

FACULTAD DE FARMACIA ESCUELA  
 DE QUÍMICA Y FARMACIA  
 LABORATORIO DE QUÍMICA DE METABOLITOS BIOACTIVOS (LAQUIMEB)  
 LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA (LADETOX)  
 LABORATORIO DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS - UCN

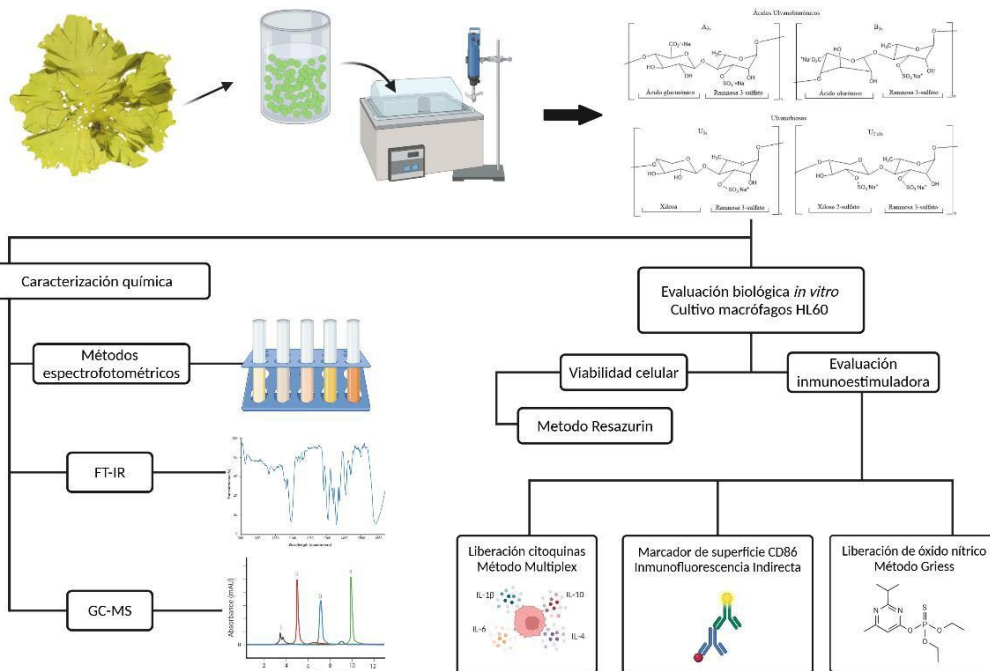
## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL POLISACÁRIDO ULVANO Y EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL ACTIVIDAD COMO ADYUVANTE DE VACUNAS

Tesis para optar al Grado de  
 Magister en Bioactividad de Productos Naturales y de Síntesis

VALESKA NATALY GUEVARA TORREJÓN

Directoras de Tesis: Dra. Waleska Vera Quezada  
 Dra. Carolina Campos Estrada

Co-directora de Tesis: Dra. Paola Chandía Parra



## ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Respuesta inmune.....	1
1.2 Polarización de macrófagos .....	2
1.3 Desarrollo de vacunas.....	3
1.4 Adyuvantes de vacunas .....	4
1.5 Polisacárido soluble de algas verdes como posible adyuvante de vacunas.....	5
1.6 Relación estructura/actividad inmunoestimulante del polisacárido soluble ulvano .....	7
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVOS .....	11
1.1 General.....	11
1.2 Objetivos Específicos .....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
1.1 Estándares utilizados .....	12
1.2 Obtención, tratamiento y extracción desde material algal.....	12
a) Recolección de algas.....	12
b) Tratamiento preliminar y extracción de polisacárido soluble.....	12
1.3 Caracterización química de ULV .....	13
a) Métodos espectrofotométricos.....	13
b) Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa (GC-MS por sus siglas en inglés).....	14
c) Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR por sus siglas en inglés).....	16
1.4 Línea celular .....	16
1.5 Determinación de viabilidad celular .....	17
1.6 Actividad inmunopotenciadora .....	17
a) Marcadores de superficie CD86 por InmunoFluorescencia Indirecta (IFI).....	17
b) Liberación de citocinas por Multiplex .....	18
c) Ensayo de Óxido Nítrico (ON).....	18
1.7 Análisis estadístico .....	18

RESULTADOS.....	19
1.1 Extracción y caracterización química de ULV.....	19
a) Métodos espectrofotométricos.....	19
b) Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masa .....	19
c) Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier.....	21
1.2 Determinación de viabilidad celular.....	22
1.3 Actividad Inmunopotenciadora .....	22
a) Marcador de superficie CD86.....	22
b) Liberación de citocinas por Luminex® Multiplex Assays.....	24
c) Ensayo de Óxido Nítrico (ON).....	25
DISCUSIÓN .....	26
CONCLUSIÓN .....	35
REFERENCIAS.....	36

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema resumen de la respuesta inmune en humanos..	2
Figura 2. Estructura química de disacáridos repetitivos en la estructura de los ulvanos.	7
Figura 3. Estructuras químicas de condroitin sulfato, dermatan sulfato, Heparan sulfato y ácido hialurónico....	8
Figura 4. Esquema resumen de los procesos de pretratado algal y posterior extracción del polisacárido soluble ulvano a partir de algas del género <u>Ulva</u> recolectadas desde la playa Los Tubos de Algarrobo, región de Valparaíso.	13
Figura 5. Esquema resumen del proceso de derivatización del polisacárido soluble ulvano a acetatos de alditol.	15
Figura 6. Cromatograma GC-MS de muestras derivatizadas a acetatos de alditol.....	20
Figura 7. Espectro FT-IR de ulvano obtenido desde algas del género <u>Ulva</u> spp. en la región de Valparaíso. .	21
Figura 8. Evaluación de viabilidad celular por método de resazurin en línea celular HL60 diferenciada a macrófagos, incubadas a distintas concentraciones de adyuvantes de vacunas y ULV.....	22
Figura 9. Análisis cualitativo de la expresión de proteína CD86 en línea celular HL60 diferenciada a macrófagos, incubadas a distintas concentraciones de adyuvantes de vacunas y ULV.....	23
Figura 10. Expresión de citocinas en línea celular HL60 diferenciada a macrófagos, incubadas a distintas concentraciones de adyuvantes de vacunas y ULV..	24
Figura 11. Evaluación expresión de óxido nítrico por método Griess en línea celular HL60 diferenciada a macrófagos, incubadas a distintas concentraciones de adyuvantes de vacunas y ULV.....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales utilizadas para las evaluaciones en línea celular HL60 diferenciada a macrófagos murinos.....	16
Tabla 2. Caracterización de USP extraído desde pool de algas <i>Ulva</i> spp. ....	19
Tabla 3. Estándares de monosacáridos derivatizados a acetatos de alditol. ....	20
Tabla 4. Composición química de ULV extraído desde pool de algas <i>Ulva</i> spp derivatizados a acetatos de alditol.....	20
Tabla 5. Frecuencias de absorción teóricas y obtenidas experimentalmente por FT-IR en ULV.....	21

Ulvano es un heteropolisacárido sulfatado capaz de estimular y activar la respuesta inmune *in vitro*. El objetivo de esta investigación fue caracterizar y evaluar en un modelo de células humanas las propiedades inmunoestimulantes de ulvano extraído de *Ulva* spp recolectada en Algarrobo, Chile. El ulvano caracterizado por métodos espectrofotométricos arrojó que está compuesto por un 47,6% de azúcares totales, 14,3% de ellos corresponde a ácidos urónicos, 8,9% de sulfatos y peso molecular promedio de 40000. En cuanto al FTIR, las bandas de estiramiento y vibración a 3340,3  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a ácidos urónicos, a 2943,4  $\text{cm}^{-1}$  a ramnosa y a 1244,2  $\text{cm}^{-1}$  y 847,3  $\text{cm}^{-1}$  a los grupos sulfato. GC-MS confirmó la presencia de ramnosa, xilosa, glucosa y galactosa en la composición de ulvano. Se cultivaron células HL60 diferenciadas a macrófagos con tres concentraciones de ulvano (25, 50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) y la viabilidad celular fue superior al 90% en las menores concentraciones de ulvano. La acción inmunoestimulante indicó que ulvano es capaz de activar las moléculas coestimuladoras CD86, promover la liberación de citocinas IL-6, IL-10 e IL-4 y óxido nítrico. Los resultados indican que ulvano no es tóxico a ninguna concentración estudiada y puede activar vías inflamatorias que permitirían una activación controlada del sistema inmune, siendo un posible candidato para estudios como adyuvante de vacunas.