respecto a la de primavera ( $\approx 46.27\%$ ), los cuales son principalmente polisacáridos complejos (Castro-González, Carrillo-Domínguez, & Pérez-Gil, 1994). En algunos estudios se demostró que los mantos presentan la mayor cantidad de biomasa superficial en verano y los menores en otoño, sin embargo, las mayores tasas de crecimiento se observaron en invierno, seguido por otoño, primavera y verano (Hernández-Carmona, 1996), lo que indica que la muestra usada en este estudio fue colectada en el periodo de máximo crecimiento, el cual está asociado con una alta producción de polisacáridos estructurales de la pared celular, por lo cual se obtuvieron altos rendimientos (Figura 11) en la extracción de las fracciones A y B.

Con el fin de determinar variaciones en la respuesta inmune humoral se usó la proteína ESAT-6 de *M. tuberculosis*, la cual se ha demostrado que es un antígeno altamente inmunogénico en muchas especies ya que tiene una unión específica con los macrófagos primarios modulando la respuesta inmune del huésped (Renshaw, et al., 2005).

Debido a que *Mycobacterium tuberculosis* es altamente patógeno y se requieren precauciones especiales para su manipulación, se transformó el gen que codifica para ESAT-recombinante (Lugo-Fabres, 2009) en la bacteria *E. Coli*

(TOP-10). Fueron necesarias varias inducciones de la proteína, ya que en la purificación de ésta se obtuvo en concentraciones muy bajas, debido a la competencia por los sitios de coordinación del  $\text{Ni}^{2+}$  de la columna HisTrap™ con el imidazol del buffer de equilibrado. Sin embargo, se obtuvo la cantidad suficiente para la inoculación de los animales experimentales.

En cuanto a la determinación de la respuesta humoral por medio de un inmunoensayo ELISA indirecto, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las tres concentraciones de extracto. Tampoco hay diferencias significativas entre las fracciones(A y B), ya sea administradas solas o junto con la proteína modelo.

Al no haber diferencias entre la producción de anticuerpos entre los grupos a los que se les administró el extracto solo, se puede asumir que ninguna de las fracciones modifica la respuesta inmune humoral inespecífica.

Sin embargo, sí se observan diferencias estadísticamente significativas en la producción de anticuerpos con respecto al suero no inmune en los grupos inyectados con ESAT-6, con lo que se puede asumir que sí hay una respuesta humoral al antígeno, la cual no fue modificada por ninguna de las fracciones del extracto, por lo tanto, se puede asumir que estos compuestos no tienen ningún efecto como adyuvante para la ESAT-6.

En un estudio previo se demostró que ni el fucoidán ni el laminarián de un extracto alcohólico de *M. pyrifera*, inyectados ambos a una concentración de 100  $\mu\text{g}$  / ratón, mostraron algún efecto en la cinética de respuesta inmune

humoral en ratones, la cual se determinó por medio de hemaglutinación de anticuerpos contra glóbulos rojos de borrego (Ragan y Bird, 1987).

En las últimas décadas, el estudio de los efectos inmunomoduladores de los polisacáridos solubles de naturaleza similar a la de los obtenidos en algas pardas como *M. pyrifera*, se ha centrado en compuestos obtenidos a partir de levaduras (Zymosan, Betafectina, y Macrogard), hongos (Krestin, Lentinan, Schizophyllan, Grifolan, Scleroglucan) y algunas algas pardas (Laminarin y Laminarián) (Soltanian, et al, 2009), por lo que no hay datos suficientes comparables con los resultados de este estudio.

Kim y colaboradores (1996) encontraron que había un aumento en la producción de linfocitos B al inyectar intraperitonealmente un extracto de polisacáridos del hongo *Phellinus linteus* ( $\beta$ -D glucano) a una concentración de 200  $\mu$ g/ratón.

En 2006, Yang y colaboradores determinaron que había una correlación significativa entre la dosis de los polisacáridos de *C. pyrenoidosa* inyectados intraperitonealmente en ratones y el título de anticuerpos aumentó de manera significativa con la concentración de polisacáridos (1000, 2000, y 4000  $\mu$ g/ratón). Por lo cual, llegaron a la conclusión de que los polisacáridos de *C. pyrenoidosa* pueden aumentar significativamente la activación de linfocitos B para producir más anticuerpos. Asumieron que el aumento en la sensibilidad de la respuesta de los anticuerpos dependiente de linfocitos-T se era derivada de la acción aditiva de los polisacáridos con los macrófagos, células T ayudadoras y células B las cuales actúan de manera coordinada en la inmunización, activación y producción de anticuerpos.

## IX. CONCLUSIONES

---

### IX. 1. Con respecto al objetivo general:

Con este método, no hay evidencias para determinar una modificación en la respuesta inmune humoral en ratones con respecto a la proteína modelo ESAT-6 con ninguna de las fracciones de polisacáridos hidrosolubles de *M. pyrifera*,

### IX. 2. Con respecto a los objetivos particulares:

Se obtuvieron dos fracciones de polisacáridos solubles de *Macrocystis pyrifera* con diferencias significativas entre las réplicas atribuibles a la precisión del método de extracción.

No se encontraron diferencias significativas en la respuesta humoral con las fracciones A y B administradas solas con respecto al control negativo, por lo que no hay evidencia suficiente para determinar que estos compuestos tengan un posible uso como prebióticos.

No se observó diferencia significativa en producción de anticuerpos IgG contra ESAT-6 al administrar los extractos de manera simultánea con la proteína modelo ESAT-6 recombinante, por lo cual se descarta su posible uso como adyuvante inmunológico para antígenos protéicos.

## X. REFERENCIAS

---

Adams, D. S., Pero, S. C., Petro, B. J., Nathals, R., Mackin, W. M., Wakshull, E. (1997). PGG-Glucan activates NF-kB-like and NF-IL-6-like transcription factor complexes in a murine monocytic cell line. *J. Leukoc. Biol.* , 62:865-873.

Adams, E. L., Rice, P. J., Grave, B., Ensley, H. E., Yu, J., Brown, G. D. (2008). Differential high affinity interaction of Dectin-1 with natural and synthetic glucans is independent upon primary structure and is influenced by polymer chain length and side-chain branching. *jj pharmacolExper Ther* , 325 (1): 115-123.

Berteau, O., Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties. *Glycobiology* , 13 (6): 29R-40R.

Boisson-Vidal, C., Haroun, F., Ellouali, M., Blondin, C., Fischer, A., De Agostini, A. (1995). Biological activities of. *Drugs Fut.* 20: 1237-1249.

Boraso, A., & Saixso, J. *Atlas de Sensibilidad Ambiental de la Costa y el Mar Argentino.*

Brown, G. D., Gordon, S. (2003). Fungal beta-glucans and mammalian. *Immunity* , 19: 311-315.

Brown, G. D., Gordon, S. (2005). Immune recognition of fungal b-glucans. *Cellular Microbiology* , 7 (4): 471-479.

Castro-González, M. I., Carrillo-Domínguez, S., Pérez-Gil, F. (1994). Composición química de *Macrocystis pyrifera* (sargazo gigante) colectado en verano e invierno y su posible empleo en alimentación animal. *Ciencias Marinas* , 20 (1): 33-40.

Gartner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S., Underhill, D. M. (2003). Collaborative induction of inflammatory responses by Dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* , 197: 1107-1117.

Hernández-Carmona, G. (1996). Tasas de elongación de frondas de *Macrocystis pyrifera* (L.) AG. en Bahía Tortugas, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas* , 22 (1): 57-72.

Jung, K., Ha, Y., Han, D. U., Kim, D. W., Moon, W. K. (2004). Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. *J Vet Med B Infec Dis Vet Public Health* , 51: 72-76.

Kim, H. M., Han, S. B., Oh, G. T., Kim, Y. H., Hong, D. H., Hong, N. D. (1996). Stimulation of humoral and cell mediated immunity by polysaccharide from mushroom *Phelinus Linteus*. *Int. J. Pharmac.* , 18 (5): 295-303.

Leung, M., Liu, C., Koon, J., Fung, K. (2006). Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters* , 105: 101-114.

Li, B., Lu, F., Wei, X., & Zhao, R. (2008). Fucoidan: Structure and Bioactivity. *Molecules* 13: 1671-1695.

Lugo-Fabres, P. (2009). *Desarrollo de una prueba de detección de Mycobacterium tuberculosis por medio de hemaglutinación*. Tesis de Licenciatura. Universidad Xochicalco. 54 pp.

Mayer, A. M., Krotz, L., Bonfil, R. D., Bustoubad, O. D., Groisman, J. F., de Lederkremer, R. M. (1987). Biological activity in *Macrocystis Pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminarian. I. Antitumor, cytotoxicity and humoral immune response. *Hydrobiologia* 151/152: 483-487.

Neyrinck, A. M., Mouson, A., Delzenne, N. M. (2007). Dietary supplementation with laminarin, a fermentable marine  $\beta$  (1-3) glucan, protects against hepatotoxicity induced by LPS in rat by modulating immune response in hepatic tissue. *International Immunopharmacology* , 7: 1497-1506.

Novak, M., & Vetvicka, V. (2008).  $\beta$ -Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action. *Journal of Immunotoxicology* 5: 47-57.

Percival, E. (1979). The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *Br. phycol. J.* 14: 103-117.

Ragan, M. A., Bird, C. J. (1987). Biological activity in *Macrocystis pyrifera* from Argentina: sodium alginate, fucoidan and laminaran. I. Antitumor, cytotoxicity and humoral immune response. *Hydrobiologia* , 151/152: 483-489.

Renshaw, P. S., Lighthbody, K. L., Veverka, V. V., Muskett, F. W., Kelly, G., Frenkiel, T. A.(2005). Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factor CF-10 and ESAT-6. *THE EMBO JOURNAL* , 24 (14): 2491-2498.

Reynolds, J. A., Kastello, M. D., Harrington, D. G., Crabbs, C. L., Peters, C. J., Jemski, J. V.(1980). Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infection and Immunity* , 30: 51-57.

Rioux, L. E., Turgeon, S. L., Beaulieu, M. (2007). Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers*. 69: 530-537.

Rosas-Aguilar, R., Aguilar-Rosas, L., González-Yajimovich, O. (1999). Nuevos registros y algunas notas para la flora algal marina de la costa occidental del estado de Baja California, México. *Polibotánica*. 10:111-121.

Ross, G. D., Vetvicka, V., Yan, V., Xia, J., Vetvickova, J. (1999). Therapeutic intervention with complement and beta-glucan in cancer. *Immunopharmacology* , 42: 61-74.

Sakurai, T., Hashimoto, K., Susuki, I., Ohno, N., Oikawa, S., Masuda, A.. (1992). Enhancement of murine alveolar macrophage functions by orally administered beta-glucan. *Int J Immunopharmacol* , 14: 821-830.

Schepetkin, I. A., Qunn, M. T. (2006). Botanical polysaccharides: Macrophage modulation and therapeutical potential. *International Immunopharmacology*, 6: 317-333.

Soltanian, S., Struyven, E., Cox, E., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2009). Beta-glucans as immunostimulant in vertebrates and invertebrates. *Critical Reviews in Microbiology* , 35 (2): 109-138.

Tzianabos, A. (2000). Polysaccharide Immunomodulators as Therapeutic Agents: Structural Aspects and Biologic Function. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* , 13 (14): 523-533.

Vetvicka, V., Yvin, J.-C. (2004). Effects of marine beta-1,3 glucan on immune reactions. *International Immunopharmacology* (4), 721-729.

Xiao, Z., Trincado, C. A., Murtaugh, M. P. (2004). Beta-glucan enhancement of T cell INF-gamma response in swine. *Vet Immunol. Immunopathol.* , 102: 315-320.

Yang, F., Shi, Y., Sheng, J. (2006). In vivo immunomodulatory activity of polysaccharides derived from *Chlorella pyrenidosa*. *Eur Food Res Technol*, 224: 225-228.

Zeckvic, D., Vrvic, M., Jakovljevic, D., Moran, C. (2005). Natural and Modified (1-3)-b-D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25: 205-230.

Zvyagintseva, T. N., Schvchenko, N. M., Popivnich, I. B., Isakov, V. V., Scobun, A. S., Sundukova, E. V., (1999). A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydrate Research*, 322: 32-39.

Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., Chizhov, A. O., Krupnova, T. N., Sundukova, E. V., Isakov, V. V. (2003). Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 294: 1-13.