



Pontificia Universidad Católica Argentina
"SANTA MARÍA DE LOS BUENOS AIRES"
Vicerrectorado de Investigación e Innovación Académica

PLAN DE TRABAJO

Proyecto tipo A	X
Salud: aspectos biomédicos, psicológicos y espirituales.	X
Ambiente, energía y producción.	X

1. Introducción.

El potencial terapéutico antitumoral e inmunomodulador de los polisacáridos de paredes celulares de plantas y de macroalgas marinas.

1.a Resumen.

Diversos polisacáridos obtenidos de las paredes celulares vegetales y de las algas marinas exhiben propiedades terapéuticas beneficiosas tanto en animales como en humanos, que están relacionadas con sus actividades inmunomoduladoras y antitumorales. Estas actividades dependen del tipo de polisacárido utilizado, su grado de solubilidad en agua, el tamaño de la molécula, su forma y la presencia o no de cadenas laterales y otros sustituyentes en su esqueleto hidrocarbonado.

Existen dos familias de plantas que se destacan por su amplia utilización en la alimentación humana y animal: las leguminosas o fabáceas y las gramíneas o poáceas. La familia de las leguminosas presenta un alto contenido de polisacáridos pécticos en sus paredes celulares. Entre ellas se destaca *Lotus tenuis* por su plasticidad y subsistencia frente a distintos tipos de estrés (hídrico, salino, temperatura). En trabajos previos hemos obtenido diferentes extractos de pectinas de tallos y hojas de plantas de esta especie cultivadas en diferentes condiciones de salinidad que se utilizarán para evaluar su potencial terapéutico e inmunomodulador.

Por otra parte, hemos estudiado polisacáridos componentes de gramíneas, como los bambúes leñosos a partir de los cuales incluso se han obtenido xilooligosacáridos de estructuras bien definidas. Estos compuestos presentan un bajo peso molecular, por lo que su potencial como compuesto terapéutico sería mayor ya que beneficiaría su administración. Además, nuestro grupo se ha especializado en la obtención de polisacáridos de paredes celulares de algas marinas rojas y verdes, en particular, de polisacáridos sulfatados de una importante variedad de estructuras.

El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto de los mencionados polisacáridos sobre la progresión tumoral en diversos modelos experimentales de tumor, analizando sus efectos directos sobre la proliferación y muerte celular, así como también sus efectos sobre la modulación de las respuestas inmunes antitumorales.

El disponer de una variedad de polisacáridos y oligosacáridos nos permitirá ensayar y evaluar fuentes de estructuras diversas y nos brindará la posibilidad de descubrir compuestos con potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos para el cáncer.

2. Objetivo general:

Evaluar el potencial terapéutico e inmunomodulador de los polisacáridos pécticos y otros polisacáridos de paredes celulares vegetales de especies provenientes de diferentes tipos de plantas (leguminosas y gramíneas), así como de algas marinas abundantes en la costa argentina.

3. Objetivos específicos.

Trabajaremos con las líneas celulares de linfoma T, EL-4 y LBC, singeneicas con animales C57Bl/6 (C57Bl/6, H-2^b) y Balb/c (H-2^d) respectivamente; las líneas de melanoma B16F1 singeneicas con animales C57Bl/6 y las líneas celulares de cáncer de mama 4T1 - y de pulmón LP07 singeneicas con animales BALB/c.

A partir de las mismas nos proponemos como objetivos específicos:

1. Evaluar el potencial terapéutico de los polisacáridos presentes en los extractos crudos de los tallos y hojas de las plantas de *Lotus tenuis* obtenidos con agua, soluciones de CDTA y carbonato de sodio.
2. También, se ensayarán polisacáridos y/o oligosacáridos provenientes de gramíneas (bambúes leñosos) y polisacáridos sulfatados de macroalgas marinas de estructuras bien caracterizadas.
3. Para ello, determinaremos mediante curvas dosis-respuesta, el efecto antitumoral evaluando su acción sobre la viabilidad celular y la inducción de apoptosis.
4. Con las muestras de los polisacáridos de tallos o de hojas de *Lotus tenuis* que inhiban el crecimiento de las células tumorales o induzcan su muerte, se procederá a purificar mediante métodos cromatográficos (cromatografía de permeación en geles y de intercambio iónico) y caracterizar los extractos que hayan mostrado mejores resultados en los ensayos preliminares de potencial terapéutico.
5. Evaluar la acción antitumoral *in vitro* (ver objetivo 1) diferencial o no de los polisacáridos purificados tanto de tallos como de hojas.
6. Confirmar el potencial terapéutico de las fracciones activas en modelos tumorales *in vivo* evaluando la inmunidad antitumoral. Para ello inocularemos s.c. las células tumorales antes mencionadas en ratones singeneicos, a fin de obtener tumores sólidos y se llevarán adelante los siguientes estudios que permitirán evaluar el comportamiento biológico de los tumores
 - 6.1. Evaluación del crecimiento tumoral e identificación de marcadores de proliferación y/o apoptosis celular.
 - 6.2. Análisis del desarrollo de metástasis espontáneas en aquellos tumores que así lo permitan.
 - 6.3. Evaluar la acción de las fracciones activas sobre la inmunidad antitumoral, es decir sobre el balance entre el contenido de células efectoras (NK, Tc) y de aquellas con actividad inmunosupresora (Treg, MDSC) dentro del infiltrado tumoral, en ganglios drenantes y no drenantes del tumor y en bazo de animales portadores de tumores singeneicos. Estos resultados nos permitirán evidenciar si los polisacáridos activan a las células citotóxicas antitumorales o evitan el desarrollo de células supresoras que facilitarían el desarrollo y la diseminación del tumor.
7. Evaluar diferentes formas de procesamiento y preservación de las fracciones extraídas que presenten potencial terapéutico. En especial se evaluarán técnicas de deshidratación y almacenamiento a temperatura controlada.

4. Antecedentes y Justificación.

Las plantas son dominantes en muchos de nuestros ecosistemas y gran parte de la adaptación de las mismas al medio depende de la evolución y diversidad de sus paredes celulares (Albersheim 2011). La función de estas paredes celulares será la de dar forma, rigidez, resistencia mecánica y protección frente a organismos patógenos, depredadores y adversidades medioambientales. Las paredes celulares de las plantas se comportan como una matriz químicamente dinámica (Somerville et al. 2004, Kesten et al. 2017). Por otra parte, las características químicas de las paredes celulares determinan la digestibilidad de las hojas y tallos, y son un aspecto fundamental de la calidad de las plantas como alimentos y forrajes (Minson 1990; Van Soest, 1994; Hayashi et al. 2005), tanto en su utilización como fuente de energía (por fermentación), fibra efectiva o incentivador del proceso de rumia, como por el estímulo del peristaltismo y del pasaje de alimentos por el tracto digestivo (Bondi 1988).

Nuestro grupo de investigación tiene un largo recorrido en el estudio de los polisacáridos de macroalgas marinas. En particular, nos hemos dedicado a las algas rojas (Rhodophyta) y las algas verdes (Chlorophyta) (Ciancia et al. 2020 a,b).

La mayoría de las algas rojas producen galactanos sulfatados en grandes cantidades (Usov 2011). Algunas de ellas tienen interés comercial debido a que a partir de ellas se obtienen hidrocoloides utilizados en diversas industrias, como alimentaria, cosmética, etc (Aminsen & Gálatas 2009). Sin embargo, hay muchas de ellas que no tienen polisacáridos con estas características, y se ha determinado que son interesantes objetos de estudio en función de sus propiedades biológicas (Fernández et al. 2014). Los polisacáridos de algas verdes marinas en general no han resultado útiles industrialmente hasta el momento, pero muchos de ellos presentan propiedades biológicas interesantes (Ciancia et al. 2010; Sun et al. 2018, 2020, Surayut et al. 2016, Han et al. 2021).

Dentro de las plantas, las leguminosas o fabáceas pertenecen a la segunda familia en importancia, después de las gramíneas o poáceas. Proveen el mayor aporte proteico vegetal en las dietas, tanto para el hombre, como para los animales en pastoreo (Graham & Vance 2003; Dita et al. 2006). *Lotus tenuis* es una leguminosa herbácea perenne, vulgarmente conocida como lotus, trébol pata de pájaro o lotus de hoja angosta. Su ciclo de producción forrajera es primavero-estivo-otoñal, y es muy importante en la región de la Pampa Deprimida o Cuenca del Salado en la provincia de Buenos Aires como resultado de su amplia plasticidad de desarrollo en distintas condiciones de estrés salino, encharcamiento y herbivoría.

Las paredes celulares de varias especies de leguminosas, como arveja, garbanzo, poroto, haba, alfalfa y soja, ya han sido estudiadas debido a su gran importancia económica (Albersheim 2011). En particular, en la pared celular de estas plantas se pueden distinguir dos dominios de polisacáridos: a-un dominio fibrilar, en el que predomina la celulosa, cuyas microfibrillas pueden estar interconectadas entre sí por diferentes tipos de hemicelulosas y b-un segundo dominio formado por polisacáridos amorfos con gran capacidad de retención de agua, las pectinas (Painter 1983; Buchanan 2000).

La celulosa es un polisacárido componente estructural clave de las paredes celulares vegetales. Es muy estable y completamente insoluble en soluciones acuosas. Respecto a su composición y enlaces, su estructura es simple. Está formada por cadenas lineales de β -1,4-glucanos. El tipo de unión β -1,4 determina que alternadamente una unidad de glucosa esté girada 180° respecto a la anterior dando una estructura disacáridica repetitiva, la celobiosa. Estas cadenas lineales se unen por uniones puente de hidrogeno en forma intra- e intermolecular, permitiendo la cristalización y la formación de microfibrillas de 3 a 5 nm de diámetro. Estas uniones puente de hidrógeno aportan rigidez y resistencia a las microfibrillas de celulosa, tan importantes para la función de sostén, defensa y estructural que aporta este compuesto a la pared celular vegetal.

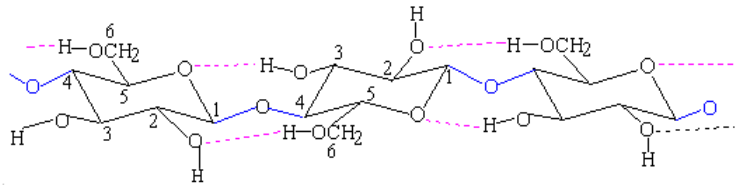


Figura 1: Estructura de una cadena de celulosa

Las hemicelulosas características de las paredes primarias de dicotiledóneas, como *Lotus tenuis* son los xiloglucanos, polímeros formados por cadenas lineales de β -D-glucopiranososa enlazada por la posición 4, con cadenas laterales de ramificaciones simples de α -D-xilopiranososa que se une a la cadena principal por el C-6 de algunas de las unidades de glucosa. A esta estructura básica se unen diferentes cantidades de otros azúcares, como α -D-galactopiranososa unida a C-2 de algunas de las unidades de xilosa, α -L-arabinofuranosa enlazada a C-2 de unidades de glucosa y α -L-fucopiranososa unida a C-2 de la galactosa. Aproximadamente, constituyen un 30% de las paredes celulares primarias.

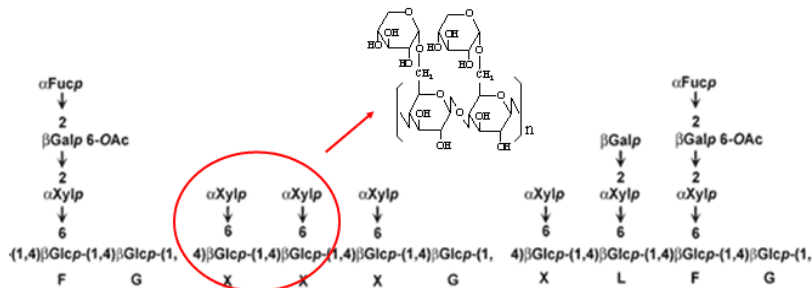


Figura 2: Estructura de un xiloglucano, con detalle de la cadena principal formada por D-glucosa unidas β -1,4 con ramificaciones de D-xilosa α -1,6

Por otra parte, las hemicelulosas predominantes en las paredes secundarias de dicotiledóneas son los glucuronoxilanos y los glucomananos. Los glucuronoxilanos tienen cadenas laterales de ácido 4-O-metil- α -D-glucurónico unido a C-2 de 1 cada 10 unidades de xilosa, en promedio. Este xilano presenta un alto grado de acetilación en C-2 y/o C-3 de las unidades de xilosa. Los glucomananos se encuentran en menor proporción y son polímeros lineales formados por unidades de β -D-manopiranososa y β -D-glucopiranososa en una relación que puede variar de 1:1 a 2:1.

El otro grupo importante de polisacáridos de las paredes celulares constituyen las pectinas, un grupo de polisacáridos con alta proporción de ácido α -D-galacturónico, de estructuras sumamente complejas. Se distinguen en este grupo el homogalacturonano, estructuralmente el más sencillo, formado por unidades de ácido D-galacturónico enlazadas por uniones α -1,4. Diferentes proporciones de los grupos carboxilo de los mismos pueden formar ésteres metílicos y esta sustitución regula la formación de geles por interacción con iones Ca^{2+} que da este polímero, contribuyendo a la regulación del tamaño de los poros de la pared celular.

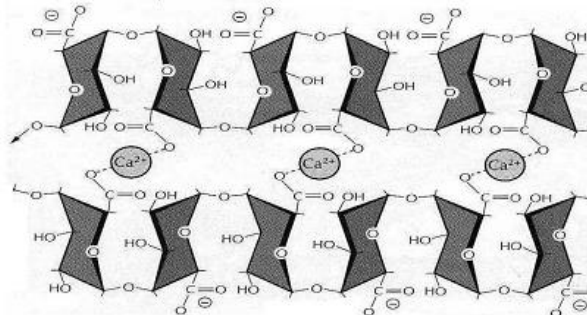


Figura 3: Estructura de pectina. Homogalacturonano

Existen diferentes homogalacturonanos modificados, como los xilogalacturonanos y los ramnogalacturonanos II (los polisacáridos más complejos existentes en la naturaleza). Por otro lado, el ramnogalacturonano I está formado por unidades alternantes de ácido α -D-galacturónico enlazadas por C-4 y α -L-ramnopiranosas enlazadas por C-2. A esta cadena pueden unirse cadenas laterales de arabinanos, galactanos o arabinogalactanos (Bar-Peled et al. 2011).

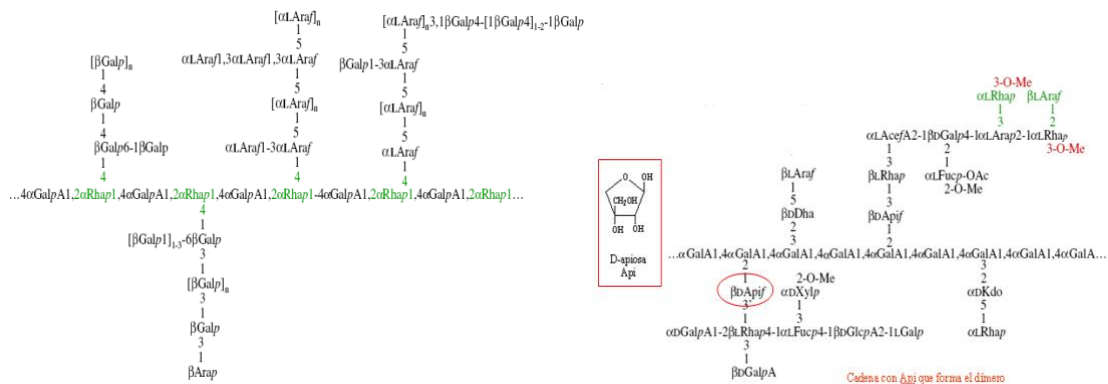


Figura 4: Estructura de una pectina. Ramnogalactouronano I y II

Cuando las células terminan de crecer, adquieren una forma y función definitiva que se caracteriza por un tipo particular de pared celular. La nueva pared que eventualmente comienza a depositarse entre la pared primaria y la membrana plasmática se define como pared secundaria. Se caracteriza por tener una mayor proporción de celulosa de mayor grado de cristalinidad y contiene además importantes cantidades de lignina.

Todos los componentes descritos se encuentran en las paredes celulares en diferente proporción y con diferentes interacciones entre sí, dando lugar a una red tridimensional muy compleja y embebida en diferentes proporciones de agua, cuya estructura varía según el tejido y edad de la planta, así como por factores ambientales (Braidwood et al. 2014).

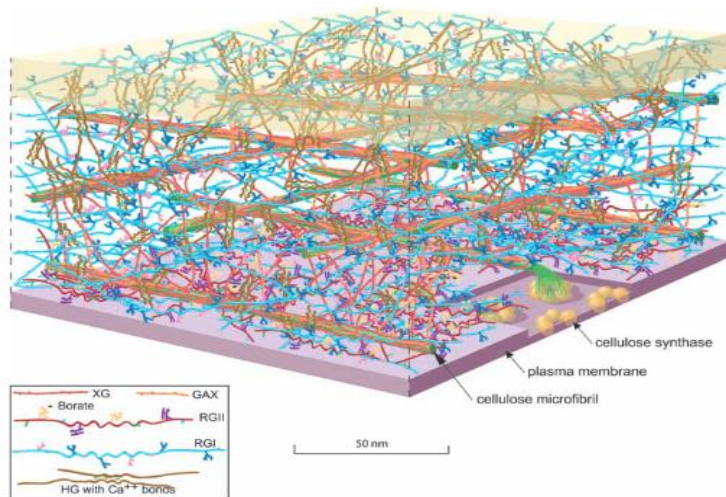


Figura 5: Modelo molecular a escala de la pared celular de una hoja de *Arabidopsis*. El contenido de cada polímero se basa en su razón respecto del contenido de celulosa. La cantidad de celulosa representada es menor que la real, para mayor claridad del esquema. XG: xilogalacturonanos, GAX: glucuronoarabinoxilanos, RGII: ramnogalacturonano II, RGI: ramnogalacturonano I, HG: homogalacturonano. Tomado de Somerville et al. 2004.

Las gramíneas presentan paredes primarias de tipo 2, que, a diferencia de las leguminosas tienen baja proporción de pectinas y hemicelulosas de diferentes tipos: cantidades importantes de glucuronoarabinoxilanos y glucanos mixtos. Como consecuencia, los rendimientos de los diferentes extracto son distintos. La extracción

acuosa da como resultado arabinogalactanos proteínas, pequeñas cantidades de pectinas y hemicelulosas de bajo peso molecular. Sería interesante realizar una separación de estos compuestos y realizar los análisis de los compuestos como inmunomoduladores y/o antitumorales por separado, ya que sus estructuras químicas son muy diferentes. Otros compuestos presentes en las paredes celulares de estos materiales no resultarán suficientemente solubles en agua como para tener interés a los fines de este proyecto (Zelaya et al. 2017, Fernández et al. 2019).

Por otra parte, en nuestro grupo se está realizando la obtención y purificación de xilooligosacáridos, conocidos por su acción prebiótica, antioxidante, etc. Estos compuestos se podrían ensayar, ya que tienen mucho potencial como compuestos bioactivos (Mendis & Simsek, 2014, Chen et al. 2021).

Las macroalgas marinas tienen paredes celulares con características parecidas a las de las plantas, en cuanto a que presentan un dominio fibrilar constituido por microfibrillas generalmente de celulosa y una importante matriz amorfa que en lugar de polisacáridos pécticos esta constituida por polisacáridos sulfatados (Usov 2011, Cosenza et al. 2017, Ciancia et al. 2020 a y b, Ponce & Stortz 2020, Kidgell et al. 2019). Se han reportado además en ciertos casos, pequeñas cantidades de polisacáridos similares a las hemicelulosas. Se supone que estos polisacáridos sulfatados son parte de la estrategia de adaptación de las algas al medio marino y las protegen de la desecación por su capacidad para absorber agua (hidrocoloides). Dependiendo de la estructura (composición en monosacáridos, grado y posición de sulfatación, presencia de ramificaciones de la cadena principal o de otros sustituyentes, como metoxilos, cetales de ácido pirúvico, etc.), estos polisacáridos presentan variadas bioactividades, entre ellas inmunomoduladoras y antitumorales (Armisen & Gaiatas 2009; Wijesekara et al. 2011; Jiao et al. 2011; Wang et al. 2013; Vasquez et al. 2013; Zhao et al. 2017; Huang et al. 2019; Cicinskas et al. 2019, 2020; Khotimchenko et al. 2020; Assef et al. 2021; Torres et al. 2021).

En los últimos años, varios polisacáridos naturales extraídos de plantas y algas han sido estudiados debido a su actividad biológica y su posible aplicación en la medicina (Drira et al. 2021). Se han descrito propiedades antioxidantes de los polisacáridos, así como también efectos antiinflamatorios, efectos sobre la actividad de células del sistema inmune y efectos antitumorales. (Schepetkin & Quinn 2006; Wang et al. 2014; Zhang et al. 2017; Yu et al. 2018; Nie et al. 2018; Ji et al. 2019; Drira et al. 2021).

La actividad antitumoral parece depender del tipo de polisacárido utilizado, su grado de solubilidad en agua, el tamaño de su molécula, su forma y la presencia o no de ramificaciones (Ji et al. 2017, 2017b; Shao et al. 2014, Wu et al. 2015). A mayor solubilidad en el agua y a mayor peso molecular del polisacárido, en general mayor será su actividad antitumoral (Ren et al. 2012). Entre los polisacáridos estudiados, las pectinas, que constituyen una familia de polisacáridos complejos, han mostrado tener una acción inhibitoria sobre varias líneas celulares tumorales (Maxwell et al. 2015).

La actividad antitumoral de los polisacáridos puede estar asociada a efectos directos sobre las células tumorales o a efectos sobre diferentes componentes del microambiente tumoral, que llevan finalmente a la regulación de la progresión de dichos tumores. Se ha demostrado que polisacáridos obtenidos de diversos vegetales inhiben el crecimiento de células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos animales. Los mecanismos involucrados en estos efectos incluyen daño mitocondrial, inducción de la apoptosis, arresto del ciclo celular y daño al DNA, todos procesos que llevan finalmente a la muerte de las células tumorales. Sin embargo, es importante destacar que en la mayoría de los casos estos efectos se ven a concentraciones de polisacáridos muy altas, mayores a 200ug/ml, lo cual hace difícil su utilización en pacientes.

Adicionalmente, se ha demostrado que algunos polisacáridos obtenidos de algas tienen la capacidad de regular la angiogénesis, ya que inhiben la proliferación y

la migración de células endoteliales. Además, pueden inhibir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en células tumorales y del receptor de VEGF en células endoteliales (Chen 2017b).

Además, diversos polisacáridos, obtenidos tanto de vegetales, como de algas y hongos han demostrado tener efectos sobre las respuestas inmunes antitumorales, siendo estos efectos dentro de los más importantes en su actividad antitumoral.

El sistema inmune tiene un papel dual en el desarrollo y progresión del cáncer. Por un lado, puede eliminar las células tumorales mediante la acción de células efectoras contra el tumor, como son las células *natural killer* (NK), y las células T citotóxicas (Tc). Pero, por otra parte, puede promover también el crecimiento y la diseminación tumoral regulando negativamente dichos mecanismos efectoros mediante células dendríticas (CD) plasmocitoides o tolerogénicas, células mieloides supresoras (MDSC) y diferentes tipos de células T reguladoras (Treg). Muchas evidencias sugieren que las células inmunes que infiltran los tumores y sus factores solubles contribuyen a la biología de muchos cánceres y se asocian con el resultado clínico de la enfermedad. De hecho, la presencia de células Tc (CD8⁺) en el infiltrado linfocitario tumoral se correlaciona con un buen pronóstico en varios tipos de cáncer (Sterle et al. 2016, 2021). Se considera entonces que uno de los mecanismos que las células tumorales activan para evadir al sistema inmune es la inmunosupresión, por lo tanto, un factor que promueva las respuestas inmunes efectoras en el huésped podría restaurar el balance dinámico entre las células tumorales y la respuesta inmune, y favorecer la respuesta antitumoral (Bao et al. 2013).

Varios trabajos han demostrado que algunos arabinogalactanos, galactomananos y polisacáridos pécticos derivados de plantas, β -glucanos y glicoproteínas derivadas de hongos y algunos polisacáridos sulfatados derivados de algas marinas poseen actividades inmunomoduladoras (Schepetkin & Quinn 2006; Ren et al. 2012; Zhao et al 2016, Li et al 2017; Rozi et al. 2019; Wang et al. 2019).

En particular, varios de estos compuestos han demostrado tener un efecto positivo sobre la proliferación, la secreción de granzimas y perforinas y la actividad citotóxica de las células NK (Ke 2014, Sun 2016, Park 2020). Algunos polisacáridos tienen la capacidad también de activar macrófagos y aumentar su capacidad fagocítica, promover la síntesis y secreción de factores como óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno, el factor de necrosis tumoral α (TNF α), las interleuquinas (IL) 1 β ; 2 y 6, aumentar su capacidad de presentación antigénica y de esta manera activar a los linfocitos T efectoras (Lee 2015, Wang 2010, Ma 2018, Yin 2019). Las células dendríticas también se ven afectadas por los polisacáridos derivados de plantas, hongos y algas. Estas células son fundamentales en el armado de las respuestas inmunes antitumorales ya que, a pesar de no tener un efecto tóxico directo sobre las células tumorales, están involucradas en el reconocimiento y la presentación de antígenos, activando a los linfocitos T citotóxicos. Los polisacáridos estimulan la maduración de las células dendríticas y también inducen un aumento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II y de moléculas co-estimuladoras como CD86 y CD80, lo cual favorece la presentación antigénica (Zhu 2016, Pang 2018, Yin 2019). Se ha demostrado también que los polisacáridos pueden inducir un aumento en la secreción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-6, y IL-12 por parte de las células dendríticas (Ghoneum y Agrawal 2011).

Asimismo, a pesar de no estar tan ampliamente descritos, los polisacáridos también han sido reportados como activadores de la proliferación de linfocitos B y de la producción de anticuerpos IgM por lo mismos, vinculados a un aumento de la inmunidad antitumoral (Zhang 2013). También se han demostrado efectos directos de polisacáridos sobre la proliferación y actividad de linfocitos T citotóxicos, así como también un aumento en la producción de IL-2 por los mismos tanto en los bazo de animales portadores de tumores como en muestras de sangre periférica de pacientes oncológicos (Shen 2013, Chen 2017). Adicionalmente se ha descrito también que algunos polisacáridos activan células T $\gamma\delta$, contribuyendo a sus efectos antitumorales (Inatsuka 2013)

Estos efectos de los polisacáridos están mediados principalmente por la activación de receptores tipo Toll (TLR) 4 y en menor medida por el TLR2, llevando a

la activación de la vía de las proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK) y el factor nuclear κ B (NF κ B) (Lee 2015, Pang 2018,).

Recientemente se ha descrito también la capacidad de algunos polisacáridos de disminuir los niveles de expresión de PD-L1 en células tumorales (Lopatina 2017), lo que llevaría a una mayor respuesta inmune antitumoral.

En la siguiente figura se resume la actividad inmunomoduladora de los polisacáridos.

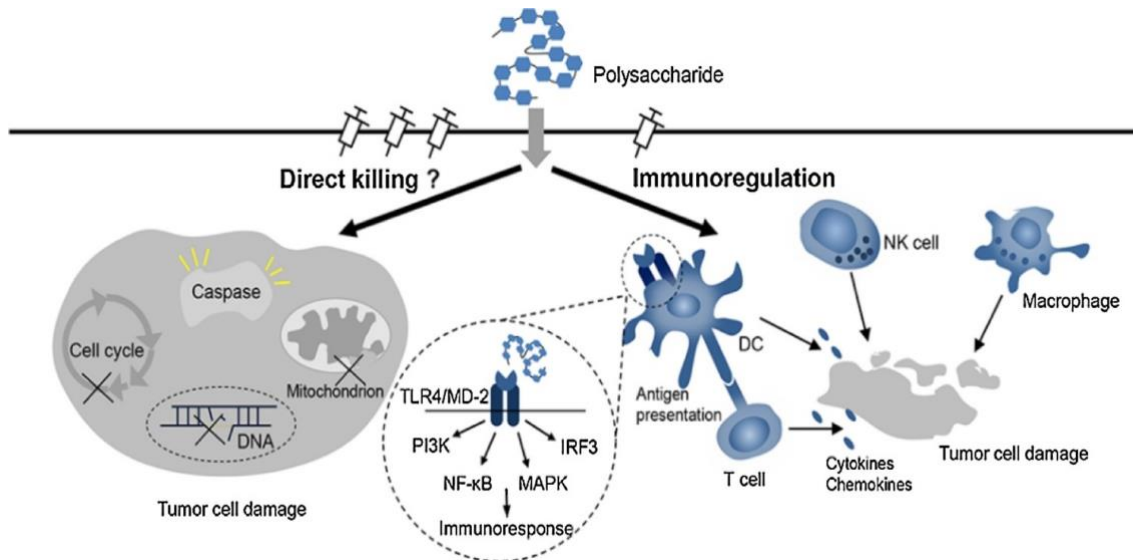


Figura 6: Actividad antitumoral de los polisacáridos (Pang 2018).

Otros polisacáridos, entre ellos derivados de la quitina, exhiben una citotoxicidad selectiva sobre las células tumorales sin afectar a células sanas (Khan 2019) y sin producir los efectos adversos asociados a otros tratamientos como la quimioterapia o la terapia antihormonal que producen anemia, alopecia e inmunosupresión. Se ha demostrado que otros polisacáridos utilizados como inmunomoduladores y que potencian las defensas antitumorales, pueden ser coadyuvantes de los agentes quimioterápicos, contribuyendo con su acción, ya que contrarrestarían los efectos secundarios inmunosupresores que dichos agentes provocan (Bao & Lan 2013).

La conservación de los compuestos orgánicos y su preservación en diferentes matrices permite mantener las características de las moléculas con propiedades bioactivas. Técnicas de deshidratación como el secado spray y la liofilización han sido extensamente utilizadas para la conservación de macromoléculas como los polisacáridos, permitiendo la obtención de productos en polvo estables físicamente con una extensa vida útil (Assadpour & Jafari 2019, Baeza & Chirife, 2021, Minjares-Fuentes et al, 2017). Es importante prevenir el colapso o caking de sistemas deshidratados, ya que estos fenómenos físicos afectan la solubilidad del producto y pueden impedir su disolución en un sistema acuoso (Chuy & Labuza, 1994). Para esto es importante evaluar la actividad de agua de los sistemas obtenidos y su estabilidad en el almacenamiento.

El cáncer es una de las enfermedades más serias que afectan la salud humana. De acuerdo con los datos publicados por la Agencia internacional de Investigación en cáncer (IARC) a nivel mundial se estiman anualmente más de 19.3 millones de nuevos casos y 10 millones de muertes debidas a cáncer (Li et al. 2017; Ferlay et al. 2021). Es imprescindible trabajar en la prevención y en la búsqueda de agentes antitumorales que presenten bajos efectos tóxicos para el paciente y un alto grado de efectividad contra el desarrollo de tumores. Los polisacáridos extraídos de las plantas y de las algas son naturales, no son tóxicos en su gran mayoría para el organismo humano y animal y, como ya describimos, algunos presentan funciones biológicas antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales e inmunoestimuladoras (García-Vaquero et al. 2016; Hentati et al. 2020; Kakar et al. 2020). La comparación de

la estructura y función de los biopolisacáridos en diversas especies tiene un enorme potencial significativo en agronomía, bioquímica, medicina y biotecnología (Chen et al 2018; Rozy et al. 2019).

4.1 Hipótesis de trabajo:

Ciertos polisacáridos pécticos obtenidos de las paredes celulares de los tallos y de las hojas de las plantas de *Lotus tenuis*, así como los polisacáridos sulfatados de algas tienen acción antitumoral directa y/o indirecta a través de la regulación de la inmunidad antitumoral. Por otra parte, los xilooligosacáridos de bajo peso molecular obtenidos de los bambúes leñosos podrían presentar una mejor dilución en los medios de cultivo y un accionar a menor concentración que los polisacáridos extraídos de *Lotus*.

5. Diseño experimental y Métodos.

5.1 Material a utilizar

Los polisacáridos pécticos se obtuvieron de plantas obtenidas a partir de semillas cedidas gentilmente por la Estación Experimental Agropecuaria Pergamino del INTA de la especie *Lotus tenuis* (Waldst. and Kit., syn. *L. glaber*) pertenecientes a una familia de medios hermanos (FMH) caracterizada por su susceptibilidad frente al estrés salino (Vago et al. 2021).

5.2 Extracción de los polisacáridos de las paredes celulares

Los polisacáridos fueron extraídos de las paredes celulares de tallos y hojas en forma secuencial siguiendo el procedimiento estándar (Fry 1998). En cada caso, cada suspensión obtenida fue centrifugada a 9500 rpm a 4°C (Hermle Z 323 K, Germany) obteniendo un residuo y dos sobrenadantes (extractos), que se trataron separadamente. Cada uno de ellos fue dializado y liofilizado para las determinaciones posteriores. Se obtuvieron en total para cada tratamiento once extractos, y un residuo final (Rf) (ver Figura 7) (Vago et al. 2021).

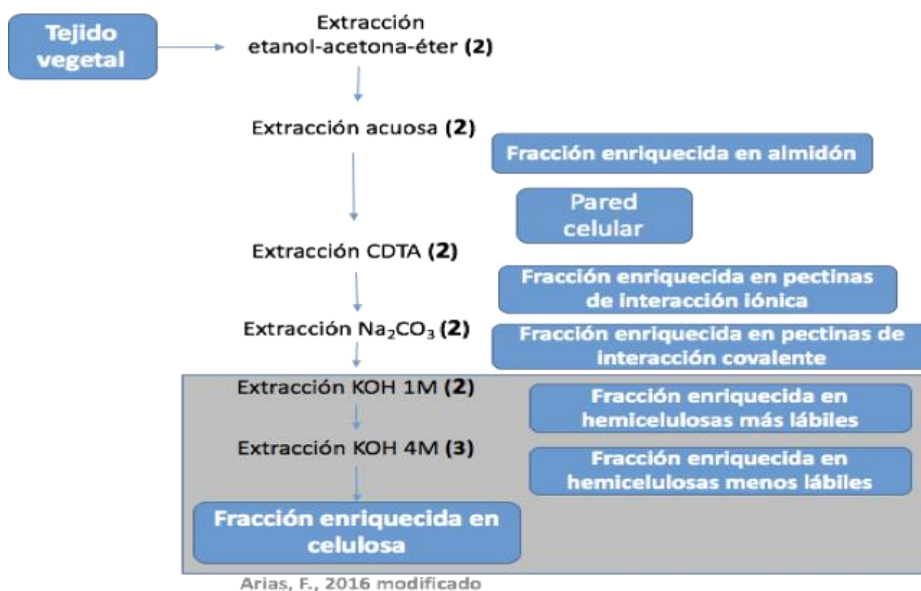


Figura 7: Extracción secuencial de paredes celulares. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente, salvo en los casos indicados. Los números entre paréntesis indican el número de extracciones secuenciales realizadas con cada solvente.

Un esquema similar de extracción se utilizó para la obtención de polisacáridos de bambúes. Los xilooligosacáridos se obtendrán por tratamiento con Driselase (un pool de enzimas comercial de bajo costo) y la mezcla de oligosacáridos se purificará por cromatografía de exclusión preparativa (Biogel P-2, P-6, Biorad). Los oligosacáridos obtenidos se analizarán por metodologías adaptadas a compuestos de bajo peso molecular.

Los polisacáridos de algas se obtendrán por extracción acuosa a temperatura ambiente.

5.3 Purificación y evaluación de la homogeneidad de los productos obtenidos:

Sobre los extractos obtenidos se procederá a:

1. Evaluar la homogeneidad de los extractos por las siguientes técnicas cromatográficas y posteriormente se elegirá la metodología adecuada para la realización de cromatografías preparativas: a) Cromatografía en geles de distinto tipo y tamaño de poro (Esteves et al 2009). Cromatografía de permeación en gel de alta resolución utilizando un detector de índice de refracción; b) Cromatografía de intercambio iónico se utilizará una resina catiónica fuerte, con sales de amonio cuaternario unidas a la fase (DEAE-Sephadex A-25, A-50 o similar) y así se intentará separar los diferentes polisacáridos en función de su carga, relacionada con el contenido de ácidos urónicos. De este modo, se logrará además la separación de polisacáridos neutros contaminantes y proteínas (si los hubiera).
2. Análisis de las fracciones obtenidas
 - a) Determinación del contenido total de hidratos de carbono (Dubois *et al.*1956; Ahmed 1977). Determinación de monosacáridos componentes por derivatización y análisis por cromatografía gaseosa y cromatografía gaseosa-espectrometría de masa por impacto electrónico (CG-EM) (Stevenson 1991), utilizando inositol como estándar interno.
 - b) Determinación del contenido de ácidos urónicos (Filisetti-Cozzi 1991) y aminoazúcares (Smith 1979) por métodos colorimétricos. Las muestras que presenten cantidades significativas se derivatizarán en la forma adecuada para realizar su identificación y cuantificación por medio de técnicas cromatográficas (Taylor 1972; Turner 1981). Determinación del contenido de proteínas solubles (Lowry 1951).
 - c) Estimación del peso molecular (Park 1949).
3. Estudio estructural de las fracciones en las que se hayan detectado cambios significativos:
 - a) Análisis por metilación (Ciucanu 1984).
 - b) Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (ATR-FTIR)
 - c) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear protónica, de ¹³C y utilizando distintas técnicas bidimensionales (UMYMFOR- FCEN-CONICET).
 - d) Espectrometría de masa UV-MALDI-TOF (CEQUIBIEM-FCEN-CONICET) y ESI-TOF (UMYMFOR-FCEN-CONICET) (Fukuyama et al 2002).

5.4 Estudios *in vitro*:

1. Evaluación de la acción de los polisacáridos o sus fracciones sobre la viabilidad tumoral en líneas celulares murina de linfoma T, melanoma, cáncer de mama y de pulmón.:

Para ello, las células serán incubadas por 48 horas con concentraciones crecientes de polisacáridos o sus fracciones y se cuantificará la viabilidad celular por conteo con Trypan Blue y ensayo de reducción de rezasurina (Cell Titer Blue assay). Estos resultados se confirmarán evaluando la proliferación celular por la técnica de incorporación timidina tritiada (³H]TdR) (Sterle et al. 2014, 2016). En base a estos resultados se determinará la IC₅₀ de los compuestos mencionados.

2. Determinación del perfil de expresión diferencial de distintos marcadores de proliferación (PCNA, Ki67) y de ciclo celular (ciclinas, p16/INK4A (CDKN2A), p53, entre otros) (Sterle et al. 2014, 2016) por RT-qPCR de acuerdo con ensayos ya puestos a punto en nuestro laboratorio (Cayrol et al. 2015; Sterle et al 2014 y 2016) y por citometría de flujo empleando anticuerpos específicos para cada proteína. Las células marcadas serán analizadas en un citómetro de flujo y los resultados serán analizados utilizando el software BD Accury.
3. Análisis de la inducción de apoptosis mediante la marcación de las células con Anexina V-FITC / Ioduro de Propidio y posterior análisis por citometría de flujo. Adicionalmente determinaremos la activación de caspasa 8, que interviene en la vía extrínseca, la caspasa 9 perteneciente a la vía intrínseca, y la caspasa 3, en la cual convergen ambas vías mediante las técnicas de western blot e inmunofluorescencia, así como también el balance en los niveles de expresión de proteínas pro-apoptóticas (como Bad y Bax) y anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XI, etc), mediante las técnicas de western blot e inmunofluorescencia.

5.5 Estudios *in vivo*:

Se desarrollarán los modelos tumorales correspondientes en animales singeneicos de las cepas C57BL/6J y Balb/c de dos meses de edad. Con el fin de obtener tumores sólidos de linfomas T, LBC (H-2^d) en ratones Balb/c y EL-4 (H-2^b) en ratones C57Bl/6, se procederá de acuerdo con protocolos ya utilizados por nuestro grupo (Frick et al. 2009; Sterle et al. 2014, 2016). Las células de melanoma B16F1 serán inoculadas s.c. en concentración 1×10^5 en 0.2 ml de suspensión y los tumores aparecerán 10 días post-inyección tal como lo comprobáramos previamente (Salgueiro et al. 2009).

Los tumores de mama y pulmón serán obtenidos por inoculación de las células 4T1 y LP07 respectivamente de acuerdo con protocolos a utilizados y descritos en la literatura (Sterle 2021; Vazquez et al. 2013).

En estos modelos se evaluará:

1. El crecimiento, proliferación/apoptosis celular en los tumores de los grupos experimentales tratados o no con polisacáridos. Para ello se utilizarán técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia con el fin de detectar los niveles de expresión de proteínas relacionadas con los procesos de proliferación (PCNA, Ki67), regulación del ciclo celular (Ciclinas D1 y E, p16, p27 y p53) y apoptosis (Caspasas 3 y 9, Bax y Bcl-2) (Sterle y col, 2014 y 2016). Adicionalmente se evaluará la presencia de metástasis en aquellos modelos que las generen espontáneamente.
2. Análisis de subpoblaciones celulares por citometría de flujo en ganglios, bazos y tumores de los modelos murinos en estudio. Para ello los tejidos serán disgregados mecánicamente y se cuantificará por citometría de flujo los porcentajes de células T helper (CD4+), T citotóxicas (CD8+), T regulatorias (CD4+/CD25+/Foxp3+), células NK (NK1.1+ o CD49+), células supresoras de origen mielóide (Gr1+ y CD11b+), células dendríticas (CD11c+) y macrófagos (F4/80+), empleando anticuerpos específicos para cada subtipo celular.
3. Evaluación de la actividad citotóxica de células NK. Se obtendrán suspensiones celulares de bazos y/o ganglios de animales portadores de tumor tratados o no con polisacáridos y se evaluará la actividad las células NK en un co-cultivo con células YAC-1 (Sterle 2016). Alternativamente, se analizará la actividad citotóxica de células NK en suspensiones celulares de bazos o ganglios provenientes de animales sin tratamiento, que serán es tratadas con polisacáridos *in vitro*.
4. Evaluación de la actividad citotóxica de linfocitos T. Se obtendrán suspensiones celulares de bazos y/o ganglios de animales portadores de tumor tratados o no con polisacáridos y se evaluará las diferencias en la actividad de linfocitos T citotóxicos provenientes de animales tratados o no con polisacáridos luego de la reestimulación *in vitro* con células tumorales (Sterle 2016). Alternativamente, se analizará la actividad citotóxica de linfocitos T en suspensiones celulares de bazos

o ganglios provenientes de animales sin tratamiento, que serán es tratadas o no con polisacáridos *in vitro*.

5.6 Estudios de preservación por deshidratación.

Se aplicarán técnica de secado por spray y liofilización para la obtención de sistemas deshidratados. Se evaluará la estabilidad de los compuestos de interés por comparación con las fracciones extraídas antes del secado (punto 5.3.1)

-Se realizará secado spray de los sistemas líquidos solos o con el agregado de agentes encapsulantes. en un secador Mini Spray Buchi B- 290 (origen Suiza)

-También se realizará secado por liofilización en un Liofilizador FIC-LI-I-E300 (Buenos Aires, Argentina), con condiciones de placa de entre -30 °C al comienzo y luego temperatura ambiente, - 40 °C para el condensador y un vacío de 100 mmHg, durante 40 hs.

-Se evaluarán las características de los sistemas obtenidos: actividad de agua, solubilidad en sistema acuoso.

-Se determinará la temperatura de Transición vítrea Tg de los sistemas deshidratados, por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

-La estabilidad física de los sistemas deshidratados se evaluará por almacenamiento a temperaturas cercanas a la Tg, preferentemente por debajo de esta temperatura. Se analizará la estabilidad frente al colapso a diferentes tiempos de almacenamiento, en contenedores cerrados herméticamente.

6. Referencias bibliográficas.

Ahmed, A. E. R., & Labavitch, J. M. (1977). A simplified method for accurate determination of cell wall uronide content. *Journal of Food Biochemistry*, 1, 361–365.

Albersheim, A., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., Staehelin A. (2011) Plant Cell Walls, from Chemistry to Biology. In: Garland Sc. New York

Armisen R, Gaiatas F. Agar. In: Phillips GO, Williams PA, Eds. Handbook of Hydrocolloids. 2nd ed. Cambridge: Woodward Publishing Ltd. 2009; pp. 82-107.

Assadpour E, Jafari SM (2019) Advances in Spray-Drying Encapsulation of Food Bioactive Ingredients: From Microcapsules to Nanocapsules. *Annual Review of Food Science and Technology*, vol 10: 8.1–8.29

Assef, A. N. B., da Costa, B. B., Moreira, T. A., do Carmo, L. D., de Souza, T. de F. G., Alencar, N. M. N., ... Wilke, D. V. (2021). *Antitumor and immunostimulating sulfated polysaccharides from brown algae Dictyota caribaea. Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2, 100142. doi:10.1016/j.carpta.2021.1001423

Baeza, R. and Chirife, J. (2021) Anthocyanin content and storage stability of spray/freeze drying microencapsulated anthocyanins from berries: A Review. *International Journal of Food Engineering*, Vol 17 (12): 927-944. <https://doi.org/10.1515/ijfe-2021-0184>

Bao, X., Yuan, H., Wang, C., Liu, J., & Lan, M. (2013). Antitumor and immunomodulatory activities of a polysaccharide from *Artemisia argyi*. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1236–1243.

Bar-Peled M, O'Neill, MA. 2011. Plant nucleotide sugar formation, interconversion, and salvage by sugar recycling. *Annu Rev Plant Biol*. 62:127–155

Braidwood, L., C. Breuer, and K. Sugimoto. 2014. My body is a cage: Mechanisms and modulation of plant cell growth. *New Phytol*. doi: 10.1111/nph.12473

Brett, C. and Waldron K. (1990) Physiology and biochemistry of plant cell walls. Unwin Hyman

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones R. (2000) Biochemistry and molecular biology of plants (A.S. of plant Biology, Ed.).

Bondi, A. (1988) Nutrición Animal. Editorial Acribia, Zaragoza Espana 546 pp

- Cayrol, F., et al., Integrin alphavbeta3 acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood*, 2015. 125(5): p. 841-51.
- Ciancia, M., Quintana, I., & Cerezo, A.S. 2010. Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds, *Curr. Med. Chem.* 17, 2503-2529.
- Ciancia, M., Fernandez, P.V. & Leliaert, F. 2020. Diversity of Sulfated Polysaccharides From Cell Walls of Coenocytic Green Algae and Their Structural Relationships in View of Green Algal Evolution. *Front. Plant Sci.* 11:554585. doi: 10.3389/fpls.2020.554585.
- Ciancia, M., Matulewicz, M. C., & Tuvikene, R. (2020). *Structural Diversity in Galactans From Red Seaweeds and Its Influence on Rheological Properties. Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.559986
- Cicinskas, E., Begun, M. A., Tiesto, V. A., Belousov, A. S., Vikhareva, V. V., Mikhailova, V. A., & Kalitnik, A. A. (2019). *In Vitro antitumor and immunotropic activity of carrageenans from red algae Chondrus armatus and their low molecular weight degradation products. Journal of Biomedical Materials Research Part A.* doi:10.1002/jbm.a.36812
- Cicinskas, E., Begun, M. A., Vikhareva, V. V., Karetin, Y. A., & Kalitnik, A. A. (2020). *Immunological effects of Chondrus armatus carrageenans and their low molecular weight degradation products. Journal of Biomedical Materials Research Part A.* doi:10.1002/jbm.a.37106
- Ciucanu, I., & Kerek, K. (1984). A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research*, 134, 209–217.
- Chen Y, Li H, Li M, Niu S, Wang J, Shao H, Li T, Wang H. (2017) Salvia miltiorrhiza polysaccharide activates T Lymphocytes of cancer patients through activation of TLRs mediated -MAPK and -NF-kappaB signaling pathways. *J Ethnopharmacol*, 200:165-173. doi: 10.1016/j.jep.2017.02.029.
- Chen H, Zhang L, Long X, Li P, Chen S, Kuang W, Guo J. (2017). Sargassum fusiforme polysaccharides inhibit VEGF-A-related angiogenesis and proliferation of lung cancer *in vitro* and *in vivo*. *Biomed Pharmacother*, 85:22-27. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.131.
- Chen, F., & Huang, G. (2018). *Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives. International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 211–216. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.169
- Chen Y, Xie Y, Ajuwon KM, Zhong R, Li T, Chen L, Zhang H, Beckers Y and Everaert N (2021) Xylo-Oligosaccharides, Preparation and Application to Human and Animal Health: A Review. *Front. Nutr.* 8:731930. doi.org/10.3389/fnut.2021.731930
- Chuy, L and Labuza, T. 1994, Caking and Stickiness of Dairy-Based Food Powders as Related to Glass Transition. [Journal of Food Science](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06893.x) 59(1):43 – 46. doi:10.1111/j.1365-2621.1994.tb06893.x
- Cosenza VA, Navarro DA, Ponce NMA, Stortz CA. Seaweed Polysaccharides: Structure and Applications. In: D'Accorso NB, Goyanes SN, Eds. *Industrial Applications of Renewable Biomass Products Past, Present and Future*. Berlin: Springer Nature 2017; pp. 75-116.
- Dita, M. A., Rispail, N., Prats, E., Rubiales, D., and Singh, K. B. 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica* 147: 1–24
- Drira, M.; Hentati, F.; Babich, O.; Sukhikh, S.; Larina, V.; Sharifian, S.; Homai, A.; Fendri, I.; Lemos, M.; Félix, C.; Félix, R.; Abdelkafi, S.; Michaud, P. (2021). Bioactive Carbohydrate Polymers—Between Myth and Reality. *Molecules*. 26. 7068. 10.3390/molecules26237068.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method of determination of sugars and related substances.
- Estevez JM, Fernández PV, Kasulin L, Dupree P, Ciancia M 2009. Chemical and in situ characterization of macromolecular components of the cell walls from the green seaweed *Codium fragile*, *Glycobiol.* 19: 212-228.

- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). *Cancer statistics for the year 2020: An overview. International Journal of Cancer*.doi:10.1002/ijc.33588
- Filiseti-Cozzi, T. M. C. C., & Carpita, N. C. (1991). Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Analytical Biochemistry*, 197, 157–162.
- Frick LR, Rapanelli M, Busmann UA, Klecha AJ, Arcos ML, Genaro AM, Cremaschi GA. Involvement of thyroid hormones in the alterations of T-cell immunity and tumor progression induced by chronic stress. *Biol Psychiatry*. 2009. 65(11):935-942.
- Fukuyama, Y., Ciancia, M., Nonami, H., Cerezo, A. S., Erra-Balsells, R., & Matulewicz, M. C. (2002). *Matrix-assisted ultraviolet laser-desorption ionization and electrospray-ionization time-of-flight mass spectrometry of sulfated neocarrabiose oligosaccharides. Carbohydrate Research*, 337(17), 1553–1562. doi:10.1016/s0008-6215(02)00230-6
- Garcia-Vaquero, M., Rajauria, G., O'Doherty, J. V., & Sweeney, T. (2017). Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Research International*, 99, 1011–1020. doi:10.1016/j.foodres.2016.11.016
- Ghoneum, M., & Agrawal, S. (2011). Activation of human monocyte-derived dendritic cells *in vitro* by the biological response modifier arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran). *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24, 941–948. doi: 10.1177/039463201102400412
- Graham, P.H., and C.P. Vance. 2003. Update on Legume Utilization Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. 131: 872–877. doi: 10.1104/pp.017004.872.
- Han, Y., Wu, Y., Li, G., Li, M., Yan, R., Xu, Z., Huang, R. (2021). Structural characterization and transcript-metabolite correlation network of immunostimulatory effects of sulfated polysaccharides from green alga *Ulva pertusa*. *Food Chemistry*, 342, 128537. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128537
- Hayashi N., Kondo T., Ishihara M. (2005) Enzymatically produced nano-ordered short elements containing cellulose I β crystalline domains. *Carbohydrate Polymers* 61:191–197. [online] URL: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861705001608> (accessed 6 March 2013).
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., ... Michaud, P. (2020). *Bioactive Polysaccharides from Seaweeds. Molecules*, 25(14), 3152.doi:10.3390/molecules25143152
- Huang, L., Shen, M., Morris, G. A., & JianhuaXie. (2019). *Sulfated polysaccharides: Immunomodulation and signaling mechanisms. Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2019.08.008
- Inatsuka C, Yang Y, Gad E, Rastetter L, Disis ML, Lu H. (2013) Gamma delta T cells are activated by polysaccharide K (PSK) and contribute to the anti-tumor effect of PSK. *Cancer Immunol Immunother*, 62(8):1335-45. doi: 10.1007/s00262-013-1436-4
- Ji, X., Peng, Q., Li, H., Liu, F., & Wang, M. (2017). Chemical Characterization and Anti-inflammatory Activity of Polysaccharides from *Zizyphus jujube* cv. Muzao. *International Journal of Food Engineering*. DOI: 101515/ijfe-20160382.
- Ji, X., Peng, Q., Yuan, Y., Shen, J., Xie, X., & Wang, M. (2017). Isolation, structures and bioactivities of the polysaccharides from jujube fruit (*Zizyphus jujuba* Mill.): A review. *Food Chemistry*, 227, 349-357.
- Ji, X., Han, L., Liu, F., Yin, S., Peng, Q., & Wang, M. (2019). *A mini-review of isolation, chemical properties and bioactivities of polysaccharides from buckwheat (Fagopyrum Mill). International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 204–209. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.01.043
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., & Ewart, H. (2011). *Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. Marine Drugs*, 9(2), 196–223. doi:10.3390/md9020196
- Kakar, M. U., Naveed, M., Saeed, M., Zhao, S., Rasheed, M., Firdos, S., Dai, R.

- (2020). *A review on structure, extraction, and biological activities of polysaccharides isolated from Cyclocarya paliurus (Batalin) Iljinskaja. International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.04.022
- Ke M, Wang H, Zhang M, Tian Y, Wang Y, Li B, Yu J, Dou J, Xi T, Zhou C. (2014) The anti-lung cancer activity of SEP is mediated by the activation and cytotoxicity of NK cells via TLR2/4 *in vivo*. *Biochem Pharmacol*, 89(1):119-30. doi: 10.1016/j.bcp.2014.02.024.
- Kesten, C., A. Menna, and C. Sánchez-Rodríguez. 2017. Regulation of cellulose synthesis in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* 40: 106–113. doi: 10.1016/j.pbi.2017.08.010.
- Khotimchenko, M., Tiasto, V., Kalitnik, A., Begun, M., Khotimchenko, R., Leonteva, E.,; Khotimchenko, Y. (2020). *Antitumor potential of carrageenans from marine red algae. Carbohydrate Polymers*, 116568. doi:10.1016/j.carbpol.2020.116568
- Kidgell JT, Magnusson M, de Nysa R, Glasson CRK. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Res* 2019; 39: 101422.
- Lee JS, Kwon DS, Lee KR, Park JM, Ha SJ, Hong EK. (2015) Mechanism of macrophage activation induced by polysaccharide from *Cordyceps militaris* culture broth. *Carbohydr Polym.* 120:29-37. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.11.059.
- Li, S., Gao, A., Dong, S., Chen, Y., Sun, S., Lei, Z., & Zhang, Z. (2017). *Purification, antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from soybean residue fermented with Morchella esculenta. International Journal of Biological Macromolecules*, 96, 26–34. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.12
- Lins, K. O. A. L., Bezerra, D. P., Alves, A. P. N. N., Alencar, N. M. N., Lima, M. W., Torres, V. M., Costa-Lotufo, L. V. (2009). *Antitumor properties of a sulfated polysaccharide from the red seaweed Champia feldmannii (Diaz-Pifferer). Journal of Applied Toxicology*, 29(1), 20–26. doi:10.1002/jat.1374
- Lopatina KA, Safonova EA, Nevskaya KV, Stakheeva MN, Gur'ev AM, Zueva EP, Razina TG, Amosova EN, Krylov SG, Belousov MV. (2017) Effect of *Acorus calamus* L. Polysaccharide on CD274 and CD326 Expression by Lewis Lung Carcinoma Cells in Mice. *Bull Exp Biol Med*, 164(1):102-105. doi: 10.1007/s10517-017-3934-4
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., & Farr, A. L. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265–275.
- Ma, L., Jiao, K., Luo, L., Xiang, J., Fan, J., Zhang, X., Zhu, W. (2018). Characterization and macrophage immunomodulatory activity of two polysaccharides from the flowers of *Paeonia suffruticosa* Andr. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.12.035
- Maxwell, E. G., Colquhoun, I. J., Chau, H. K., Hotchkiss, A. T., Waldron, K. W., Morris, V. J., and Belshaw, N. J., Modified sugar beet pectin induces apoptosis of colon cancer cells via an interaction with the neutral sugar side-chains, *Carbohydrate Polymers* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.063>
- Mendis, M., & Simsek, S. (2014). *Arabinoxylans and human health. Food Hydrocolloids*, 42, 239–243. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.07.022
- Minjares-Fuentes R, Rodríguez-González VM, González-Laredo RF, Eim V, González-Centeno MR, Femenia A. Effect of different drying procedures on the bioactive polysaccharide acemannan from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller). *Carbohydr Polym.* 2017 Jul 15;168:327-336. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.03.087. Epub 2017 Mar 29. PMID: 28457457.
- Minson D. (1990) Forage in ruminant nutrition. Academic Press, Inc., San Diego, California 92101.
- Nie, C., Zhu, P., Ma, S., Wang, M., & Hu, Y. (2018). *Purification, characterization and immunomodulatory activity of polysaccharides from stem lettuce. Carbohydrate Polymers*, 188, 236–242. doi:10.1016/j.carbpol.2018.02.009
- Painter T.J. (1983) The polysaccharides. In: Aspinall GO (ed) *Academic P. London*, pp 196–285.
- Pang G, Wang F, Zhang LW. (2018) Dose matters: Direct killing or immunoregulatory effects of natural polysaccharides in cancer treatment. *Carbohydr Polym*, 195:243-256. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.04.100.

- Park HB, Hwang J, Zhang W, Go S, Kim J, Choi I, You S, Jin JO. (2020) Polysaccharide from *Codium fragile* Induces Anti-Cancer Immunity by Activating Natural Killer Cells. *Mar Drugs*, 18(12):626. doi: 10.3390/md18120626
- Ponce NMA, Stortz CA. A Comprehensive and Comparative Analysis of the Fucoidan Compositional Data Across the Phaeophyceae. *Front Plant Sci* 2020; 11: 556312.
- Ren, L., Perera, C., & Hemar, Y. (2012). Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review. *Food & Function*, 3(11), 1118. doi:10.1039/c2fo10279j
- Rozi, P., Abuduwaili, A., Mutailifu, P., Gao, Y., Rakhmanberdieva, R., Aisa, H. A., & Yili, A. (2019). *Sequential extraction, characterization and antioxidant activity of polysaccharides from Fritillaria pallidiflora Schrenk. International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 97–106. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.03
- Salgueiro MJ, Colliá N, Barreiro ML, Medina V, Nicolini J, Cremaschi G, Zubillaga M. Radioactive treatment of a murine melanoma using a (32)P-patch. *Nucl Med Commun*. 2009 30(9):706-712).
- Schepetkin IA, Quinn MT (2006) Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *Int Immunopharmacol* 6:317–333
- Shao, P., Chen, X. X., & Sun, P. L. (2014). Chemical characterization, antioxidant and antitumor activity of sulfated polysaccharide from *Sargassum horneri*. *Carbohydrate Polymers*, 105, 260–269.
- Shen H, Tang G, Zeng G, Yang Y, Cai X, Li D, Liu H, Zhou N. (2013) Purification and characterization of an antitumor polysaccharide from *Portulaca oleracea* L. *Carbohydr Polym*, 93(2):395-400. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.11.107
- Sterle HA, Valli E, Cayrol F, Paulazo MA, Martinel Lamas DJ, Diaz Flaqué MC, Klecha AJ, Colombo L, Medina VA, Cremaschi GA, Barreiro Arcos ML. (2014) Thyroid status modulates T lymphoma growth via cell cycle regulatory proteins and angiogenesis. *J Endocrinol*, 222(2):243-55. doi: 10.1530/JOE-14-0159
- Sterle HA, Barreiro Arcos ML, Valli E, Paulazo MA, Méndez Huergo SP, Blidner AG, Cayrol F, Díaz Flaqué MC, Klecha AJ, Medina VA, Colombo L, Rabinovich GA, Cremaschi GA. (2014) The thyroid status reprograms T cell lymphoma growth and modulates immune cell frequencies. *J Mol Med (Berl)*, 94(4):417-29. doi: 10.1007/s00109-015-1363-2
- Sterle HA, Hildebrandt X, Valenzuela Álvarez M, Paulazo MA, Gutierrez LM, Klecha AJ, Cayrol F, Díaz Flaqué MC, Rosembli C, Barreiro Arcos ML, Colombo L, Bolontrade MF, Medina VA, Cremaschi GA. (2021) Thyroid status regulates the tumor microenvironment delineating breast cancer fate. *Endocr Relat Cancer*. 28(7):403-418
- Stevenson, T. T., & Furneaux, R. H. (1991). Chemical methods for the analysis of sulphated galactans from red algae. *Carbohydrate Research*, 210, 277–298.
- Sun Y, Guo M, Feng Y, Zheng H, Lei P, Ma X, Han X, Guan H, Hou D. (2016) Effect of ginseng polysaccharides on NK cell cytotoxicity in immunosuppressed mice. *Exp Ther Med*, 12(6):3773-3777. doi: 10.3892/etm.2016.3840
- Sun, Y, Gong, G., Guo, Y., Wang, Z., Song, S., Zhu, B., Zhao, L., and Jiang, J. (2018). Purification, structural features and immunostimulatory activity of novel polysaccharides from *Caulerpa lentillifera*. *Int. J. Biol. Macromol.* 108, 314-323. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.016
- Sun, Y., Liu, Z., Song, S., Zhu, B., Zhao, L., Jiang, J., Liu, N., Wang, J., and Chen, X. (2020). Antiinflammatory activity and structural identification of a sulfated polysaccharide CLGP4 from *Caulerpa lentillifera*. *Int. J. Biol. Macromol.* 146, 931-938. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.216
- Surayot, U., Lee, J.H., Kanongnuch, C., Peerapornpisal, Y., Park, W.J., and You, S.G. (2016). Structural characterization of sulfated arabinans extracted from *Cladophora glomerata* Kützing and their macrophage activation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 972–982. doi:10.1080/09168451.2015.1132149.
- Torres, M. D., Flórez-Fernández, N., & Domínguez, H. (2021). *Chondrus crispus* treated with ultrasound as a polysaccharides source with improved antitumoral potential. *Carbohydrate Polymers*, 273, 118588. doi:10.1016/j.carbpol.2021.118588

- Usov, A.I.(2011). *Polysaccharides of the red algae. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 115–217. doi:10.1016/b978-0-12-385520-6.00004-2
- Vago, M. E., Jaurena, G., Estevez, J. M., Castro, M. A., Zavala, J. A., & Ciancia, M. (2021). *Salt stress on Lotus tenuis triggers cell wall polysaccharide changes affecting their digestibility by ruminants. Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 405–415. doi:10.1016/j.plaphy.2021.05.049
- Van Soest P.J. (1994) *Nutritional ecology of the ruminant* (C.P. Associates, Ed.), 2nd edn. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Vázquez PF, Carlini MJ, Daroqui MC, Colombo L, Dalurzo ML, Smith DE, Grasselli J, Pallotta MG, Ehrlich M, Bal de Kier Joffé ED, Puricelli L. TGF-beta specifically enhances the metastatic attributes of murine lung adenocarcinoma: implications for human non-small cell lung cancer. *Clin Exp Metastasis*. 2013; 30(8):993-1007)
- Wang, J., Zuo, G., Li, J., Guan, T., Li, C., Jiang, R., et al. (2010). Induction of tumoricidal activity in mouse peritoneal macrophages by ginseng polysaccharide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 389–395. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.02.007
- Wang, X., Chen, Y., Wang, J., Liu, Z., & Zhao, S. (2013). *Antitumor activity of a sulfated polysaccharide from Enteromorpha intestinalis targeted against hepatoma through mitochondrial pathway. Tumor Biology*, 35(2), 1641–1647. doi:10.1007/s13277-013-1226-9
- Wang, K. P., Wang, J., Li, Q., Zhang, Q. L., You, R. X., Cheng, Y., et al. (2014). Structural differences and conformational characterization of five bioactive polysaccharides from *Lentinus edodes*. *Food Research International*, 62(8), 223-232.
- Wang, N., Zhang, X., Wang, S., Guo, Q., Li, Z., Liu, H., & Wang, C. (2019). *Structural characterisation and immunomodulatory activity of polysaccharides from white asparagus skin. Carbohydrate Polymers*, 115314. doi:10.1016/j.carbpol.2019.115314
- Wijesekara, I., Pangestuti, R., & Kim, S.-K. (2011). *Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. Carbohydrate Polymers*, 84(1), 14–21. doi:10.1016/j.carbpol.2010.10.062
- Wu, Q., Qu, H., Jia, J., Kuang, C., Wen, Y., Yan, H., & Gui, Z. (2015). Characterization, antioxidant and antitumor activities of polysaccharides from purple sweet potato. *Carbohydrate Polymers*, 132, 31–40. doi:10.1016/j.carbpol.2015.06.045
- Yin, X., Shang, B., Dou, M., Liu, R., Chen, T., Xiang, G., ... Xu, Y. (2019). *The Nuclear-Localized RxLR Effector PvAvh74 From Plasmodium viticola Induces Cell Death and Immunity Responses in Nicotiana benthamiana. Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01531
- Yu Y., Shen M., Song Q., Xie J. 2018 Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review *Carbohydrate Polymers* 183 (2018) 91–101
- Zhang X, Ding R, Zhou Y, Zhu R, Liu W, Jin L, Yao W, Gao X. (2013) Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4-dependent activation of B cells by a polysaccharide from marine fungus *Phoma herbarum* YS4108. *PLoS One*, 8(3):e60781. doi: 10.1371/journal.pone.0060781.
- Zhang, L., Liu, X., Wang, Y., Liu, G., Zhang, Z., Zhao, Z., et al. (2017). *In vitro* antioxidative and immunological activities of polysaccharides from *Zizyphus Jujuba* cv. Muzao. *International of Journal of Biological Macromolecules*, 95, 1119-1125.
- Zhao, F., Shi, B., Sun, D., Chen, H., Tong, M., Zhang, P., Guo, X., Yan, S. Effects of dietary supplementation of *Artemisia argyi* aqueous extract on antioxidant indexes of small intestine in broilers *Animal Nutrition*, Volume 2, Issue 3, 2016, pp. 198-203
- Zhao, X., Jiao, G., Yang, Y., Li, M., Li, Q., Wang, X., ... Yu, G. (2017). *Structure and immunomodulatory activity of a sulfated agarose with pyruvate and xylose*

substitutes from Polysiphonia senticulosa Harvey. Carbohydrate Polymers, 176, 29–37. doi:10.1016/j.carbpol.2017.08.065
 Zhu N, Lv X, Wang Y, Li J, Liu Y, Lu W, Yang L, Zhao J, Wang F, Zhang LW. (2016)
 Int J Biol Macromol, 93(Pt A):940-951. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.064.

7. Justificación del presupuesto.

Siendo que es un proyecto de tipo A, solicitamos un monto total de \$750.000 repartido en \$375000 por año. Este presupuesto se utilizará mayormente en la compra de reactivos, medios de cultivo e insumos para cultivos celulares, anticuerpos para identificación de marcadores celulares y material de laboratorio que en su gran mayoría son importados. En menor medida en equipamiento y en la contratación de servicios para realizar metodologías específicas necesarias para la caracterización y procesado de las muestras. Por otra parte se destinará una partida para la publicación de los resultados alcanzados y la participación en congresos.

8. Grupo colaborador. Los integrantes deben subir sus CV en SIGEVA UCA (como archivo adjunto). Completar la siguiente tabla:

Apellido y nombre	Filiación institucional
Marina Ciancia	UBA Facultad de Agronomía, CONICET-CIHIDECAR-
Gabriela Gorelik	South Alabama University Assistant Professor
Gonzalo Gonzalez	Becario Agencia I+D+i Laboratorio de Neuroinmunomodulación y oncología molecular BIOMED-UCA-CONICET Doctorando UCA
Bestercan, Lorena	UCA FICA-LEAA
Alejandra Paulazo	Técnica profesional CONICET Lab de Neuroinmunomodulación y oncología molecular BIOMED-UCA-CONICET
Martin de Palma Portela	UCA FICA (Alumno de grado tesis final graduación)
Estudiante a designar	UCA FICA (Alumno de grado tesis final graduación)
Estudiante a designar	UCA FICA (Alumno de grado tesis final graduación)

9. Cronograma de trabajo. Se presentará una tabla de doble entrada con las tareas desagregadas y los tiempos estimados que consumirán.

Actividad	Años		
	1	2	
Etapas de Desarrollo del Trabajo			
Pruebas preliminares de inmunomodulación	x		
Fraccionamiento, determinación estructural de polisacáridos pécticos	x		
Ensayos de inmunomodulación con compuestos purificados		x	
Determinación de relaciones entre		x	

la estructura de los polisacáridos y su actividad			
Comentarios y aclaraciones:			