



Universidad de la República  
Facultad de Ciencias

Tesina de Grado para la Licenciatura en Bioquímica

**“PRODUCCIÓN DE LECTINAS DE  
ORIGEN VEGETAL Y FÚNGICO Y  
EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO”**

Felipe Clavijo Romero

Tutora: Dra. Silvana Alborés, Área de Microbiología  
Co-tutora: Dra. Laura Franco Fraguas, Área de Bioquímica

Departamento de Biociencias  
Facultad de Química  
Universidad de la República

*Montevideo, mayo de 2018*

# AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, le agradezco mucho a mis tutoras, Silvana y Laura, por todo lo que me enseñaron a lo largo del trabajo, no solo sobre microbiología y bioquímica, sino también de la vida en el laboratorio: a anotar siempre todo, a manejar las frustraciones, que un resultado negativo no necesariamente es malo, y que siempre van a surgir imprevistos y que manejarlos es una parte esencial del trabajo.*

*También quiero agradecerles todas las oportunidades que me dieron, toda la paciencia que me tuvieron, el tiempo que me dedicaron y todo el trabajo que pasaron, como ponerse a separar uno a uno frutos maduros de frutos verdes.*

*A la evaluadora externa de este trabajo, Elena Fabiano.*

*Gracias a CSIC-PAIE por el apoyo brindado para comenzar con este trabajo, y al IAU, que posibilitó el viaje y toma de muestras en la BCAA. Al Jardín Botánico de Montevideo por proveer muestras de material vegetal, y a la URBE y el LEA por facilitar con eficiencia el material biológico.*

*Les agradezco también a mis compañeras del laboratorio: Paulita, Belén, Mary Loneliness, Ada, Angie, Mariana y Sofía. Siempre estuvieron dispuestas a ayudarme con cualquier duda, e hicieron que me sintiera en seguida uno más del grupo y que mis jornadas en el 14 fueran siempre alegres.*

*A mis compañeros de la facultad, que hicieron que las jornadas maratónicas de estudio fueran tolerables y que esta carrera fuera una de las etapas más lindas. En especial le agradezco a Nelson, que me aguantó todo el camino y que me empujó siempre.*

*A mis amigos, que, aunque creo que todavía no están del todo seguros de qué carrera estudié, supieron entender cuando me perdía de salidas y cumpleaños por tener parciales o exámenes.*

*A mi familia por el apoyo y por tolerar mi mal humor y mis frustraciones.*

*Y a todos los que de una manera u otra me ayudaron a lo largo de la carrera y de este trabajo final.*

## TABLA DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Importancia de la búsqueda de nuevos antimicrobianos.....	4
1.2. Características y propiedades de las lectinas.....	5
1.3. Clasificación.....	7
1.4. Roles biológicos y aplicaciones.....	8
1.4.1. Actividad antimicrobiana.....	11
1.5. Aislamiento y purificación de lectinas.....	12
1.6. Lectinas seleccionadas para el presente trabajo.....	15
1.6.1. <i>Cayaponia martiana</i> .....	15
1.6.2. <i>Glycine max</i> .....	16
1.6.3. Hongos filamentosos.....	16
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo General.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1. Fuentes de lectinas.....	18
3.1.1. Material vegetal.....	18
3.1.2. Material fúngico.....	18
3.1.2.1. Colecta de muestras.....	18
3.1.2.2. Aislamiento de hongos.....	18
3.1.2.3. Identificación molecular de hongos.....	19
3.2. Preparación de extractos acuosos.....	20
3.2.1. Extractos a partir de material vegetal.....	20
3.2.2. Extractos a partir de micelios fúngicos.....	20
3.3. Determinación de la actividad hemaglutinante.....	21
3.4. Determinación de especificidad de lectinas fúngicas.....	21
3.5. Purificación de las lectinas.....	22
3.5.1. Cromatografía de afinidad.....	22
3.5.1.1. Purificación de lectina de <i>Cayaponia martiana</i> .....	22
3.5.1.2. Purificación de lectina de <i>Glycine max</i> .....	23

3.5.2.	Cromatografía de intercambio iónico.....	23
3.6.	Evaluación de pureza de las lectinas .....	23
3.7.	Ensayos de actividad antimicrobiana de las lectinas .....	23
3.7.1.	Microorganismos evaluados y condiciones de cultivo.....	24
3.7.2.	Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	24
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
4.1.	Lectina de <i>Cayaponia martiana</i> .....	25
4.1.1.	Determinación de la concentración de lectina.....	29
4.1.2.	Evaluación del potencial antimicrobiano de la lectina .....	29
4.2.	Lectina de <i>Glycine max</i> .....	31
4.2.1.	Deslipidación de harina de porotos de soja .....	31
4.2.2.	Actividad hemaglutinante de los extractos .....	31
4.2.3.	Purificación de lectina .....	31
4.2.4.	Evaluación de la pureza de la lectina.....	32
4.2.5.	Determinación de la concentración de lectina.....	32
4.2.6.	Evaluación del potencial antimicrobiano de la lectina .....	33
4.3.	Lectinas fúngicas .....	33
4.3.1.	Actividad hemaglutinante de los extractos: .....	33
4.3.2.	Identificación molecular de las cepas:.....	33
4.3.3.	Especificidad de unión a carbohidratos.....	34
4.3.4.	Purificación de lectina de <i>Penicillium sp.</i> .....	36
4.3.5.	Evaluación de la pureza de lectinas .....	37
4.3.6.	Evaluación del potencial antimicrobiano de las lectinas .....	38
5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	40
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	41

## ABREVIATURAS

- **AHE:** Actividad hemaglutinante específica
- **BCA:** Ácido bicinconínico
- **BLAST:** Herramienta de búsqueda básica de alineamientos locales
- **BSA:** Seroalbúmina bovina
- **CIM:** Concentración inhibitoria mínima
- **ConA:** Concanavalina A
- **CTAB:** Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
- **CRD:** Dominio de reconocimiento de carbohidratos
- **DEAE:** Dietilaminoetil-
- **Fru:** Fructosa
- **Fru-1,6-P:** Fructosa-1,6-bisfosfato
- **Gal:** Galactosa
- **GalNAc:** N-Acetilgalactosamina
- **Glc:** Glucosa
- **GlcNAc:** N-Acetilglucosamina
- **HAG:** Hemaglutinación

- **Lac:** Lactosa
- **LMW:** Marcador de bajo peso molecular
- **LSU:** Subunidad grande
- **Man:** Manosa
- **ManNAc:** N-Acetilmanosamina
- **MMan:** metil-manósido
- **MDP:** Muramil dipéptido
- **MHB:** Caldo Mueller-Hinton
- **MurNAc:** Ácido N-acetilmurámico
- **MVL:** Lectina de *Microcystis viridis*
- **Neu5Ac:** Ácido N-acetilneuramínico
- **OGS:** Oligosacáridos
- **PBS:** Buffer fosfato salino
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **SBA:** Lectina de soja
- **SSU:** Subunidad pequeña
- **WGA:** Lectina de germen de trigo

## RESUMEN

Las lectinas son proteínas que poseen al menos un dominio con un sitio de unión a carbohidratos, por medio del cual interactúan específica y reversiblemente con glicocompuestos. Son consideradas proteínas ubicuas, presentes en todos los organismos: se han identificado lectinas de origen vegetal, animal, viral, bacteriano y fúngico.

El reconocimiento lectina-carbohidrato permite su uso en muy diversas aplicaciones. En particular, se han realizado estudios de la actividad antimicrobiana de algunas lectinas fúngicas para el control de crecimiento de bacterias y hongos. La actividad antibacteriana ocurriría a través de la interacción de la lectina con componentes de la pared celular bacteriana incluyendo ácidos teicoico y teicurónico, peptidoglicanos y lipopolisacáridos. En el caso de hongos, la inhibición del crecimiento puede ocurrir a través de la unión de la lectina a las hifas, resultando en una pobre absorción de los nutrientes, así como por interferencia del proceso de germinación de esporas.

En el trabajo a presentar se prepararon extractos acuosos a partir de frutos de *Cayaponia martiana* (tayuyá), una especie vegetal nativa de nuestro país, y a partir de harina de origen comercial de porotos de soja (*Glycine max*). Se purificaron las lectinas de estas especies por cromatografía de afinidad.

Se prepararon también extractos fúngicos a partir de hongos aislados de la Antártida y se identificaron molecularmente las cepas en las que se detectó presencia de lectinas. Se determinó especificidad de unión a carbohidratos y se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico la lectina de *Penicillium* sp., la cepa que presentó la mayor actividad específica.

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las lectinas purificadas, frente a distintos microorganismos, mediante ensayos de determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima. Como resultado se obtuvo que la lectina de *C. martiana* inhibe el crecimiento de *Fusarium graminearum* en concentraciones superiores a 10.8 µg/mL, y de *Penicillium expansum* y *Pseudomonas aeruginosa* en concentraciones mayores a 5.4 µg/mL. La lectina de *Penicillium* sp. fue capaz de inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* en concentraciones superiores a 100 µg/mL, mientras que la lectina de soja no inhibió el crecimiento de ninguno de los microorganismos evaluados.

**Palabras clave:** Lectinas, Antimicrobianos, *Glycine max*, *Cayaponia martiana*, Hongos filamentosos, Antártida.

# 1.INTRODUCCIÓN

## 1.1. Importancia de la búsqueda de nuevos antimicrobianos:

A lo largo de los siglos, las enfermedades infecciosas continúan siendo una de las principales causas de muerte y morbilidad a nivel mundial (Jandú et al. 2017). Muchas bacterias tienen gran relevancia médica porque causan infecciones graves en humanos, tales como meningitis, endocarditis, gastroenteritis e infecciones del tracto urinario (Procópio et al. 2017).

El descubrimiento de los antibióticos en 1930 revolucionó la medicina y cambió radicalmente el tratamiento de estas enfermedades, resultando en un marcado aumento de la esperanza y de la calidad de vida (Jandú et al. 2017). En la actualidad se utilizan agentes antimicrobianos para tratar enfermedades causadas por bacterias y hongos, y estos tratamientos han reducido de manera significativa la tasa de mortalidad asociada a estas infecciones tanto en humanos como en animales (Lagarda-Diaz et al. 2017).

Sin embargo, el uso indebido de antibióticos ha llevado a un aumento en los reportes de resistencia antimicrobiana debido a la presión selectiva que favorece a las cepas resistentes (Procópio et al. 2017). Las cepas de microorganismos resistentes que emergen constantemente debido al uso indiscriminado de sustancias antimicrobianas en medicina, agricultura y veterinaria generan gran preocupación a la comunidad científica por las serias infecciones que pueden causar (Lagarda-Diaz et al. 2017). Los nuevos mecanismos de resistencia que desarrollan los microorganismos se esparcen ampliamente, amenazando nuestra capacidad de tratar las numerosas enfermedades infecciosas y aumentando la cantidad de infecciones intrahospitalarias (Iordache et al. 2015).

La resistencia a microbianos es un fenómeno genético que resulta en una reducción de la efectividad de las terapias con drogas, y puede ser causada por mutaciones durante el proceso de reproducción del microorganismo, o por genes importados que se adquieren por mecanismos de transducción, conjugación y transformación (Lagarda-Diaz et al. 2017). El hecho de que los microorganismos sean capaces de adquirir resistencia a drogas por estos mecanismos reduce críticamente la utilidad de los antibióticos, que no son eficientes para el tratamiento de cepas con resistencia a múltiples drogas (Jandú et al. 2017).

Por estos motivos, existe un creciente interés por desarrollar nuevas estrategias para inhibir el crecimiento y la supervivencia de microorganismos basándose en la evaluación de nuevas fuentes de compuestos naturales como alternativas a las drogas disponibles comercialmente que puedan ser usados independientemente o en conjunto con antibióticos para incrementar su eficacia (Procópio et al. 2017; Lagarda-Diaz et al. 2017).



Las lectinas cumplen un rol fundamental en la glicobiología, donde se las usa como herramientas para la identificación y purificación de carbohidratos complejos y glicoconjugados, y también se ha demostrado que median diversas funciones biológicas, como citotoxicidad, activación del sistema del complemento en inmunidad innata, comunicación célula-célula y patógeno-hospedero y señalización intercelular. Más recientemente, se ha desarrollado un gran interés por la aplicación de las lectinas en medicina y agricultura, debido a su potencial antiparasitario y antimicrobiano. El descubrimiento de lectinas con actividad antimicrobiana podría aplicarse a terapias antibióticas para incrementar su efectividad (Iordache et al. 2015).

## **1.2. Características y propiedades de las lectinas:**

Existe un importante grupo de proteínas que poseen la habilidad de interactuar específica y reversiblemente con diversas biomoléculas; ejemplos conocidos son *las enzimas*, que se unen a sus sustratos e inhibidores, *los anticuerpos*, que se unen a sus antígenos y un tercer ejemplo lo constituyen *las lectinas*, proteínas con especiales propiedades de unión a diferentes carbohidratos. A través de estas propiedades, poseen la capacidad de aglutinar células y precipitar polisacáridos y glicoproteínas. Ello se debe a que la mayoría de estas proteínas tienen al menos dos sitios de unión a carbohidratos (son polivalentes), lo que les permite formar entramados entre macromoléculas que contienen carbohidratos o entre células al interactuar con carbohidratos de la superficie celular. No obstante, se han descrito lectinas monoméricas y con un único sitio de unión a carbohidratos, que por lo tanto no son capaces de aglutinar células (Sharon y Lis 2007).

Las lectinas se definen entonces como un grupo complejo de proteínas y glicoproteínas de origen no inmune (para distinguirlas de anticuerpos específicos para carbohidratos) que poseen al menos un dominio no catalítico al que se unen reversible y específicamente monosacáridos, oligosacáridos y glicoconjugados como glicoproteínas, proteoglicanos, glicosoaminoglicanos y glucolípidos (Gupta 2012). Para diferenciarlas de enzimas específicas de carbohidratos como las quinasas, glicosidasas y transferasas, también se definió a las lectinas como proteínas de unión a carbohidratos que no modifican al carbohidrato al que se unen (Sharon y Lis 2007).

El término “lectina” deriva del latín *legere*, que significa seleccionar, elegir o distinguir (Peumans y Van Damme 1995). Estas proteínas también han sido llamadas aglutininas o hemaglutininas por su capacidad de aglutinar glóbulos rojos, y fitohemaglutininas, por su origen inicialmente atribuido al reino vegetal. Se las encuentra como monómeros, homo y heterodímeros, así como homo y heterotetrámeros, y están ampliamente distribuidas en la naturaleza (De Oliveira Dias et al. 2015).

La primera caracterización de una lectina se le atribuye a Peter Hermann Stillmark en su tesis doctoral de 1888 en la Universidad de Dorpat (Gupta 2012).

Aunque fueron descubiertas en primera instancia hace más de 100 años en plantas, se las considera proteínas ubicuas, ya que en la actualidad se las ha encontrado en la gran mayoría de los organismos: virus, bacterias, animales, plantas y hongos (Sharon 2008).

Las lectinas tienen un tamaño muy variable, entre 60 y 400 kDa (O'Neill et al. 2010). Sin embargo, se han descrito algunos péptidos antimicrobianos que presentan la habilidad de reconocer y unirse a carbohidratos y también se los ha llegado a considerar lectinas (De Oliveira Dias et al. 2015).

Las estructuras de muchas lectinas vegetales han sido dilucidadas, siendo las lectinas de leguminosas las más ampliamente estudiadas. Estas lectinas son abundantes en semillas y forman un grupo de proteínas con una gran homología, lo que influye en gran medida sus blancos de reconocimiento (Lagarda-Diaz et al. 2017). Se ensamblan dando una configuración en barril  $\beta$  compacta, que carece de  $\alpha$ -hélices. Estas estructuras cristalinas han permitido una comprensión más detallada de las interacciones atómicas entre carbohidratos y proteínas (Gupta 2012).

De los cientos de carbohidratos presentes en la naturaleza, la gran mayoría de las lectinas reconocen algunos pocos, entre ellos glucosa (Glc), galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), fucosa y algunos tipos de ácidos siálicos, en particular el más conocido el ácido N-acetilneuramínico (Neu5NAc), así como a un gran número de oligosacáridos presentes en glicoconjugados (Sharon y Lis 2007).

Estos carbohidratos están presentes tanto en la superficie como en el interior de las células. En la matriz extracelular forman, por ejemplo, una gran y compleja red de polisacáridos y proteoglicanos: en plantas, los polisacáridos son el principal componente de la pared celular y en animales, los proteoglicanos están compuestos por glucosaminoglicanos no ramificados de 70 a 200 monosacáridos, covalentemente unidas a un núcleo proteico pequeño. Tanto en plantas como animales, los carbohidratos también están presentes en glicoconjugados como glicoproteínas y glicolípidos (Bellande et al. 2017). Para manejar esta complejidad de carbohidratos, las lectinas exhiben mecanismos moleculares variados que les aportan una gran diversidad y selectividad para el reconocimiento de azúcares.

Los sitios de unión a carbohidratos de las lectinas se encuentran en los llamados dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD), que están altamente conservados en cada tipo de lectina. Además del CRD, la especificidad de unión ocurre por medio de una serie de interacciones débiles (Peumans y Van Damme 1998). El carbohidrato se une a la proteína principalmente a través de enlaces de hidrógeno, participando también en menor medida fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. En algunas lectinas, la coordinación con iones metálicos también contribuye a la unión (De Oliveira Dias et al. 2015). Modificaciones en estas interacciones afectan la especificidad y así, la sustitución de un único aminoácido en el sitio de unión puede resultar en un marcado cambio en la especificidad.

Los sitios de unión de las lectinas contienen residuos polares que forman enlaces de hidrógeno con los abundantes grupos hidroxilos de los carbohidratos. Las cadenas laterales aromáticas de residuos de triptófano, tirosina y fenilalanina también tienen un rol importante al apilar las caras hidrofóbicas de los carbohidratos. Iones de calcio y magnesio en los sitios de unión intervienen a menudo en enlaces de coordinación con el carbohidrato (Bellande et al. 2017).

La alta selectividad y diversidad de las lectinas se logran a través de sitios secundarios extendidos que fortalecen los contactos con oligosacáridos o glicoconjugados. La extensión de los sitios de unión es a menudo única para cada lectina. Incluso combinados, estos enlaces aportan una débil afinidad por el ligando, en el rango milimolar. Sin embargo, se logra una afinidad fuerte (de micro a nanomolar) con interacciones multivalentes. Tanto los sitios de unión a carbohidrato como los ligandos pueden ser multivalentes gracias a las estructuras ramificadas o formación de clústeres de polisacáridos en la superficie celular. La multivalencia de los sitios de unión a carbohidrato puede resultar por la asociación de dos o más dominios de lectina en una única proteína, o por la oligomerización de proteínas monovalentes. Existen muchos reportes de dimerización y tetramerización de lectinas (Bellande et al. 2017).

### **1.3. Clasificación:**

Según su estructura, las lectinas vegetales se pueden clasificar como merolectinas, hololectinas, superlectinas o chimerlectinas.

Las merolectinas tienen un único CRD, por lo que no tienen la capacidad de aglutinar células ni precipitar glicoconjugados (e.g. la heveina proveniente del árbol del caucho *Hevea brasiliensis*). Las hololectinas contienen como mínimo dos CRD idénticos. (e.g. SBA, la lectina proveniente de *G. max*). Dado que estas lectinas se pueden unir simultáneamente a múltiples carbohidratos, se pueden detectar *in vitro* con ensayos de aglutinación de eritrocitos (hemaglutinación). Las hololectinas conforman la clase más amplia de lectinas vegetales. Las superlectinas presentan también al menos dos CRD, pero en contraste con las hololectinas, estos dominios no tienen características similares. Por lo tanto, las superlectinas pueden reconocer carbohidratos estructuralmente diferentes (e.g. la lectina del bulbo del tulipán, TxLCI, que reconoce residuos de N-acetilgalactosamina y manosa). Las quimerlectinas son proteínas de fusión que presentan dos cadenas no relacionadas, una de las cuales se une a carbohidratos, mientras que la otra tiene una actividad biológica diferente, generalmente catalítica (e.g. proteínas inactivadoras de ribosomas RIP de tipo 2, como la ricina que contiene una cadena polipeptídica con actividad N-glicosidasa, y una cadena de unión que reconoce residuos terminales de galactosa) (Iordache et al. 2015; Peumans y Van Damme 1998; Gupta 2012).

## 1.4. Roles biológicos y aplicaciones:

Como se mencionó, las lectinas se unen a oligosacáridos (OGS) específicos presentes en la superficie celular, la matriz extracelular y en glicoproteínas secretadas. Están involucradas en señalización intra- e intercelular y pueden actuar como moléculas de defensa al reconocer carbohidratos con estructuras anómalas o exógenas (Gupta 2012). Los carbohidratos en la superficie de una célula se unen a los sitios de unión de lectinas presentes en la superficie de otra célula. Por ejemplo, algunas bacterias utilizan lectinas para anclarse a las células del organismo hospedero durante la infección. Esta unión resulta de numerosas interacciones débiles que se suman para dar lugar a una atracción fuerte (Gupta 2012).

**En animales**, las interacciones lectina carbohidrato están involucradas en la vectorización de los mecanismos de endocitosis y de transporte intracelular de glicoproteínas, la inducción de la apoptosis en células tumorales, regulación de la migración y adhesión de células bacterianas y el control de los niveles de proteína en sangre. En el sistema inmune, reconocen carbohidratos que se encuentran exclusivamente en los patógenos, o que son inaccesibles en condiciones normales en la célula hospedera. Los embriones se anclan al endometrio del útero por medio de la L-selectina, una lectina de la familia de las selectinas, que también median la diapédesis de leucocitos durante el proceso de inflamación (Gupta 2012). A nivel del tracto gastrointestinal, *E. coli* es capaz de residir por medio de lectinas que reconocen carbohidratos presentes en el intestino. El virus de la influenza contiene hemaglutininas, que reconoce residuos de ácidos siálicos en las glicoproteínas presentes en la superficie de la célula hospedera, lo que facilita el anclaje del virus a la superficie celular y su subsiguiente entrada a la célula.

**En plantas**, las lectinas tienen roles de defensa contra bacterias, virus y otros patógenos (De Oliveira Dias et al. 2015). Se cree que pueden mediar la simbiosis entre microorganismos fijadores de nitrógeno y leguminosas, un proceso de gran importancia en la agricultura y el ciclo del nitrógeno. La gran concentración de lectinas en las semillas se reduce durante el crecimiento de la planta, lo que sugiere un rol en la germinación vegetal, o en la supervivencia de la semilla. Muchas semillas de leguminosas contienen una alta actividad de lectina y algunas de estas lectinas, particularmente Concanavalina A (ConA) han sido ampliamente utilizadas como sistemas modelo para estudiar las bases moleculares del reconocimiento proteico de carbohidratos, ya que es relativamente fácil de obtener y tiene una amplia variedad de especificidad por azúcares (Gupta 2012).

Por otro lado, se ha reportado que la ingesta de ciertas lectinas vegetales tiene efectos nocivos o tóxicos. Dado que muchas lectinas, como las de leguminosas, son relativamente resistentes a la desnaturalización por calor y a la digestión proteolítica, el tracto digestivo se encuentra en constante exposición a las lectinas bioactivas presentes en vegetales consumidos (Nakata et al. 2017). Una vez allí, gran parte de las lectinas son capaces de unirse a carbohidratos presentes en las células del epitelio intestinal. La unión se da principalmente en las células del intestino

delgado, pero también se unen lectinas a lo largo de todo el sistema digestivo, desde la cavidad oral hasta el colon. Dado que la glicosilación superficial varía en las distintas partes del sistema digestivo, la unión no es uniforme, y se observan efectos regionales selectivos con diferentes lectinas. Entre los efectos adversos que pueden causar se encuentran reacciones alérgicas (se han encontrado anticuerpos anti-SBA y anti-WGA en suero humano) y deficiencias nutricionales, generadas por interferencias en la absorción de nutrientes como azúcares, lípidos y aminoácidos a lo largo del intestino (Sharon y Lis 2007). Por ejemplo, la SBA puede producir cambios estructurales en el epitelio intestinal y resistir a la proteólisis. Estos cambios pueden interferir en el metabolismo intestinal al interrumpir la continuidad del borde en cepillo y ulceración de vellosidades de los enterocitos, que pueden llevar a un incremento en la pérdida del nitrógeno endógeno y a disminución de la tasa de crecimiento en animales que las consumen (Douglas et al. 1999). Experimentos en los que se alimentan insectos con lectinas vegetales confirmaron que tienen efectos nocivos en las diferentes etapas de su desarrollo (larvas y adultos): aumentan la mortalidad, retrasan el desarrollo y reducen la fertilidad (Lagarda-Diaz et al. 2017). Esto confirma que están involucradas en mecanismos de defensa contra el ataque de insectos fitófagos y animales herbívoros. Existe la teoría de que estas lectinas cumplen primordialmente funciones de proteína de almacenamiento, y cuando se las necesita, pueden ser reclutadas para cumplir propósitos defensivos (Van Holle et al. 2017).

En las últimas décadas se ha prestado mayor atención a lectinas que se expresan en menor cantidad y en tejidos como hojas, flores y raíces (no de almacenamiento). Este cambio de foco y la disponibilidad de tecnologías más avanzadas que permiten estudiar proteínas poco abundantes han llevado al descubrimiento de varias lectinas novedosas que no se expresan constitutivamente, sino que se inducen con tratamientos específicos de factores de estrés biótico y abiótico. Estos descubrimientos se dieron a menudo luego de la identificación de secuencias génicas con motivos de lectina, seguida de la búsqueda de proteínas con actividad de unión a carbohidratos (Van Holle et al. 2017).

Las plantas sintetizan también otras lectinas en pequeñas cantidades, cuando se exponen a situaciones de estrés como sequía, salinidad alta, tratamiento hormonal, ataques por patógenos o depredación. Estas lectinas inducibles se localizan en el núcleo o el citoplasma. Basándose en estas observaciones, se desarrolló el concepto de que las interacciones lectina-carbohidrato en el núcleo y el citoplasma juegan un papel importante en la respuesta al estrés en células vegetales.

**En hongos**, aunque aún no están del todo claros, se han propuesto varios roles fisiológicos para las lectinas. Funcionan como proteínas de almacenamiento al igual que las lectinas vegetales e intervienen en el crecimiento, desarrollo y morfogénesis del hongo, actuando en la formación del cuerpo fructífero inicial y de estructuras del micelio que facilitan la invasión al hospedero por parte de hongos parasíticos.

Además permiten la formación de micorrizas y la asociación a algas y cianobacterias presentes en líquenes (Khan y Khan 2011; Varrot et al. 2013).

Debido a la toxicidad reportada de lectinas fúngicas contra insectos y células de mamíferos, se ha propuesto también que una de sus funciones sea la de defensa contra micófagos como moscas y nemátodos, los cuales representan una gran amenaza para los hongos en su hábitat natural (Butschi et al. 2010).

De las lectinas fúngicas identificadas, 82% provienen de setas, 15% de mohos y un 3% de levaduras (Nikitina et al. 2017)

En cuanto a las **aplicaciones** de las lectinas, éstas son capaces de actuar como poderosos agentes inmunomoduladores, con capacidad de acción tanto en el sistema inmune innato como en el adaptativo. Modulan la producción de citoquinas y otros mediadores de la respuesta inmune (como especies reactivas de oxígeno, ROS) y pueden por lo tanto mejorar la defensa contra microorganismos (Jandú et al. 2017). En varios casos, la actividad inmunomoduladora de las lectinas vegetales se asocia con su interacción con los carbohidratos de los glicoconjugados presentes en las superficies de las células del sistema inmune. Estas interacciones pueden resultar en la transducción de señales que desencadenan mecanismos efectores involucrados en la respuesta contra infecciones de microorganismos. Las lectinas inmunomoduladoras también son capaces de incrementar la capacidad fagocítica de las células inmunes en presencia de bacterias (Jandú et al. 2017).

También, lectinas aisladas de algas y cianobacterias han ganado prominencia recientemente, debido a su afinidad inusualmente alta por carbohidratos y a su habilidad potencial de inhibir la infección del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) al interactuar con la glicoproteína gp120, que forma parte de la envoltura del virus. MVL, la lectina de la cianobacteria *Microcystis viridis*, es un ejemplo de estas lectinas (Gupta 2012).

A nivel clínico, las lectinas se pueden utilizar para identificar glicolípidos y glicoproteínas presentes en los eritrocitos, y determinar el grupo sanguíneo de un individuo; las lectinas vegetales aisladas de *Erythrina velutina* interactúan específicamente con los grupos sanguíneos A, B y O, mientras que lectinas de *Calpurnia aurea*, *Dolichos biflorus* y *Sophora japonica* se unen a eritrocitos de los grupos A y B. Otros grupos sanguíneos también pueden ser diferenciados por lectinas vegetales. Por ejemplo, la lectina aislada de *Iris amara* presenta afinidad por el grupo M, y las de *Bauhinia purpurea* y *Vicia graminea* tienen especificidad por el grupo N (Chen et al. 2018).

Las lectinas son también ampliamente utilizadas como herramientas en investigación, en la detección, identificación y evaluación funcional de distintos glicoconjugados. Para estos propósitos se utilizan tanto lectinas solubles, como inmovilizadas en diferentes tipos de soportes.

Dado que parte de nuestro interés se centra en la evaluación de la actividad antimicrobiana que desarrollan algunas lectinas, a continuación se mencionarán algunos antecedentes de este tema.

### 1.4.1. Actividad antimicrobiana:

Las **lectinas vegetales** descritas con actividad antibacteriana interactúan con peptidoglicanos, lipopolisacáridos u otras moléculas presentes en las paredes celulares bacterianas, interfiriendo con el crecimiento y la viabilidad celular y bloqueando los sitios de interacción con células del hospedero, previniendo la infección (Procópio et al. 2017). Estudios de microscopía electrónica han revelado que el tratamiento con lectina de *Araucaria angustifolia* promueve alteraciones morfológicas como la formación de poros en las membranas de bacterias Gram-positivas y formación de burbujas en las paredes celulares de bacterias Gram-negativas (Lagarda-Diaz et al. 2017). La lectina de *Indigofera heterantha*, una leguminosa nativa del Himalaya, exhibió un efecto antibacterial significativo sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Bacillus subtilis* (Iordache et al. 2015). En este caso, el efecto antibacteriano de la lectina también fue significativamente mayor contra las bacterias Gram-positivas. Se propuso que los altos niveles de peptidoglicanos presentes en la envoltura de estas bacterias podrían estar relacionados con el mayor efecto inhibitorio de las lectinas respecto a las Gram-negativas (Costa et al. 2010). StL-20, purificada a partir de *Solanum tuberosum* exhibió actividad antibacteriana contra *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella boydii* (Hasan et al. 2014). Las hojas de *Calliandra surinamensis*, una planta ornamental nativa de Brasil y Surinam, contienen una lectina (CasuL) con actividad citotóxica contra células tumorales, actividad bacteriostática contra *S. aureus* y *Staphylococcus saprophyticus*, y actividad antifúngica contra *Candida krusei* (Procópio et al. 2017).

A pesar del considerable número de lectinas vegetales que han sido caracterizadas, solo una fracción de las mismas ha presentado efectos antifúngicos contra hongos filamentosos. Dado que las lectinas vegetales no pueden penetrar la pared celular ni la membrana para alcanzar el citoplasma fúngico, la inhibición directa del crecimiento es poco probable. De todas maneras, se producen respuestas indirectas debido a que la unión de lectinas a quitina u otros polisacáridos en la superficie de los hongos puede afectar la supervivencia de estos (Lagarda-Diaz et al. 2017). La unión de lectinas a las hifas puede resultar en inhibición del crecimiento fúngico como resultado de una absorción pobre de los nutrientes y a interferencias con el proceso de germinación de esporas. También pueden causar diferentes cambios morfológicos que vuelven a los hongos más vulnerables a distintas situaciones de estrés. Por ejemplo, en un estudio, la interacción con lectinas resultó en hifas inflamadas, vacuolización del contenido celular y en un aumento en la lisis de la pared celular de las hifas, que resultó en cambio en hongos con mayor susceptibilidad al shock osmótico. Se reportó que la lectina de germen de trigo (WGA), una lectina con reconocimiento específico por oligosacáridos de quitina inhibe el crecimiento de las hifas y la germinación de esporas al unirse a los extremos de las hifas de hongos que contienen quitina (van Deenen et al. 2011).

Las **lectinas animales** también actúan en la defensa contra microorganismos. Están correlacionadas con la formación de poros sobre las membranas bacterianas,

que llevan a su permeabilización. Algunas de estas lectinas reconocen específicamente bacterias Gram-positivas y no Gram-negativas (De Oliveira Dias et al. 2015). Durante la infección viral, las lectinas actúan uniéndose a la partícula e inhibiendo su replicación y detectando algunos de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de los virus (Cherry 2012).

Aunque no se han publicado tantos estudios de actividad antimicrobiana de **lectinas fúngicas**, trabajos realizados por nuestro grupo demostraron que la lectina del hongo *Gymnopilus spectabilis* presentaba actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, mientras que la lectina de *P. atropurpurascens*, una lectina fúngica de unión a quitina, inhibía el crecimiento del hongo *A. niger* (Alborés et al. 2013, 2014).

En la tabla 1.1 se muestra una recopilación de algunas de las lectinas para las cuales se reporta actividad antimicrobiana.

### 1.5. Aislamiento y purificación de lectinas:

El ensayo de hemaglutinación (HAG) es un método simple y sencillo para estimar en forma semicuantitativa la presencia de actividad de lectina. Este método clásico permite detectar su presencia en diferentes materiales biológicos de partida, a través de la habilidad de aglutinar diferentes tipos de células y en particular, glóbulos rojos. Mediante ensayos de diluciones seriadas al medio de soluciones de lectinas en el ensayo de HAG, es posible estimar la actividad de lectina. Como se ilustra en la figura 1.1 los glóbulos rojos aglutinados, forman una malla que cubre todo el pocillo. Cuando no hay aglutinación, las células en suspensión, sedimentan y forman un botón en el fondo del pocillo (Sano y Ogawa 2014; Sharon y Lis 2007).

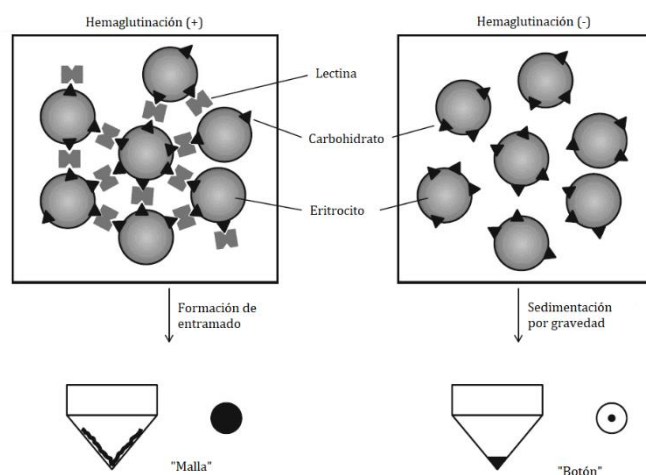


Figura 1.1: Lectinas aglutinando eritrocitos, extraída y modificada de Sano y Ogawa (2014).

Cuando se trabaja con extractos acuosos de materiales biológicos diversos, es posible que diferentes componentes puedan causar una HAG inespecífica. De obtenerse un resultado de HAG positivo y poder asociarlo a la presencia de lectinas, se debe demostrar que la aglutinación se debe específicamente a la interacción



**Tabla 1.1: Lectinas con actividad antimicrobiana.**

<b>Origen</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Actividad antimicrobiana</b>	<b>Referencia</b>
<i>Amaranthus viridis</i>	GalNAc, LacNAc, Fetuina, Asialofetuina	<i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Araucaria angustifolia</i>	GlcNAc	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Archidendron jiringa</i>	Mur, MurNAc	Bacterias Gram-positivas	(Iordache et al. 2015)
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	GlcNAc	<i>B. subtilis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Artocarpus incisa</i>	GlcNAc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Artocarpus integrifolia</i>	GlcNAc	<i>S. cerevisiae</i> , <i>F. moniliforme</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Astragalus mongholicus</i>	Lac, Gal	<i>F. oxysporum</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>Drechslera turcica</i> , <i>Colletotrichum</i> sp.	(Iordache et al. 2015)
<i>Branchiostoma japonicum</i>		<i>E. coli</i> ; <i>S. aureus</i>	(X. Liu et al. 2013)
<i>Bryothamnion seaforthii</i>	Mucina	<i>Streptococcus mutans</i>	(Procópio et al. 2017)
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	Mucina	<i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Streptococcus mitis</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Calliandra surinamensis</i>	Fetuina	<i>S. aureus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>C. krusei</i>	(Procópio et al. 2017)
<i>Canavalia boliviana</i>	Man	<i>S. mutans</i> , <i>Streptococcus oralis</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Cladonia verticillaris</i>	$\alpha$ -1,4-Poligalactósido	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Curcuma longa</i>	Glc	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Corynespora cassicola</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. albicans</i> , <i>Setosphaeria turcica</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Eriocheir sinensis</i>	Man, ManNAc	<i>S. aureus</i> ; <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ; <i>Aeromonas hydrophila</i>	(Huang et al. 2014)
<i>Eucheuma serra</i>	Man	<i>Vibrio vulnificus</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Eugenia uniflora</i>	Carbohidratos complejos	<i>B. subtilis</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Euphorbia trigona</i>	GlcNAc, Gal	<i>A. niger</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>F. graminearum</i>	(van Deenen et al. 2011)
<i>Galaxaura marginata</i>	Man	<i>Vibrio</i> sp.	(Iordache et al. 2015)
<i>Gastrodia data</i>	$\alpha$ -Man, GlcNAc	<i>B. cinerea</i> , <i>Valsa ambiens</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Ganoderma lucidum</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Gymnopilus spectabilis</i>	Neu5Ac, GlcNAc, GalNAc, LacNAc	<i>S. aureus</i> , <i>A. niger</i>	(Alborés et al. 2013)
<i>Hevea brasiliensis</i>	Quitotriosa	<i>B. cinerea</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>Parastagonospora nodorum</i> , <i>Phycomyces blakesleeanus</i> , <i>Magnaporthe grisea</i> , <i>Trichoderma hamatum</i> , <i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	(Iordache et al. 2015)

<i>Homo sapiens</i>	β-Galactosido	<i>Listeria monocytogenes, Neisseria gonorrhoeae</i>	(John et al. 2002)
<i>Ictalurus punctatus</i>	Man	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	(H. Zhang et al. 2012)
<i>Indigofera heterantha</i>	Mur	<i>K. pneumoniae, S. aureus, E. coli, B. subtilis</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Lathyrus ochrus</i>	Mur, MDP	<i>B. subtilis, P. aeruginosa, E. coli, S. aureus</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Lens culinaris</i>	Glc, Man	<i>S. aureus, B. subtilis, P. aeruginosa, E. coli,</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Marsipenaeus japonicus</i>		<i>Vibrio anguillarum</i>	(Q. Zhang et al. 2014; Xu et al. 2014)
<i>Mus musculus</i>	Gal	<i>C. albicans</i>	(Jawhara et al. 2008)
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	GlcNAc	<i>K. pneumoniae, B. subtilis, E. coli, Corynebacterium callunae, S. aureus, P. aeruginosa, Fusarium sp., S. faecalis</i>	(Sá et al. 2009)
<i>Ophiopogon japonicus</i>	Man	<i>R. solani, F. graminearum</i>	(Tian et al. 2008)
<i>Opuntia ficus ssp. indica</i>	Glc, Man	<i>C. albicans, Colletotrichum gloeosporioides, F. oxysporum, F. solani</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Oryza sativa</i>		<i>M. grisea</i>	(X. Chen et al. 2006)
<b>Phaseolus vulgaris</b>	Neu5Ac	<i>Sclerotinia sclerotiorum, Cochliobolus heterostrophus, R. solani, F. graminearum</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Phthirusa pyrifolia</i>	Fru-1,6P	<i>S. epidermidis, S. faecalis, B. subtilis, K. pneumoniae, Fusarium lateritium, R. solani</i>	(Costa et al. 2010)
<i>Pisum sativum</i>	Man	<i>Trichoderma viride, F. oxysporum, A. flavus</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Punctularia atropurpurascens</i>	GlcNAc	<i>A. niger</i>	(Alborés et al. 2014)
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Quitina	<i>C. albicans, Fusarium sp., Aspergillus sp.</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Sebastiania jacobinensis</i>	Carbohidratos complejos	<i>F. moniliforme, F. oxysporum</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Solanum integrifolium</i>	Quitina	<i>R. solani</i>	(Chen et al. 2018)
<i>Solanum tuberosum</i>	Quitina	<i>E. coli, L. monocytogenes, S. enteritidis, S. boydii, Rhizopus sp., Penicillium sp., A. niger</i>	(Hasan et al. 2014)
<i>Triticum aestivum</i>	Man	<i>F. graminearum, Blumeria graminis P. syringe pv tabaci</i>	(Ma et al. 2010)
<i>Triticum vulgare</i>	GlcNAc, Neu5Ac	<i>S. epidermidis, Streptococcus sp.</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Urtica dioica</i>	GlcNAc	<i>S. nodorum, B. cinerea, T. viride, C. lindemuthianum, P. blakesleeanus, T. hamatum, Pleospora betae</i>	(Iordache et al. 2015)
<i>Vicia faba</i>	Neu5Ac, Glc	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>	(Iordache et al. 2015)

Tabla extraída de Iordache et al. 2015 con modificaciones.

lectina/carbohidrato y para ello, se deben realizar ensayos de inhibición de HAG. Estos ensayos permiten determinar la especificidad de la lectina en estudio.

Para determinar las propiedades moleculares es esencial contar con lectinas purificadas (Nascimento et al. 2012). Uno de los principales avances en el campo de la purificación de lectinas se dio con el uso de la cromatografía de afinidad utilizando geles de dextranos entrecruzados para su captura, descrito por Goldstein y sus colaboradores en 1965. A partir de estos estudios, la mayoría de las estrategias de purificación de lectinas incluyen algún paso de cromatografía de afinidad, ya sea mediante precipitación con polisacáridos (según la especificidad) o mediante adsorbentes de afinidad preparados por inmovilización covalente de carbohidratos específicos en diferentes soportes, como Sephadex (dextrano entrecruzado) y Sepharose (perlas de agarosa) (Nascimento et al. 2012). Los autores realizaron una revisión sobre las metodologías empleadas en la purificación de lectinas, basada en la información reportada en 46 artículos. En este estudio se reportan porcentajes de recuperación de lectinas (basados en actividad de lectina) que varían notablemente de una fuente a otra, siendo de 0.002 % para el alga marina *Amansia multifida* hasta de 92.5% de recuperación para las semillas de *Erythrina speciosa*.

## **1.6. Lectinas seleccionadas para el presente trabajo:**

En esta Tesina se decidió trabajar con lectinas provenientes de dos diferentes fuentes: vegetales y fúngicas. En el caso de las vegetales, se seleccionaron dos especies vegetales: *Cayaponia martiana* y *Glycine max*. La primera, constituye una fuente muy interesante ya que se trata de una especie nativa de nuestro país, y en la que, en relevamientos previos realizados por el grupo, se detectó actividad HAG (Plá et al., 2003). En el caso de *G. max*, se trata de una lectina que ya ha sido ampliamente estudiada y caracterizada, pero que poco se ha reportado sobre su posible actividad antimicrobiana. En el caso de lectinas fúngicas, se utilizaron hongos filamentosos provenientes de aislamientos realizados por el grupo, a partir de muestras colectadas en la Antártida.

### **1.6.1. *Cayaponia martiana*:**

*Cayaponia martiana* o tayuyá se ha utilizado en la medicina popular como purgativa, depurativa, en malestares digestivos y renales y en afecciones de la piel. Es una especie trepadora voluble con zarcillos, con frutos de hasta un centímetro de diámetro con franjas amarillas (Figura 1.2). Es una planta heliófila que aparece en formaciones campestres, jardines abandonados y en bordes de matorrales, y es considerada una especie nativa de nuestra región (Ferreira y Rosa 2009).

En extractos acuosos preparados a partir de hojas de *C. martiana* se detectó actividad HAG únicamente frente a eritrocitos de conejo y la actividad fue inhibida por manosa, galactosa, rafinosa, trehalosa y la glicoproteína fetuina (aislada a partir de suero fetal bovino). En extractos de frutos de esta planta, también se detectó actividad HAG frente a glóbulos rojos de conejo y esta actividad fue inhibida por

fetuina. En cuanto a los niveles de actividad, la actividad hemaglutinante específica (AHE) fue 20 veces mayor en el extracto de frutos que en el de hojas (Plá et al. 2003).



Figura 1.2: Muestra de *Cayaponia martiana* utilizada en este trabajo.

### 1.6.2. *Glycine max*:

*Glycine max* (soja) es uno de los cultivos de leguminosas más importante a nivel mundial, para la producción de harinas con diversos usos en alimentación. Las semillas poseen una lectina (identificada como SBA, del inglés *soybean agglutinin*) en altas concentraciones. La SBA es una proteína ampliamente estudiada y su estructura se encuentra dilucidada: es una lectina tetramérica con especificidad por Gal y GalNAc, aunque su especificidad por GalNAc es 40 veces mayor que por Gal (Sharon y Lis 2007). Forma complejos con OGS multiantenarios con residuos terminales de Gal y GalNAc (Olsen et al. 1997). Se han encontrado varias aplicaciones potenciales para la misma. Se ha demostrado previamente que la aglutinación diferencial con SBA puede concentrar células madre pluripotentes a partir de médula ósea en un solo paso, y esta técnica es adecuada para manejar los grandes volúmenes de médula ósea necesarios para realizar trasplantes (Reisner y Gan 1985). Asimismo, el marcado con SBA se puede utilizar para predecir la prognosis de pacientes con cáncer gástrico (Koyama et al. 1999). Sin embargo, la aplicación de esta lectina como agente antimicrobiano no había sido evaluada.

### 1.6.3. Hongos filamentosos:

El estudio de lectinas vegetales, animales, virales y bacterianas ha sido muy activo y multifacético, en comparación con el volumen de trabajos que se han llevado a cabo con lectinas aisladas a partir de hongos filamentosos (Khan y Khan 2011).

Asimismo, si bien se han realizado estudios de lectinas de la familia LecRLK provenientes de musgos antárticos (S. Liu et al. 2017), y de lectinas provenientes de varias especies de algas de origen antártico (Souza y Teixeira 2009), no se encuentran hasta la fecha reportes de caracterización de lectinas provenientes de hongos antárticos.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General:

Producir lectinas a partir de materiales vegetales y fúngicos con niveles de pureza adecuados para evaluar su potencial como agentes antimicrobianos de importancia tanto en salud humana y animal, como agrícola.

### 2.2. Objetivos específicos:

2.2.1. Preparación de extractos acuosos de las especies vegetales *Cayaponia martiana* y *Glycine max* y de hongos filamentosos de origen antártico.

2.2.2. Purificación y producción de las lectinas a partir de dichos extractos.

2.2.3. Evaluación de actividad antimicrobiana de estas lectinas frente a microorganismos referentes, usados en los programas de screening de patógenos y fitopatógenos.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Fuentes de lectinas:

#### 3.1.1. Material vegetal:

Se usaron frutos verdes y frutos maduros provenientes de *C. martiana* colectados en la costa atlántica de nuestro país y también provenientes del Jardín Botánico de Montevideo. Muestras del material recolectado se identificaron y depositaron en el herbario de la Facultad de Química.

Se usó también harina de soja (*Glycine max*) disponible comercialmente en nuestro país, como fuente de lectina.

#### 3.1.2. Material fúngico:

##### 3.1.2.1. Colecta de muestras:

En febrero de 2017 se recolectaron muestras de madera en la isla Rey Jorge, la mayor de las islas Shetland del Sur, en donde se encuentra la Base Científica Antártica Artigas (Fig. 3.1). Las muestras se recolectaron en las zonas próximas a la base y fueron conservadas en placas cerradas y en frío hasta su arribo a Montevideo. El material fúngico utilizado fue aislado de estas muestras.



Figura 3.1: Muestreo en la isla Rey Jorge realizado por el autor entre el 24/02/2017 y el 03/03/2017.

##### 3.1.2.2. Aislamiento de hongos:

Se colocaron 3 fragmentos pequeños de cada muestra de madera en placas de Petri con medio Agar diclorán-rosa de Bengala-cloranfenicol (DRBC proveniente de Merck KGaA, Alemania), un medio selectivo para hongos y levaduras que inhibe el crecimiento de bacterias y de mohos de rápido crecimiento, y se incubaron a 20°C hasta observar crecimiento de micelio. Tomando como inóculo el micelio de cada hongo morfológicamente diferenciable (no esporulado), se realizó la resiembra en placas con medio Agar patata-glucosa (PDA, Merck KGaA, Alemania). Se incubaron durante 7 días a 20°C. Se realizó la siembra en tubos de PDA de aquellos hongos que fueron aislados en placa, se incubaron a 20°C hasta observar crecimiento del micelio y se conservaron a 4°C.

### 3.1.2.3. Identificación molecular de hongos:

Para la extracción de ADN genómico de 3 cepas se partió del micelio crecido en placa de PDA, raspando con una espátula estéril. Se colocó el micelio en tubos y se les agregó perlas de vidrio y 500  $\mu$ L de buffer de lisis con 3% de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), 150 mM Tris-HCl pH 8, suplementado con 2.6 M NaCl y 2 mM EDTA. Los tubos fueron agitados en Vortex por 1 minuto a máxima potencia para liberar el contenido celular al medio (etapa de lisis). Se centrifugó a 1200 rpm por 30 segundos para separar los restos del material celular en el fondo del tubo (precipitado). Se pasó el sobrenadante a tubos limpios que luego fueron incubados durante 20 minutos a 65°C en baño termostatzado. Para la etapa de purificación del ADN se agregó a los tubos 500  $\mu$ L de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se agitaron manualmente y se centrifugaron por 7 minutos a 10000 rpm. Se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) conteniendo el ADN, evitando perturbar la interfase, a nuevos tubos. Se adicionó isopropanol frío en cantidad aproximadamente igual al volumen de lisado para precipitar el ADN. Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 15000 rpm durante 7 minutos. Se retiró cuidadosamente el isopropanol y se lavó el pellet de ADN con 500  $\mu$ L de 70% etanol frío, se resuspendió suavemente y se centrifugó (3 minutos a 15000 rpm). Se retiró el etanol y se secó el pellet en estufa a 37°C durante 15 minutos. Por último, se resuspendió el pellet en 100  $\mu$ L de agua MilliQ estéril.

A partir del ADN genómico obtenido se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la secuencia ITS1/ITS2 (*Internal Transcribed Spacer*) utilizando los primers Forward ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') y Reverse ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

La PCR se realizó en un sistema de reacción conteniendo 2.5  $\mu$ L de buffer 10X (Tiangen Biotech co. Ltd., China), 1.5  $\mu$ L de solución de MgCl 25 mM (Tiangen Biotech co. Ltd., China), 16.3  $\mu$ L de agua miliQ, 2.5  $\mu$ L de dNTPs 2 mM (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), 0.5  $\mu$ L de cada primer y 0.2  $\mu$ L de Taq polimerasa (Tiangen Biotech co. Ltd., China), y 1  $\mu$ L de ADN (25  $\mu$ L totales).

La reacción se hizo en un termociclador MultiGene™ Mini Personal Thermal Cycler (Labnet International, Inc., USA), con 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos. Luego se realizaron 30 ciclos de 94°C durante 1 minuto, alineamiento a 55°C por 1 minuto y extensión a 72°C durante 3 minutos. Por último, se realizó un paso de elongación final a 72°C durante 7 minutos.

Se evaluó la calidad del ADN genómico y de los fragmentos de PCR por corrida electroforética en gel de agarosa 0.8% (Amresco, USA) en buffer Tris/Borato/EDTA (TBE) 0.5X. Se sembraron las muestras con buffer de carga Loading Dye 6X (Thermo Scientific, USA) y con GelRED™ 3X (Biotum Inc., USA) para la visualización post-corrida. Se realizó la corrida a 100 V constantes, y se reveló el gel bajo lámpara UV.

Los amplicones se secuenciaron en Macrogen, Inc. (Corea del Sur) y las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos de GeneBank.

## 3.2. Preparación de extractos acuosos:

### 3.2.1. Extractos a partir de material vegetal:

Se prepararon extractos acuosos a partir de frutos verdes (151 g) y frutos maduros (190 g) provenientes de *C. martiana* (Figura 3.2) y de harina preparada a partir de porotos de soja (*G. max*) de origen comercial (77.28 g).



Figura 3.2: Frutos maduros (izquierda) y verdes (derecha) de *C. martiana*, seleccionados para este trabajo.

Los extractos de frutos verdes y maduros de *C. martiana* se prepararon mediante extracción con buffer PBS pH 7.4 durante 2 horas a 4°C, centrifugación a 9000 rpm durante 30 minutos a 4°C y separación del sobrenadante. A partir del mismo se concentraron las proteínas solubles mediante precipitación con solución saturada 50 % de sulfato de amonio, centrifugación a 9000 rpm durante 20 minutos a 4°C y resuspensión en buffer PBS del precipitado, como se reporta por Plá *et al.* (Plá *et al.* 2003). El sobrenadante resultante se usó como material de partida para la purificación de la lectina.

Para preparar los extractos de *G. max* se deslipidizó la harina de soja, mediante agregado de 100 mL de n-hexano por cada 50 g de harina, agitando por 90 minutos y filtrando rápidamente por papel del filtro. El material retenido en el filtro se dejó secando a temperatura ambiente por 48 horas. A continuación, se realizó la extracción con 170 mL de 0.15 M NaCl durante 2 horas, se centrifugó a 9500 rpm durante 15 minutos a 4°C y se separó el sobrenadante. Luego se realizó la concentración de proteínas mediante precipitación con solución saturada 80 % de sulfato de amonio, centrifugación a 9000 rpm durante 20 minutos a 6°C y resuspensión del precipitado en 0.15 M NaCl. El sobrenadante resultante se usó como material de partida para la purificación de la lectina.

### 3.2.2. Extractos a partir de micelios fúngicos:

Se prepararon extractos a partir los micelios de 3 aislamientos de hongos nombrados como F121, F141 y F192 (Fig. 3.3). Estas cepas fueron crecidas en medio Agar Extracto de Malta, inoculándolos luego en matraces con medio 1.25% Extracto de Malta e incubándolos a 28°C durante 2 semanas, como se describe en Alborés *et al.* (2012). El micelio crecido se filtró y pulverizó mediante el agregado de nitrógeno



líquido en mortero y se resuspendió en 8 mL de buffer PBS. La suspensión se centrifugó a 12000 g durante 30 minutos y se trabajó con los sobrenadantes lípidos, utilizándose estas soluciones como material de partida para la evaluación de actividad de lectina.



Figura 3.3: Aislamiento de las cepas (de izquierda a derecha) F121, 141 y F192.

### 3.3. Determinación de la actividad hemaglutinante (HAG):

Se realizaron ensayos de HAG usando glóbulos rojos obtenidos a partir de sangre fresca de rata para las lectinas fúngicas y de *G. max*, y de conejo para la lectina de *C. martiana*. La sangre fue recogida con anticoagulante y los eritrocitos se separaron por centrifugación a 1500 g por 3 minutos a 4°C. Se lavaron 5 veces con buffer PBS y se preparó una suspensión al 4 % (v/v) de glóbulos rojos en PBS.

Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación con fondo en U. En cada pocillo se colocó 25 µL de 0.15 M NaCl, 25 µL de solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en 0.15 M NaCl, 25 µL de muestra vegetal o fúngica y 25 µL de suspensión de eritrocitos al 4 %. Se mezcló por agitación suave y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se consideraron positivos los pocillos en los que se observó aglutinación de los eritrocitos y negativos aquellos en los que se observó precipitación fácilmente dispersable por agitación. Como control negativo se utilizó buffer PBS.

Se estimó la actividad HAG mediante ensayos de dilución seriada al medio, de la muestra a analizar. Se definió como Unidad de Lectina (UL), el inverso de la mayor dilución que dio HAG visible luego de treinta minutos de incubación (Plá et al. 2003).

Se definió actividad HAG específica (AHE) como el cociente entre el título (UL/ml) y la concentración de proteínas (mg/ml). El factor de purificación (FP) para la lectina se determinó mediante el cociente entre la AHE posterior y la AHE previa a la etapa cromatográfica correspondiente.

La concentración de proteína se determinó por espectrofotometría UV a 280 nm, y mediante el método del ácido bicinconínico (BCA) usando BSA como estándar.

### 3.4. Determinación de especificidad de lectinas fúngicas:

La misma se realizó mediante ensayos de inhibición de la HAG. El ensayo se realizó en placas de microtitulación a las que se agregó por triplicado en cada

pocillo: 25  $\mu$ L de extracto fúngico en la concentración correspondiente a HAG<sub>50%</sub> (definida como la concentración de muestra previa a la última que generó aglutinación visible de eritrocitos); 25  $\mu$ L de BSA al 1% en 0.15 M NaCl; 25  $\mu$ L de solución del carbohidrato a estudiar disuelto en 0.15 M NaCl y 25  $\mu$ L de suspensión de glóbulos rojos al 4 %. En los controles positivos (sin inhibición de la hemaglutinación) se sustituyó el carbohidrato a estudiar por 0.15 M NaCl. En los controles negativos (sin hemaglutinación) se sustituyó el extracto fúngico por buffer PBS.

Se evaluaron los siguientes mono- y disacáridos, en concentraciones 100 mM en 0.15M NaCl: arabinosa, fructosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico, glucosamina, glucosa, glucosa-6-P, ribosa, fucosa, galactosa, galactosilamina, manosa, metil-D-manósido, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, ramnosa, rafinosa, sorbitol, lactosa, melibiosa y sacarosa. El disacárido N-acetilactosamina se usó en concentración 10mM en 0.15M NaCl.

### **3.5. Purificación de las lectinas:**

#### **3.5.1. Cromatografía de afinidad:**

La purificación de las lectinas de *C. martiana* y *G. max* se realizó mediante cromatografía de afinidad en columnas. Los adsorbentes de afinidad (manosil-Sepharose y galactosil-Sepharose) fueron sintetizados utilizando metodologías ya reportadas previamente por nuestro grupo (Franco Fraguas et al. 2003; Alborés et al. 2012; Plá et al. 2003).

Se lavó el soporte Sepharose 4B con 200 mL de agua destilada en placa filtrante y el líquido residual se retiró con succión suave y 10.0 g de este gel escurrido, se suspendieron en 9.0 mL de 4M NaOH en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se agregó una punta de espátula de borohidruro de sodio y 5.5 mL de epiclorhidrina y se verificó pH en 13-14. Se agitó la suspensión a temperatura ambiente por 90 minutos, se filtró por placa, se lavó con 2M NaOH y luego agua destilada hasta pH neutro. Se pesaron 6.0 g de gel escurrido y se suspendió en 6.0 mL de una solución al 10% de manosa o galactosa 0.5M NaOH. La suspensión se agitó suavemente overnight a temperatura ambiente y se lavó en placa filtrante con 0.5 M NaOH. Los grupos epóxido restantes se bloquearon con  $\beta$ -mercaptoetanol (60  $\mu$ L en 6 mL de 0.5M NaOH) por 2 horas a temperatura ambiente. El gel obtenido se lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y se equilibró con una solución de 0.15M NaCl. Se guardó en heladera hasta su uso.

##### **3.5.1.1. Purificación de lectina de *Cayaponia martiana*:**

Se aplicaron 24 mL de extracto de frutos maduros y 30 mL de extracto de frutos verdes, a columnas empaquetadas con 7.0 mL de gel manosil-Sepharose, se lavó con buffer PBS hasta A<sub>280nm</sub> menor a 0.05 y se eluyó la proteína con metil-manósido 0.1 M en PBS. Se recogieron 5 fracciones de 2 mL.

### **3.5.1.2. Purificación de lectina de *Glycine max*:**

Se aplicaron 20 mL de extracto de harina de porotos de soja a una columna empaquetada con 4.7 mL de gel galactosil-Sepharose, se lavó con buffer PBS hasta  $A_{280\text{nm}}$  menor a 0.05 y se eluyó con galactosa 0.1 M en PBS. Se recogieron una fracción de 2 mL y 2 fracciones de 3 mL.

### **3.5.2. Cromatografía de intercambio iónico:**

Las lectinas fúngicas se purificaron por cromatografía de intercambio iónico.

Se aplicaron 5.5 mL de extracto a una columna empaquetada con 2.0 mL de gel de DEAE-Sepharose, se lavó con PBS pH 7.4 y la elución de las proteínas se realizó primero con el mismo buffer PBS suplementado con 0.5 M NaCl; y posteriormente se eluyó por cambio de pH, con solución de buffer 50 mM acetato pH 5.6, suplementado con 0.5 M NaCl. Se recogieron 4 fracciones de 2 mL en ambos casos y se evaluó la actividad HAG de todas las fracciones recogidas.

## **3.6. Evaluación de pureza de las lectinas:**

Se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando el equipo PhastSystem (Pharmacia, Suecia) y geles comerciales con gradiente 8-25. A un volumen de 12.8  $\mu\text{L}$  de muestra se agregaron 40  $\mu\text{L}$  de buffer 10mM Tris/HCl pH 8.0, suplementado con 1 mM EDTA, 2 % SDS y 10% glicerol (sample buffer), 1  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y 1  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol. Las muestras se hirvieron por 5 minutos en baño de agua a ebullición y se enfriaron. Para las lectinas vegetales se usó como marcador de peso molecular el Kit de calibración de bajo peso molecular (LMW, GE Healthcare) con:  $\alpha$ -lactalbúmina (14.4 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa), anhidrasa carbónica (30.0 kDa), ovoalbúmina (45.0 kDa), seroalbúmina bovina (66.0 kDa) y fosforilasa b (97.0 kDa). Para las corridas correspondientes a las lectinas fúngicas se usó un Kit alternativo de LMW (Sigma), que contiene  $\alpha$ -lactalbúmina (14.4 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa), tripsinógeno de páncreas bovino (24.0 kDa), anhidrasa carbónica (30.0 kDa), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36.0 kDa), ovoalbúmina (45.0 kDa) y seroalbúmina bovina (66.0 kDa).

Los geles se revelaron por tinción con plata o azul de Coomassie, según las especificaciones del fabricante para cada caso.

## **3.7. Ensayos de actividad antimicrobiana de las lectinas:**

Se realizaron los ensayos usando: la lectina de *G. max* purificada por cromatografía de afinidad en Gal-Sepharose; la lectina de *C. martiana* purificada por cromatografía de afinidad en Man-Sepharose y las lectinas del hongo filamentoso que presentó mayor HAG y AHE, purificadas por cromatografía de intercambio iónico.

### **3.7.1. Microorganismos evaluados y condiciones de cultivo:**

Para el estudio se seleccionaron distintas especies de bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Los microorganismos evaluados fueron: *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* y *Penicillium expansum*.

Las bacterias *A. baumannii*, *B. subtilis*, *E. cloacae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *X. vesicatoria* fueron cultivadas por 24 horas a 35°C en placa de Agar nutriente (Oxoid LTD., Inglaterra). La levadura *C. albicans* se cultivó por 24 horas a 37°C en placa de PDA y los hongos filamentosos *A. flavus*, *A. niger*, *B. cinerea*, *F. graminearum* y *P. expansum* se cultivaron por 48 horas a 28°C en tubos de PDA.

Se prepararon suspensiones partir de estos cultivos frescos; las bacterias y la levadura se suspendieron en suero fisiológico hasta alcanzar una turbidez correspondiente a MacFarland N°1 ( $3 \times 10^8$  células bacterianas/mL). Para preparar las suspensiones de esporas de hongos filamentosos, a los tubos crecidos se les agregó 2 mL de suero fisiológico con Tween 0.1%, se agitó en Vortex por 1 minuto y se pasó la solución a un tubo limpio. Se realizó recuento de las esporas al microscopio en cámara de Neubauer.

### **3.7.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana:**

Se utilizó el ensayo de determinación de concentración inhibitoria mínima (CIM), para evaluar el efecto de las lectinas estudiadas sobre el crecimiento de los microorganismos evaluados y a la misma vez, para determinar cuál es la concentración mínima de la lectina a la que ya no se observa crecimiento.

La técnica se realizó en placas de microtitulación de fondo plano. Se realizaron diluciones seriadas al medio de la lectina con caldo Mueller-Hinton (MHB) (HiMedia Laboratories Pvt., Ltd., India) y se agregaron 10 µL de suspensión de microorganismo alcanzando un volumen de 200 µL en cada pocillo.

Se cultivó la placa con bacterias y/o levaduras por 24 horas a 37°C, y las placas con hongos por 48 horas a 28°C. En los controles positivos de crecimiento se agregaron 200 µL de MHB y 10 µL de suspensión, y a los controles negativos 200 µL de MHB. Para la visualización se utilizó 2,3,5-Trifeniltetrazolio cloruro (TTC, Merck KGaA, Alemania) como revelador.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Lectina de *Cayaponia martiana*:

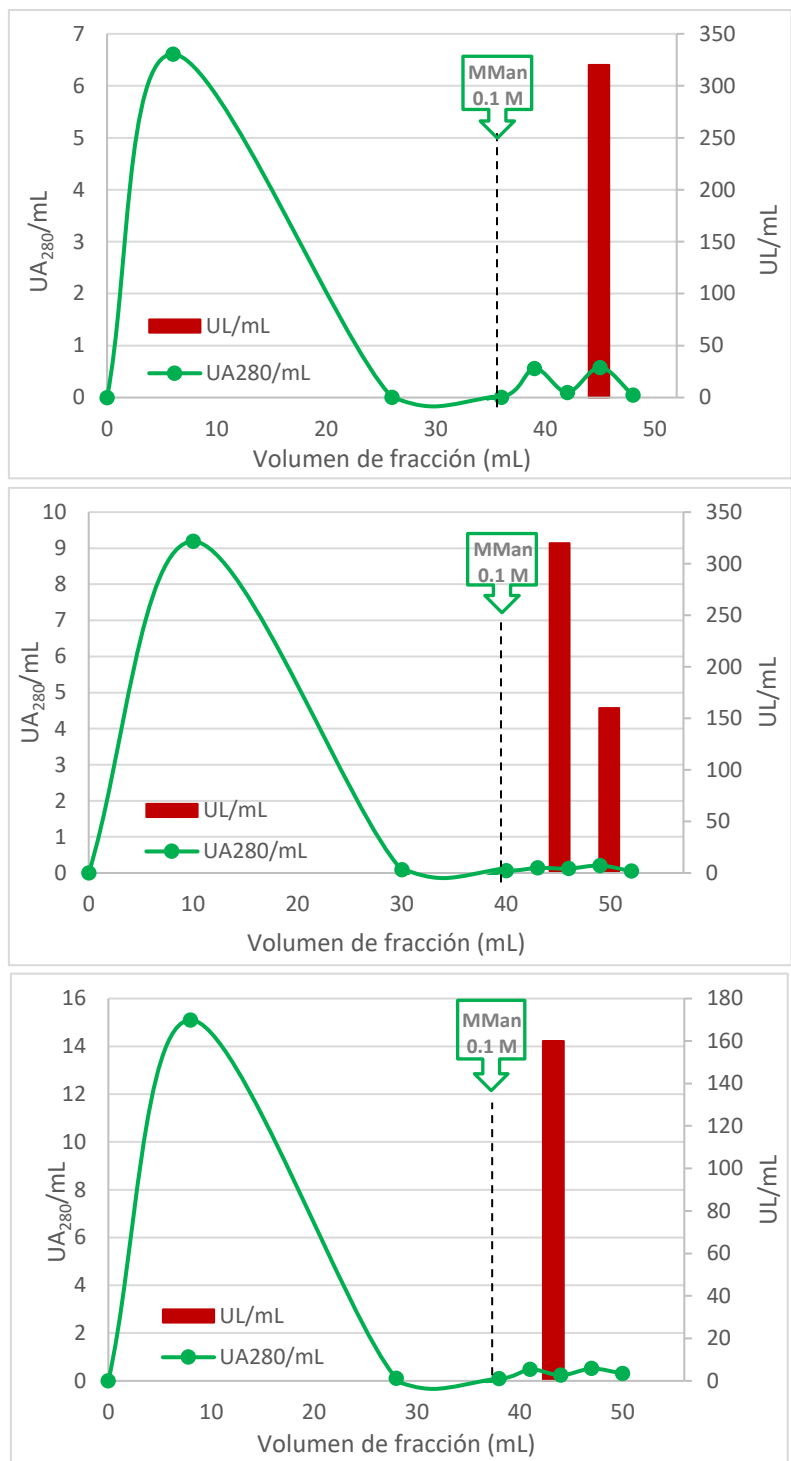
Se prepararon extractos acuosos a partir de frutos verdes y maduros de *C. martiana* determinándose, mediante ensayo de HAG con glóbulos rojos de conejo, niveles de actividad de 640 UL/ml y 1280 UL/mL, respectivamente.

Como se reporta por Plá *et al.*, la lectina de *C. martiana* presenta afinidad por manosa, entre otros carbohidratos, por lo que se optó por purificar la proteína por cromatografía de afinidad (Plá *et al.* 2003).

En un primer experimento se empaquetaron 3 columnas (1.0 cm de diámetro interno cada una) con 7.0 mL de gel manosil-Sepharose preparado previamente por el grupo de trabajo (6.3  $\mu$ moles de manosa/mL de gel escurrido, dato aportado por el grupo). Se utilizó esta estrategia de trabajo, dado que en trabajos previos se observó que luego de los primeros volúmenes de extracto aplicados, el flujo de trabajo se reduce en forma importante por efectos de taponamiento al tope de la misma; este efecto se vería muy aumentado si se trabajaba con una única columna empaquetada con 20 mL de gel. Se aplicó entonces, el extracto de **frutos maduros** simultáneamente en las 3 columnas (C1, C2 y C3) y se realizó la elución con 0.1 M metil-manósido (MMan) en PBS. A cada fracción cromatográfica se midió  $A_{280\text{ nm}}$  y actividad HAG. En la tabla 4.1 se muestra la AHE de las fracciones eluidas y en la Figura 4.1 se muestran los perfiles de elución y de actividad HAG de cada corrida en cada columna.

Tabla 4.1: Purificación de lectina de extracto de frutos maduros de *C. martiana* en Manosil-Sepharose

Fracción	UA <sub>280</sub> /mL	Proteína (mg/mL)	HAG (UL/mL)	AHE (UL/mg prot.)	
Extracto aplicado	32.7	34.9	1280	37	
<b>C1</b> Eluído 3	0.582	0.621	320	515	
<b>C2</b>	Eluído 2	0.122	0.130	320	2459
	Eluído 3	0.206	0.220	160	728
<b>C3</b> Eluído 2	0.234	0.250	160	641	



**Figura 4.1: Perfil de elución de lectina de *C. martiana* y actividad de lectina de las distintas fracciones, a partir de extracto de frutos maduros.**

A los efectos de determinar la HAG en cada fracción, se tomó una alícuota de 1.0 ml y se gel filtró en columna NAP-5 (Sephadex G-25) para remover el MMan que podría interferir en el ensayo. Posteriormente, se mezclaron todas las fracciones eluidas y con actividad HAG y el pool se dializó contra agua destilada para remover el metil-manósido, recuperándose un volumen final de 27 mL de dializado. Para concentrar la muestra se liofilizó durante 48 horas y se resuspendió en 1.5 mL de agua destilada, obteniéndose una solución de lectina purificada, con 4.0 mg/mL y

640 UL/mL (AHE=160). Considerando esta AHE de la lectina purificada respecto a la del extracto de partida, se obtiene un factor de purificación de 4.0. Cuando se realizó control de esta purificación, mediante SDS-PAGE, en la Figura 4.2 se puede ver que, si bien se logra una purificación de las proteínas con respecto al extracto original luego de la cromatografía, y se observa una banda intensa de 30 kDa que se correspondería con la lectina de *C. martiana*, se detectaron numerosas bandas que indican la presencia de otras múltiples proteínas, lo que concuerda con el bajo factor de purificación (4.0) alcanzado.

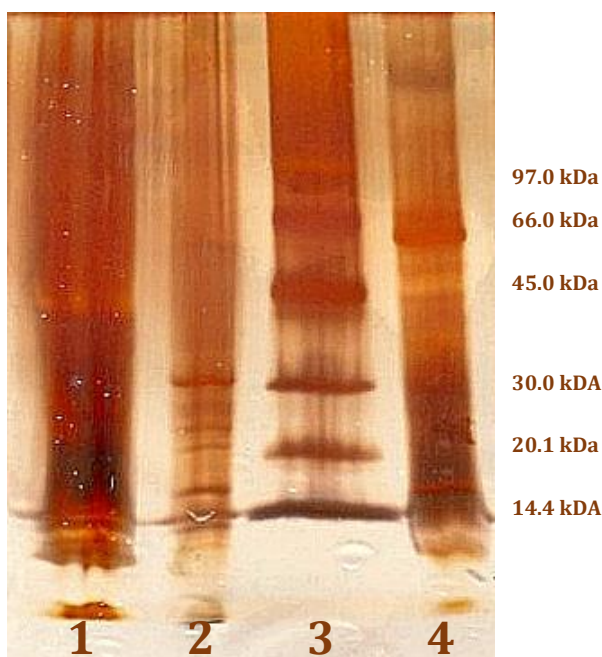


Figura 4.2: SDS-PAGE revelada con método de tinción de plata. 1: extracto de frutos maduros de *C. martiana*; 2: eluidos con actividad hemaglutinante, dializados y liofilizados; 3: LMW; 4: percolado de primera columna.

En otro experimento en paralelo, se repitió la cromatografía de afinidad, pero utilizando el extracto de **frutos verdes** de *C. martiana*. Para este estudio se sintetizó un nuevo batch del adsorbente manosil-Sepharose. Para ello se procedió a protocolos desarrollados en el laboratorio y descritos en Materiales y métodos (Sección 3.5.1.). El adsorbente sintetizado contiene 6.0  $\mu$ moles de manosa/mL de gel escurrido. A continuación, se empaquetó una columna con 6.5 mL del nuevo adsorbente. A ésta se aplicaron 30 mL de extracto de frutos verdes de *C. martiana*, y se eluyó nuevamente con 0.1 M metil-manósido en PBS. En la tabla 4.2 se muestra la AHE de la fracción eluída y en la Figura 4.3 se muestra el perfil de elución y de actividad HAG de la corrida, habiendo procedido como antes, gel filtrando el eluído para remover el metil-manósido.

Tabla 4.2: Purificación de lectina de extracto de frutos verdes de *C. martiana* en Manosil-Sepharose

Fracción	UA <sub>280</sub> /mL	Proteína (mg/mL)	HAG (UL/mL)	AHE (UL/mg prot.)
Extracto aplicado	70.4	75.1	640	9
Eluído 2	0.044	0.047	640	13636

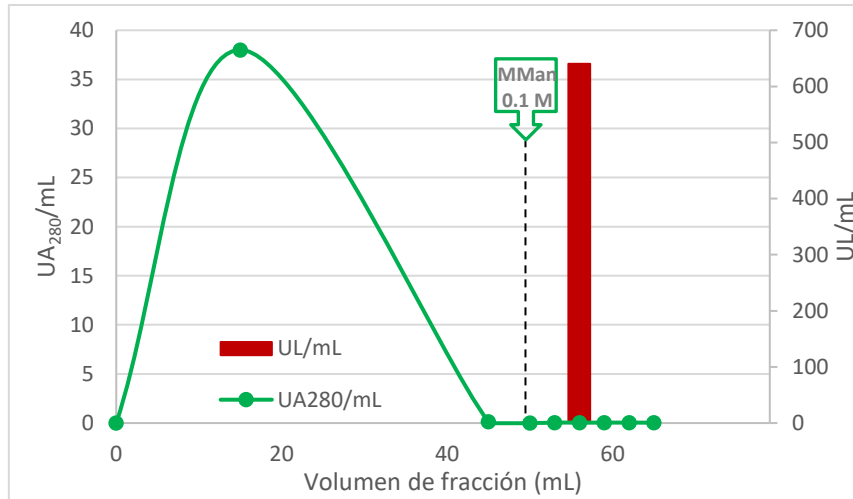


Figura 4.3: Perfil de elución de lectina de *C. martiana* y actividad de lectina de las distintas fracciones, a partir de extracto de frutos verdes.

Se analizaron, mediante SDS-PAGE, las primeras 3 fracciones de elución y se incluyó también el extracto verde de partida y las fracciones purificadas a partir de frutos maduros, como se muestra en la Figura 4.4. Nuevamente se obtuvieron fracciones con múltiples bandas proteicas.

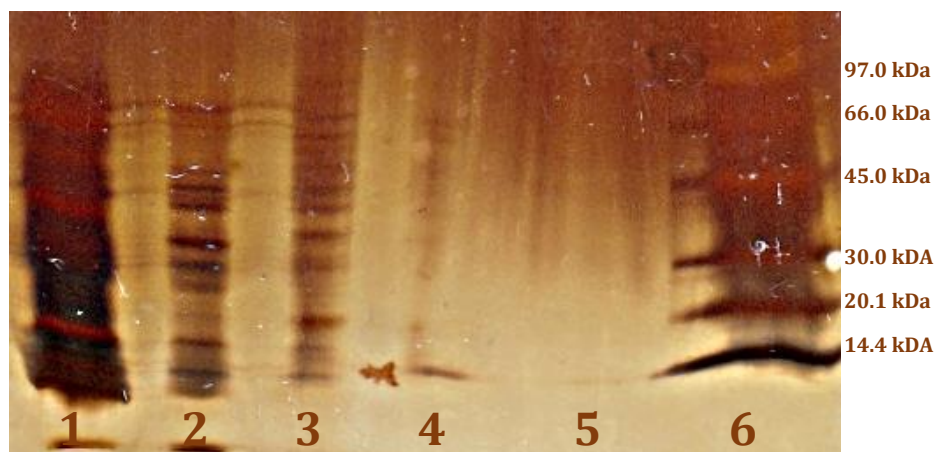


Figura 4.4: SDS-PAGE revelada con método de tinción de plata. 1: extracto de frutos verdes de *C. martiana*; 2: eluidos con actividad hemaglutinante, dializados y liofilizados de extracto de frutos maduros; 3: primera fracción de elución de extracto de frutos verdes, gel filtrada; 4: segunda fracción de elución de extracto de frutos verdes, gel filtrada; 5: tercera fracción de elución de extracto de frutos verdes, gel filtrada; 6: LMW.



Dado los resultados obtenidos, se decidió dializar los eluidos obtenidos de extracto verde, y posteriormente realizar un pool con éstos, con las fracciones purificadas de frutos maduros, trabajando en adelante, con la mezcla de fracciones proteicas enriquecidas en lectinas, provenientes de extractos de ambos frutos.

El volumen total de este pool fue de 37 mL, y el mismo se re-cromatografió en la misma columna de afinidad utilizada anteriormente, para intentar mejorar el grado de purificación de la lectina. Se analizaron mediante SDS-PAGE la segunda, tercera y cuarta fracción eluída y se muestran en la Figura 4.5. Se observa claramente, una única banda en la segunda fracción eluída (carriles 4 y 8), correspondiente a la lectina purificada a partir de frutos maduros y verdes de *C. martiana*.

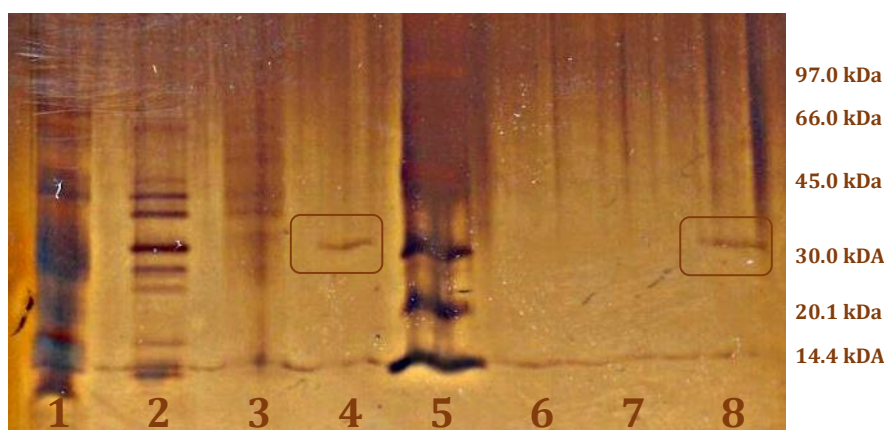


Figura 4.5: SDS-PAGE revelada con método de tinción con plata.

1: extracto de frutos verdes de *C. martiana*; 2: eluidos con actividad hemaglutinante, dializados y liofilizados de extracto de frutos maduros; 3: eluidos de extracto de frutos verdes, gel filtrados; 4 y 8: segunda fracción de elución de pool de eluidos de ambos extractos, gel filtrada; 5: LMW; 6: tercera fracción de elución de pool de eluidos de ambos extractos, gel filtrada; 7: cuarta fracción de elución de pool de eluidos de ambos extractos, gel filtrada.

Se encuentra recuadrada la banda correspondiente a la lectina pura de *C. martiana*.

Esta fracción se gel filtró para eliminar MMan y fue luego liofilizada. Se resuspendió la lectina en 3 mL de agua destilada, obteniéndose una  $A_{280}$  de 0.05 y se usó para los ensayos antimicrobianos. En paralelo, se liofilizó el mismo volumen del buffer PBS pH 7.4 y se lo resuspendió en 3 mL de agua destilada, para ser utilizado luego como control, en los ensayos de CIM.

#### 4.1.1. Determinación de la concentración de lectina de *C. martiana*:

Por método de BCA se determinó que la lectina purificada tiene una concentración de 43  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### 4.1.2. Evaluación del potencial antimicrobiano de la lectina de *C. martiana*:

En el ensayo de determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), este valor proviene de la concentración de proteína presente en el último pocillo en el que no se observa crecimiento. Si se observa crecimiento en todos los pocillos, se

considera que, de existir inhibición, ésta se da a concentraciones proteicas mayores a las usadas para el ensayo.

Se evaluó el potencial antimicrobiano de la lectina por ensayo de determinación de CIM frente a diferentes especies de hongos y bacterias. En todos los ensayos se realizó un control con el buffer utilizado para resuspender la lectina, para descartar la posibilidad que la alta concentración salina presente en la solución en la que se encuentra la lectina estuviera causando inhibición del crecimiento. En la tabla 4.3 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 4.3: CIM de lectina de *C. martiana* frente a distintos microorganismos.**

<b>Microorganismo</b>	<b>CIM (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<i>A. flavus</i>	> 10.8
<i>F. graminearum</i>	10.8
<i>P. expansum</i>	5.4
<i>A. baumannii</i>	> 10.8
<i>E. cloacae</i>	> 10.8
<i>E. faecalis</i>	> 10.8
<i>K. pneumoniae</i>	> 10.8
<i>P. aeruginosa</i>	5.4
<i>S. aureus</i>	> 10.8
<i>X. vesicatoria</i>	> 10.8

La lectina de *C. martiana* inhibió el crecimiento de una bacteria Gram-negativa de importancia clínica: *P. aeruginosa*. Resultados similares fueron obtenidos con la lectina de *Myracrodruon urundeuva* (urunday) que inhibió *P. aeruginosa* con valores de CIM de 4.68  $\mu\text{g/mL}$ , así como otras bacterias Gram-negativas como *K. pneumoniae* (CIM de 9.37  $\mu\text{g/mL}$ ) y *E. coli* (CIM 1.17 de  $\mu\text{g/mL}$ ) (Sá et al. 2009). Además, lectinas aisladas de hojas de *Phthirusa pyrifolia* presentaron actividad contra la bacteria Gram-negativa *K. pneumoniae* pero a concentraciones de lectina muy superiores (CIM de 2 mg/mL) (Costa et al. 2010).

La lectina de *C. martiana* inhibió también el crecimiento de *F. graminearum* y de *P. expansum*, dos hongos fitopatógenos. Se reportan resultados similares para la lectina de *Solanum tuberosum*, que inhibió el crecimiento de hongos de los géneros *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Hasan et al. 2014). *Ophiopogon japonicum*, una lectina también específica para Man, inhibió el crecimiento de *F. graminearum*, pero a una CIM mayor a la presentada por la lectina de *C. martiana* (0.06 mg/mL), mientras que una lectina extraída de *Euphorbia trigona* (cactus catedral) inhibió el crecimiento de *F. graminearum* en concentraciones de 0.1 mg/mL (Tian et al. 2008; van Deenen et al. 2011).

## 4.2. Lectina de *Glycine max*:

### 4.2.1. Deslipidación de harina de porotos de soja:

Se trabajó con dos marcas de harina de soja de origen comercial, que se nombraron A y B. Se partió de 50.0 g de cada una, y luego del proceso de deslipidación con n-hexano se obtuvo 40.94 g de harina A y 36.34 g de harina B. El porcentaje de peso perdido fue 18% y 27% respectivamente.

### 4.2.2. Actividad hemaglutinante de los extractos:

Se realizó la extracción con 170 mL de 0.15 M NaCl y se obtuvo 93.6 mL de extracto de harina A y 95.0 mL de extracto de harina B. Por ensayo de determinación de actividad HAG con glóbulos rojos de rata se determinó un título de 80 UL/mL en los extractos de ambas harinas. Antes de realizar la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, y dados los similares valores de actividad HAG, se mezclaron ambos extractos y se prosiguió trabajando con la mezcla de los dos.

El precipitado se resuspendió en 27 mL de 0.15 M NaCl, y se determinó el título de lectinas del mismo, siendo éste 640 UL/mL.

### 4.2.3. Purificación de lectina de *G. max*:

Como se reporta por Franco Fraguas *et al.* (2003), la lectina de *G. max* presenta afinidad por galactosa, entre otros carbohidratos. Se purificó por lo tanto la lectina por cromatografía de afinidad, aplicando 20 mL del extracto a una columna empaquetada con 4.7 mL de galactosil-Sepharose sintetizado previamente por el grupo. Se eluyó la proteína con 0.1 M galactosa en PBS. En la Figura 4.6 se muestra el perfil de elución y de actividad HAG de las fracciones obtenidas y en la tabla 4.4 se muestra la AHE de estas fracciones.

Tabla 4.4: Purificación de lectina de *G. max* en Galactosil-Sepharose

Fracción	UA <sub>280</sub> /mL	Proteína (mg/mL)	HAG (UL/mL)	AHE (UL/mg prot.)
Extracto aplicado	750	800	640	0.8
Eluído	8.4	9.0	160	18

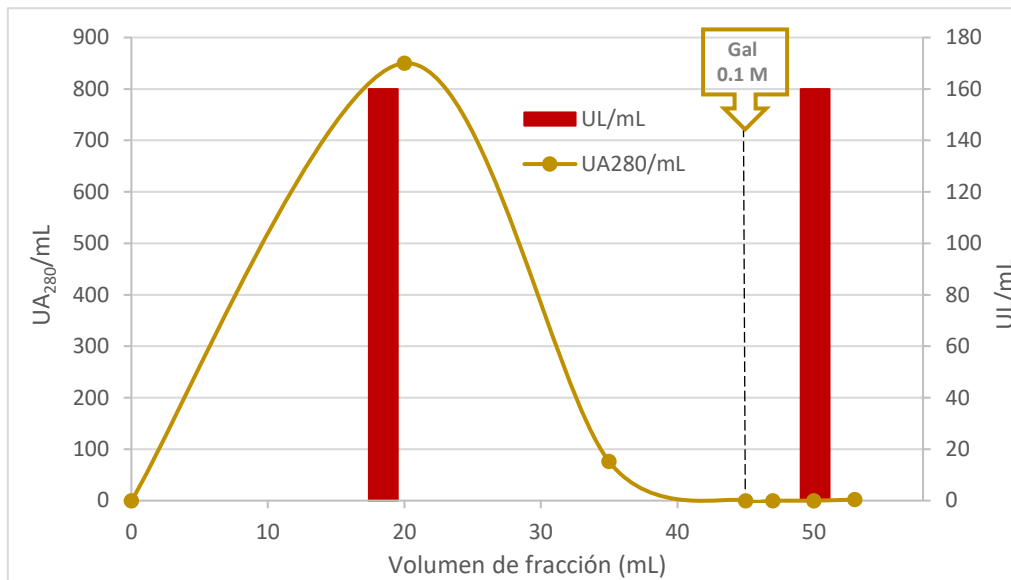


Figura 4.6: Perfil de elución de lectina de *G. max* y actividad de lectina de las distintas fracciones.

#### 4.2.4. Evaluación de la pureza de lectina de *G. max*:

Se realizó una SDS-PAGE con la segunda fracción de elución y con SBA de origen comercial. En la Figura 4.7 se muestra el resultado de la corrida.

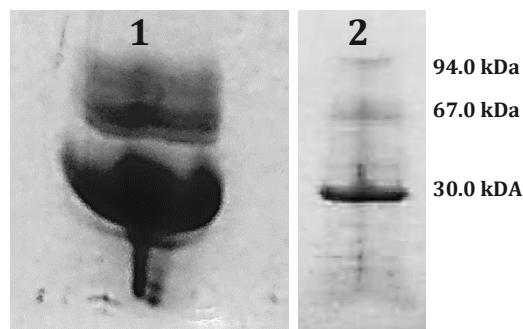


Figura 4.7: SDS-PAGE revelada con método de tinción con azul de Coomassie. 1: segunda fracción de elución; 2: SBA de origen comercial

Se observa fuertemente marcada la banda de 30 kDa correspondiente al monómero de SBA y dos bandas más tenues de mayor peso molecular, que también se encuentran presentes en SBA de origen comercial. Esta fracción purificada se utilizó en los ensayos antimicrobianos.

#### 4.2.5. Determinación de la concentración de lectina de *G. max*:

La concentración de proteína en la segunda fracción de lectina eluída fue de 9.0 mg/mL. El volumen de la fracción fue de 3 mL, por lo que la cantidad total de proteína purificada a partir de los 20 mL de extracto aplicados a la columna fue de 27 mg. El volumen total de extracto fue 27 mL, por lo que la cantidad total de lectina

obtenida a partir de 77.28 g de harina (40.94 g de harina A y 36.34 de harina B) es de 36.3 mg, dando un rendimiento de 25 mg de lectina/50 g de harina, que se encuentra en el orden de los valores reportados por el grupo.

#### **4.2.6. Evaluación del potencial antimicrobiano de la lectina de *G. max*:**

Se evaluó la potencial actividad antimicrobiana de la lectina de *G. max*, frente a especies de hongos (*Penicillium expansum*, *Fusarium graminearum*, y *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*) y bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas vesicatoria*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, y *Enterococcus faecalis*). No se observó inhibición del crecimiento de ninguno de los microorganismos a las concentraciones evaluadas ( $\leq 2.3$  mg/ml).

### **4.3. Lectinas fúngicas:**

#### **4.3.1. Actividad hemaglutinante de los extractos:**

Se prepararon extractos acuosos a partir de 3 aislamientos de hongos filamentosos a las que se nombró F121, F141 y F192. Se partió de 0.75 g de micelio seco de F121, 3.57 g de F141 y 2.31 g de F192, obteniéndose 5.0 mL, 7.0 mL y 2.0 mL de extracto, respectivamente. Se evaluó la actividad HAG de cada uno frente a glóbulos rojos de rata. Los 3 aislamientos presentaron actividad de lectina y los títulos respectivos se muestran en la tabla 4.5.

**Tabla 4.5: Título de lectina de los extractos fúngicos.**

<b>Cepa</b>	<b>UA<sub>280</sub>/mL</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>HAG (UL/mL)</b>	<b>AHE (UL/mg prot.)</b>
<b>F121</b>	2.26	0.2	160	1012
<b>F141</b>	15.6	1.1	1280	1176
<b>F192</b>	4.83	0.3	320	947

Si bien existen estudios sobre lectinas de la familia LecRLK provenientes de musgos antárticos (S. Liu et al. 2017), y de lectinas provenientes de varias especies de algas de origen antártico (Souza y Teixeira 2009), hasta la fecha no se han encontrado reportes de caracterización de lectinas provenientes de ninguna especie de hongo antártico, por lo que este fue un resultado novedoso que llevó a continuar con la caracterización de las lectinas.

#### **4.3.2. Identificación molecular de las cepas:**

Se prosiguió a identificar molecularmente las 3 cepas mediante la amplificación y secuenciación de las regiones ITS1/ITS2. Dichas secuencias genómicas son

altamente variables y se encuentran próximas a la región codificante del 5.8S, entre las secuencias codificantes de la subunidad menor (SSU) y la subunidad mayor (LSU) del operón ribosomal. Los primers ITS1 e ITS4 son ampliamente utilizados para la identificación de hongos porque permiten amplificar las regiones ITS1/ITS2 de un gran rango de especies fúngicas (Martin y Rygiewicz 2005). Se compararon las secuencias obtenidas con las disponibles en la base de datos del GeneBank y se obtuvo en los 3 casos un porcentaje de identidad del 99% con cepas tipo. En la tabla 4.6 se resumen los resultados obtenidos.

Se identificó a F121 como *Antarctomyces pellizariae* y a F192 como *Thelebolus globosus*. Se ha purificado y estudiado las propiedades de una proteína antifreeze a partir de *Antarctomyces psychrotrophicus*, la única otra especie perteneciente al género *Antarctomyces* hasta ahora (Xiao et al. 2010). Se ha reportado también que la actividad citotóxica del exopolisacárido *Thelebolan* purificado a partir de especies del género *Thelebolus* media la apoptosis en células (Mukhopadhyay et al. 2014). En cambio, no se encuentran reportes sobre lectinas de ninguna especie perteneciente a estos géneros.

En el caso de F141 se observó que la cepa tiene 99% de similitud con seis cepas tipo, todas pertenecientes al género *Penicillium*, pero diferentes especies. Estudios futuros deberán realizarse para la identificación a nivel de especie, utilizando otras estrategias tal como la identificación molecular utilizando otras regiones génicas. Una sección del gen de la  $\beta$ -tubulina (TUB2) es también ampliamente conocida y utilizada en filogenética fúngica y se recomienda su uso como marcador secundario para la identificación de especies del género *Penicillium* (Stielow et al. 2015; Raja et al. 2017).

Tabla 4.6: Identificación molecular de cepas a partir de BLAST con región ITS.

Aisl.	Cepa	Ident. (%)	Query cover	Código de acceso
<b>F121</b>	<i>Antarctomyces pellizariae</i> <sup>T</sup>	99	50	<a href="#">KX576510.1</a>
	<i>Penicillium polonicum</i> <sup>T</sup>	99	65	<a href="#">AF033475.1</a>
	<i>Penicillium viridicatum</i> <sup>T</sup>	99	65	<a href="#">NR 119496.1</a>
<b>F141</b>	<i>Penicillium tricolor</i> <sup>T</sup>	99	65	<a href="#">NR 077206.1</a>
	<i>Penicillium thymicola</i> <sup>T</sup>	99	49	<a href="#">NR 137883.1</a>
	<i>Penicillium verrucosum</i> <sup>T</sup>	99	49	<a href="#">NR 119495.1</a>
	<i>Penicillium albocoremium</i> <sup>T</sup>	99	48	<a href="#">NR 138271.1</a>
<b>F192</b>	<i>Thelebolus globosus</i> <sup>T</sup>	99	61	<a href="#">NR 138367.1</a>

#### 4.3.3. Especificidad de unión a carbohidratos de lectinas de *Penicillium* sp.:

En el marco de esta tesina de grado, que tiene como principal objetivo la producción de lectinas y la evaluación de su actividad antimicrobiana, se continuó trabajando únicamente con la cepa F141, que presentó mayor actividad de lectina (*Penicillium* sp.). Asimismo, por el hecho de que el resto de las cepas también

presentaron actividad lectina y porque no se encuentran reportes sobre éstas, sería interesante continuar con su caracterización en posteriores estudios.

Para estudiar la especificidad de unión de la(s) lectina(s) de *Penicillium* sp., que a diferencia de las lectinas vegetales con las que se trabajó, no se tenía información bibliográfica previa, se realizaron ensayos de inhibición de la HAG. En estos, se agrega la lectina a evaluar con un panel de distintos carbohidratos, y una solución estandarizada de glóbulos rojos. Aquellos carbohidratos que son reconocidos por la lectina se unen a ésta en su CRD e impiden que las lectinas se adhieran a la superficie celular por lo que no se forma el entramado de células y se observa precipitación de glóbulos rojos. Las lectinas que no reconocen el carbohidrato en solución se adhieren normalmente a la superficie celular y se observa hemaglutinación.

Se caracterizó por lo tanto la especificidad de unión a carbohidratos de la lectina de *Penicillium* sp., y se obtuvo que presenta afinidad por ácido galacturónico, ácido glucurónico, fructosa, metil-manósido y sacarosa, un espectro relativamente amplio de carbohidratos, como se observa en la tabla 4.7.

Resultados similares se reportaron para la lectina del hongo *Gymnopilus spectabilis*, que también presenta una amplia especificidad hacia distintos carbohidratos, incluyendo los monosacáridos ácidos, ácido galacturónico y ácido glucurónico (Alborés et al. 2013).

**Tabla 4.7: Efecto de carbohidratos sobre actividad hemaglutinante de *Penicillium* sp.**

<b>Carbohidrato</b>	<b>HAG</b>
Acetil-galactosamina	+
Acetil-glucosamina	+
Acetil-lactosamina	+
Ácido galacturónico	-
Ácido glucurónico	-
Arabinosa	+
Fructosa	-
Fucosa	+
Galactosa	+
Galactosamina	+
Glucosa	+
Glucosamina	+
Lactosa	+
Manosa	+
Melibiosa	+
Metil-manósido	-
Rafinosa	+
Sacarosa	-
Sorbitol	+

HAG (+): Carbohidrato no inhibe HAG; HAG (-): inhibe HAG

#### 4.3.4. Purificación de lectina de *Penicillium sp.*:

Se optó por purificar la lectina mediante cromatografía de intercambio iónico, siguiendo la estrategia utilizada previamente por el grupo, para el aislamiento de la lectina de *G. spectabilis*. En primera instancia se aplicó el extracto fúngico a una columna empaquetada con DEAE-Sepharose, equilibrada con buffer PBS pH 7.4. Se eluyó con buffer suplementado con 0.5 M NaCl. Se siguió el perfil de elución por Abs<sub>280</sub> y se evaluó la actividad de lectina en cada fracción por HAG, como se muestra en la Figura 4.8. En la tabla 4.8 se muestra la AHE de las fracciones.

Tabla 4.8: Purificación de lectina de *Penicillium sp.* en DEAE-Sepharose.

Fracción	UA <sub>280</sub> /mL	Proteína (mg/mL)	HAG (UL/mL)	AHE (UL/mg prot.)
Extracto aplicado	15.6	1.1	1280	1176
Percolado	3.91	0.27	1280	4681
Lavado	7.65	0.53	1280	2393
Eluído 1	1.23	0.09	2560	29860

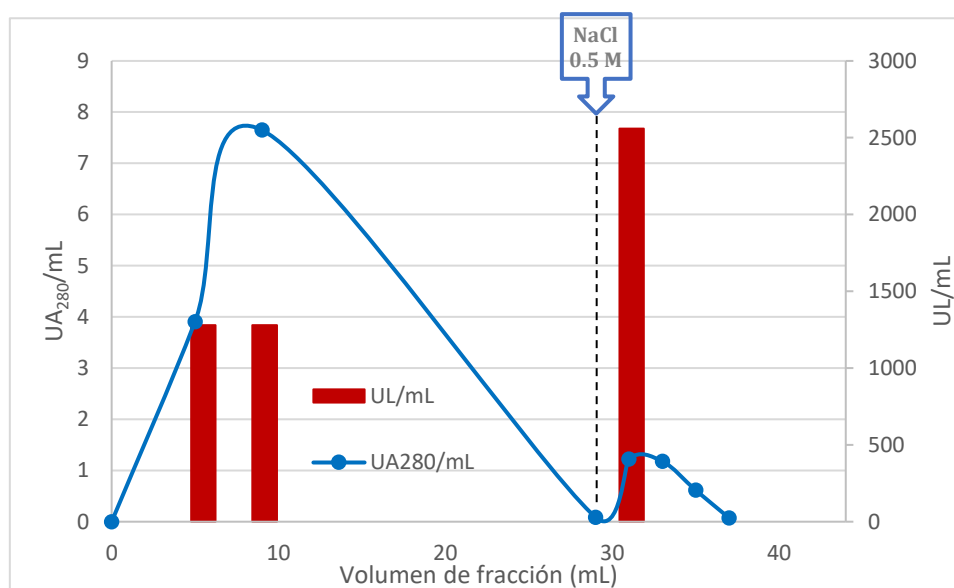


Figura 4.8: Perfil de elución de lectina de *Penicillium sp.* (pH 7.4, elución: 0.5 M NaCl) y actividad de lectina de las distintas fracciones.

Se observó que eluye lectina sólo en los primeros 2 mL luego de la adición de NaCl, pero que en el percolado y lavado aún se detecta un alto título de lectina, que no se unió al intercambiador al pH de trabajo. Se utilizó la fracción del lavado anterior y se aplicó a la misma columna, equilibrada ahora con buffer 50 mM acetato pH 5.6. Se eluyó con el mismo buffer suplementado con 0.5 M NaCl. El perfil de elución y actividad de las fracciones se muestran en la Figura 4.9 y la AHE de las fracciones en la tabla 4.9.



Tabla 4.9: Purificación de lectina de *Penicillium* sp. en DEAE-Sepharose

Fracción	UA <sub>280</sub> /mL	Proteína (mg/mL)	HAG (UL/mL)	AHE (UL/mg prot.)
Extracto aplicado	7.65	0.53	1280	2393
Percolado	2.24	0.16	1280	8171
Lavado	6.72	0.47	5120	10903
Eluído 1	0.346	0.02	10240	423214
Eluído 2	0.934	0.07	5120	78390

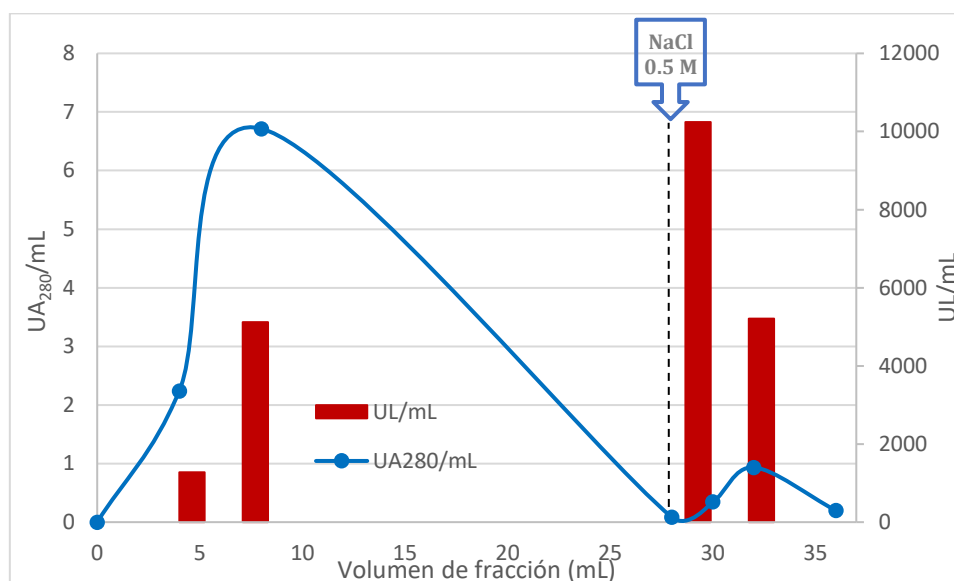


Figura 4.9: Perfil de elución de lectina de *Penicillium* sp. (pH 5.6, elución: 0.5 M NaCl) y actividad de lectina de las distintas fracciones a pH 5.6

En este caso se observó que las 2 primeras fracciones luego del agregado de NaCl tienen alta actividad de HAG, pero se continúa observando actividad HAG en percolado y especialmente en el lavado. Estos resultados parecen indicar que en el extracto hay proteínas con actividad hemaglutinante que tienen puntos isoeléctricos distintos entre sí, o sea, que el extracto contiene más de una lectina, que podría explicar la diversidad de carbohidratos que inhibieron la HAG del extracto fúngico.

#### 4.3.5. Evaluación de la pureza de lectinas de *Penicillium* sp.:

Se realizaron SDS-PAGE con fracciones que presentaron HAG positiva con glóbulos rojos de rata. Éstas fueron, como se muestra en la Figura 4.8, el extracto, el percolado, el lavado y el primer eluído (Eluído 1) obtenidos al trabajar a pH 7.4, así como el lavado, la primera (Eluído 1') y la segunda (Eluído 2') fracción de elución obtenidas al trabajar a pH 5.6.

En las Figuras 4.10 y 4.11 se ve el resultado de estas electroforesis.

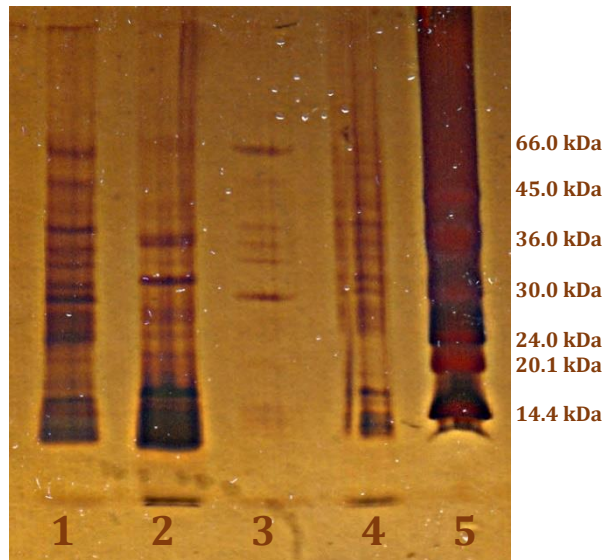


Figura 4.10: SDS-PAGE revelada con método de tinción con plata.  
1: extracto de *Penicillium* sp.; 2: percolado a pH 7.4; 3: primera fracción de elución a pH 7.4; 4: lavado a pH 7.4; 5: LMW.

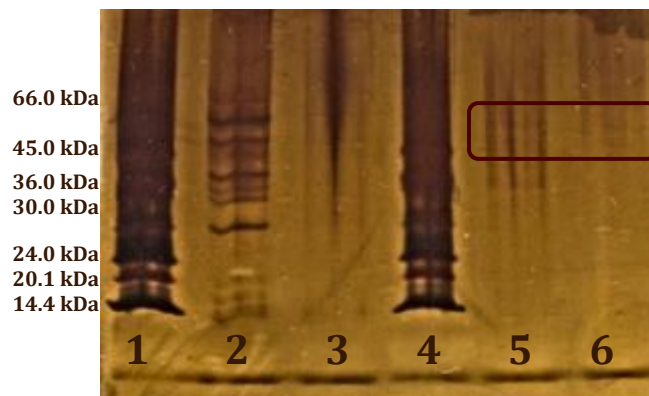


Figura 4.11: SDS-PAGE revelada con método de tinción con plata.  
1; 4: LMW; 2: primera fracción de elución a pH 7.4; 3: lavado a pH 5.6; 5: primera fracción de elución a pH 5.6; 6: segunda fracción de elución a pH 5.6

En el Eluído 1 se distinguen unas 6 bandas intensas que van desde 28 kDa hasta 60 kDa, mientras que en el Eluído 1' y Eluído 2' se distinguen muy tenuemente únicamente las dos bandas de mayor peso molecular.

#### 4.3.6. Evaluación del potencial antimicrobiano de las lectinas de *Penicillium* sp.:

Se evaluó el potencial antimicrobiano de las fracciones que presentaron HAG positiva frente a diferentes microorganismos mediante ensayo de determinación de la CIM en placas de microtitulación. Con los microorganismos evaluados se observó inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger* (un hongo de importancia clínica) solamente en los ensayos con la primera fracción de eluído a pH 7.4 y con las 2 primeras fracciones de eluído a pH 5.6 (Tabla 4.10). Estas fracciones con actividad antifúngica (CIM entre 0.1 y 0.3 mg/mL) son las que presentaron mayor actividad

específica de lectina (Tablas 4.8 y 4.9). Resultados similares se reportan para la lectina de *Euphorbia trigona* que inhibe el crecimiento de *A. niger* en concentraciones superiores a 50 µg/mL (van Deenen et al. 2011). Otras lectinas también han presentado actividad antifúngica frente a *A. niger*, como la lectina de *Solanum tuberosum* (Hasan et al. 2014), de *G. spectabilis* (Alborés et al. 2013) y de *P. atropurpurascens* (PAL). PAL presentó una CIM de 80 µg/mL (Alborés et al. 2014).

**Tabla 4.10: Concentraciones inhibitorias mínimas de fracciones con actividad lectina de *Penicillium* sp. frente a distintos microorganismos.**

Microorganismo	CIM (mg/mL)					
	Percolado 7.4	Eluído 1	Percolado 5.6	Lavado 5.6	Eluído 1'	Eluído 2'
<i>A. flavus</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>A. niger</i>	>1.1	<b>0.3</b>	>0.6	>1.9	<b>0.1</b>	<b>0.3</b>
<i>F. graminearum</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>P. expansum</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>C. albicans</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>B. cereus</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>B. subtilis</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>E. coli</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>K. pneumoniae</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>P. aeruginosa</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>S. typhimurium</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>S. aureus</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3
<i>X. vesicatoria</i>	>1.1	>0.3	>0.6	>1.9	>0.1	>0.3

## 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se purificó la lectina de extracto de harina de *G. max* y de frutos de *C. martiana* por cromatografía de afinidad en columnas empaquetadas con galactosil-Sepharose y manosil-Sepharose, respectivamente.

Además, se detectó presencia de lectina en extractos de tres cepas de hongos aislados de maderas recolectadas en la Antártida. La identificación molecular permitió la identificación a nivel de especie de dos de ellas, *Antarctomyces pellizariae* y *Thelebolus globosus*. Sin embargo, la tercera presentó 99% de identidad con seis especies pertenecientes al género *Penicillium*, por lo que sería de interés futuro continuar con la identificación hasta llegar a nivel de especie.

Se purificó por cromatografía de intercambio iónico la lectina a partir del extracto de la cepa con mayor AHE de las tres evaluadas: *Penicillium* sp. Dicha lectina mostró reconocimiento específico por distintos carbohidratos, como ácido glucurónico, ácido galacturónico, metil-manósido, fructosa y sacarosa. Resultaría interesante continuar con la caracterización bioquímica de la lectina de esta cepa, determinando por ejemplo su punto isoeléctrico, peso molecular, estabilidad, etc.

Evalutando el potencial antimicrobiano de las tres lectinas purificadas, se observó que la lectina de *C. martiana* inhibe el crecimiento de *F. graminearum* (CIM 10.8 µg/mL), de *P. expansum* (CIM 5.4 µg/mL) y de *P. aeruginosa* (CIM 5.4 µg/mL). También se observó que la lectina de *Penicillium* sp. inhibe el crecimiento de *A. niger* (CIM 100 µg/mL). En cambio, no se detectó inhibición del crecimiento de ninguno de los microorganismos tratados con lectina de *G. max* en las concentraciones evaluadas.

Trabajos futuros podrían incluir la purificación de las lectinas detectadas en los extractos de *Antarctomyces pellizariae* y *Thelebolus globosus*, determinando su especificidad de unión a carbohidratos y evaluando su potencial antimicrobiano.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alborés, Silvana, Maria José Bustamante, Laura Franco Fraguas, y Maria Pía Cerdeiras. 2014. «Proteins from *Punctularia atropurpurascens* with Biotechnological Applications». *Natural Resources* 05 (15): 915-25. <https://doi.org/10.4236/nr.2014.515078>.
- Alborés, Silvana, Paola Mora, María José Bustamante, María Pía Cerdeiras, y Laura Franco Fraguas. 2013. «Purification and applications of a lectin from the mushroom *Gymnopilus spectabilis*». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172 (4): 2081-90. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0665-5>.
- Alborés, Silvana, Paola Mora, María Pía Cerdeiras, y Laura Franco Fraguas. 2012. «Screening for lectins from basidiomycetes and isolation of *Punctularia atropurpurascens* lectin». *Journal of Basic Microbiology* 54 (2): 89-96. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200229>.
- Bellande, Kevin, Jean Jacques Bono, Bruno Savelli, Elisabeth Jamet, y Hervé Canut. 2017. «Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside?» *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061164>.
- Butschi, Alex, Alexander Titz, Martin A. Wälti, Vincent Olieric, Katharina Paschinger, Katharina Nöbauer, Xiaoqiang Guo, et al. 2010. «*Caenorhabditis elegans* N-glycan Core  $\beta$ -galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2». *PLoS Pathogens* 6 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000717>.
- Chen, Chang-Shan, Chun-Yi Chen, Divya Malathy Ravinath, Agustina Bungahot, Chi-Ping Cheng, y Ren-In You. 2018. «Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities». *BMC Plant Biology* 18 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1222-0>.
- Chen, Xuwei, Junjun Shang, Dexi Chen, Cailin Lei, Yan Zou, Wenxue Zhai, Guozhen Liu, et al. 2006. «A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance». *Plant Journal* 46 (5): 794-804. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02739.x>.
- Cherry, Sara. 2012. «Innate and Intrinsic Antiviral Immunity Antiviral Immunity What is immunity?» *Journal of Dermatological Science* 75 (3): 159-66. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2014.05.004>.
- Costa, Romero M.P.B., Antônio F.M. Vaz, Maria L.V. Oliva, Luana C.B.B. Coelho, Maria T.S. Correia, y Maria G. Carneiro-da-Cunha. 2010. «A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties». *Process Biochemistry* 45 (4): 526-33. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.11.013>.
- Deenen, N. van, D. Prüfer, y C. Schulze Gronover. 2011. «A latex lectin from *Euphorbia trigona* is a potent inhibitor of fungal growth». *Biologia Plantarum* 55 (2): 335-39. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0049-z>.
- Douglas, Michele W., Carl M. Parsons, y Theodore Hymowitz. 1999. «Nutritional

- evaluation of lectin-free soybeans for poultry». *Poultry Science* 78 (1): 91-95. <https://doi.org/10.1093/ps/78.1.91>.
- Ferreira, A. G., y S. G.T. Rosa. 2009. «Germinação de sementes de sete espécies medicinais nativas do sul do Brasil». *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 11 (3): 230-35. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722009000300002>.
- Franco Fraguas, Laura, Alicia Plá, Fernando Ferreira, Hugo Massaldi, Norma Suárez, y Francisco Batista-Viera. 2003. «Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation». *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 790 (1-2): 365-72. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00086-2).
- Gupta, G. S. 2012. *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. Vienna: Springer Vienna. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1065-2>.
- Hasan, Imtiaj, Yasuhiro Ozeki, y Syed Rashel Kabir. 2014. «Purification of a novel chitin-binding lectin with antimicrobial and antibiofilm activities from a Bangladeshi cultivar of potato (*Solanum tuberosum*)». *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 51 (2): 142-48.
- Holle, Sofie Van, Kristof De Schutter, Lore Eggermont, Mariya Tsaneva, Liuyi Dang, y Els J.M. Van Damme. 2017. «Comparative study of lectin domains in model species: New insights into evolutionary dynamics». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061136>.
- Huang, Ying, Jing-Min Tan, Zheng Wang, Shao-Wu Yin, Xin Huang, Wen Wang, y Qian Ren. 2014. «Cloning and characterization of two different L-type lectin genes from the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*». *Developmental and Comparative Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.015>.
- Iordache, Florin, Mariana Ionita, Liviu Ioan Mitrea, Cornelia Fafaneata, y Aneta Pop. 2015. «Antimicrobial and Antiparasitic Activity of Lectins». *Current Pharmaceutical Biotechnology* 16 (2): 1-10. <https://doi.org/10.2174/138920101602150112151907>.
- Jandú, Jannyson J.B., Roberval N. Moraes Neto, Adrielle Zigmignan, Eduardo M. de Sousa, Maria C.A. Brelaz-de-Castro, Maria T. dos Santos Correia, y Luís C.N. da Silva. 2017. «Targeting the immune system with plant lectins to combat microbial infections». *Frontiers in Pharmacology* 8 (OCT): 1-11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00671>.
- Jawhara, Samir, Xavier Thuru, Annie Standaert-Vitse, Thierry Jouault, Serge Mordon, Boualem Sendid, Pierre Desreumaux, y Daniel Poulain. 2008. «Colonization of Mice by *Candida albicans* Is Promoted by Chemically Induced Colitis and Augments Inflammatory Responses through Galectin-3». *The Journal of Infectious Diseases* 197 (7): 972-80. <https://doi.org/10.1086/528990>.
- John, Constance M., Gary A. Jarvis, Karen V. Swanson, Hakon Leffler, Morris D. Cooper, Margaret E. Huflejt, y J. McLeod Griffiss. 2002. «Galectin-3 binds lactosaminylated lipooligosaccharides from *Neisseria gonorrhoeae* and is selectively expressed by mucosal epithelial cells that are infected». *Cellular Microbiology* 4 (10): 649-61. <https://doi.org/10.1046/j.1462->

5822.2002.00219.x.

- Khan, Feroz, y M. Islam Khan. 2011. «Fungal Lectins: Current Molecular and Biochemical Perspectives». *International Journal of Biological Chemistry* 5 (1): 1-20. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2011.1.20>.
- Koyama, Shin, Shinya Terashima, Yoshinao Takano, Takeo Ohori, Tomoyuki Kanno, Yutaka Hoshino, y Hitoshi Inoue. 1999. «Wheat germ agglutinin binding is a useful prognostic indicator in stomach cancer». *International Journal of Clinical Oncology* 4 (2): 96-100. <https://doi.org/10.1007/s101470050034>.
- Lagarda-Diaz, Irlanda, Ana Maria Guzman-Partida, y Luz Vazquez-Moreno. 2017. «Legume lectins: Proteins with diverse applications». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (6): 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms18061242>.
- Liu, Shenghao, Jing Wang, Kaoshan Chen, Zhaohui Zhang, y Pengying Zhang. 2017. «The L-type lectin receptor-like kinase (PnLecRLK1) from the Antarctic moss *Pohlia nutans* enhances chilling-stress tolerance and abscisic acid sensitivity in *Arabidopsis*». *Plant Growth Regulation* 81 (3): 409-18. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0217-4>.
- Liu, Xuemei, Na Xu, y Shicui Zhang. 2013. «Calreticulin is a microbial-binding molecule with phagocytosis-enhancing capacity». *Fish and Shellfish Immunology* 35 (3): 776-84. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.013>.
- Ma, Qing Hu, Bing Tian, y Yun Liang Li. 2010. «Overexpression of a wheat jasmonate-regulated lectin increases pathogen resistance». *Biochimie* 92 (2): 187-93. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.11.008>.
- Martin, Kendall J., y Paul T. Rygielwicz. 2005. «Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts». *BMC Microbiology* 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>.
- Mukhopadhyay, Sourav K., Soumya Chatterjee, Samiran S. Gauri, Shibendu S. Das, Abheepsa Mishra, Moumita Patra, Ananta K. Ghosh, Amit K. Das, Shiv M. Singh, y Satyahari Dey. 2014. «Isolation and characterization of extracellular polysaccharide Thelebolan produced by a newly isolated psychrophilic Antarctic fungus *Thelebolus*». *Carbohydrate Polymers* 104 (1): 204-12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.034>.
- Nakata, Hajime, Ching Yu Lin, Maryam Abolhassani, Tomohisa Ogawa, Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi, y Koji Muramoto. 2017. «Isolation of rice bran lectins and characterization of their unique behavior in caco-2 cells». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (5). <https://doi.org/10.3390/ijms18051052>.
- Nascimento, Kelany S., Ana I. Cunha, Kyria S. Nascimento, Benildo S. Cavada, Ana M. Azevedo, y Maria Raquel Aires-Barros. 2012. «An overview of lectins purification strategies». *Journal of Molecular Recognition* 25 (11): 527-41. <https://doi.org/10.1002/jmr.2200>.
- Nikitina, Valentina E., Ekaterina A. Loshchinina, y Elena P. Vetchinkina. 2017. «Lectins from mycelia of basidiomycetes». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7). <https://doi.org/10.3390/ijms18071334>.

- O'Neill, Luke A.J., Elizabeth J. Hennessy, y Andrew E. Parker. 2010. «Targeting Toll-like receptors: Emerging therapeutics?» *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (4): 293-307. <https://doi.org/10.1038/nrd3203>.
- Oliveira Dias, Renata De, Leandro Dos Santos Machado, Ludovico Migliolo, y Octavio Luiz Franco. 2015. «Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities». *Molecules* 20 (1): 519-41. <https://doi.org/10.3390/molecules20010519>.
- Olsen, Laurence R., Andréa Dessen, Dipti Gupta, Subramaniam Sabesan, James C. Sacchettini, y C. Fred Brewer. 1997. «X-ray crystallographic studies of unique cross-linked lattices between four isomeric biantennary oligosaccharides and soybean agglutinin». *Biochemistry* 36 (49): 15073-80. <https://doi.org/10.1021/bi971828+>.
- Peumans, Willy J., y Els J.M. Van Damme. 1998. *Plant Lectins: Versatile Proteins with Important Perspectives in Biotechnology. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. Vol. 15. <https://doi.org/10.1080/02648725.1998.10647956>.
- Peumans, Willy J, y EJM. Van Damme. 1995. «Lectins as Plant Defense Proteins». *Plant Physiology* 109 (2): 347-52. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>.
- Plá, Alicia, E. Alonso, Francisco Batista-Viera, y Laura Franco Fraguas. 2003. «Screening for carbohydrate-binding proteins in extracts of Uruguayan plants». *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36 (7): 851-60. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000700005>.
- Procópio, Thamara Figueiredo, Leydianne Leite de Siqueira Patriota, Maiara Celine de Moura, Pollyanna Michelle da Silva, Ana Patrícia Silva de Oliveira, Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho, Thâmarah de Albuquerque Lima, et al. 2017. «CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect». *International Journal of Biological Macromolecules* 98: 419-29. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.019>.
- Raja, Huzefa A., Andrew N. Miller, Cedric J. Pearce, y Nicholas H. Oberlies. 2017. «Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community». *Journal of Natural Products* 80 (3): 756-70. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>.
- Reisner, Y, y J Gan. 1985. «Differential binding of soybean agglutinin to human neuroblastoma cell lines: potential application to autologous bone marrow transplantation.» *Cancer research* 45 (9): 4026-31. <http://www.jstor.org.proxy.timbo.org.uy:443/stable/22930>.
- Sá, Roberto A., Francis S. Gomes, Thiago H. Napoleão, Nataly D.L. Santos, Carla M.L. Melo, Norma B. Gusmão, Luana C.B.B. Coelho, Patrícia M.G. Paiva, y Lothar W. Bieber. 2009. «Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood». *Wood Science and Technology* 43 (1-2): 85-95. <https://doi.org/10.1007/s00226-008-0220-7>.
- Sano, Kotone, y Haruko Ogawa. 2014. «Lectins» 1200: 47-52. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1292-6>.



- Sharon, Nathan. 2008. «Lectins: past, present and future <sup>1</sup>». *Biochemical Society Transactions* 36 (6): 1457-60. <https://doi.org/10.1042/BST0361457>.
- Sharon, Nathan, y Halina Lis. 2007. *Lectins*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6953-6>.
- Souza, BWS de, y DIA Teixeira. 2009. «A survey of antarctic algae for agglutinins». *Oecologia Brasiliensis* 11 (1): 122-30. <http://www.oecologiaaustralis.org/ojs/index.php/oa/article/viewArticle/172>.
- Stielow, J.B., C.A. Lévesque, K.A. Seifert, W. Meyer, L. Irinyi, D. Smits, R. Renfurm, et al. 2015. «One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes». *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 35 (1): 242-63. <https://doi.org/10.3767/003158515X689135>.
- Tian, Qin, Wei Wang, Chen Miao, Hao Peng, Bo Liu, Fangwei Leng, Lei Dai, Fang Chen, y Jinku Bao. 2008. «Purification, characterization and molecular cloning of a novel mannose-binding lectin from rhizomes of *Ophiopogon japonicus* with antiviral and antifungal activities». *Plant Science* 175 (6): 877-84. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.008>.
- Varrot, Annabelle, Soorej M. Basheer, y Anne Imberty. 2013. «Fungal lectins: Structure, function and potential applications». *Current Opinion in Structural Biology* 23 (5): 678-85. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.07.007>.
- Xiao, Nan, Keita Suzuki, Yoshiyuki Nishimiya, Hidemasa Kondo, Ai Miura, Sakae Tsuda, y Tamotsu Hoshino. 2010. «Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*». *FEBS Journal* 277 (2): 394-403. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07490.x>.
- Xu, Yi Hui, Wen Jie Bi, Xian Wei Wang, Yan Ran Zhao, Xiao Fan Zhao, y Jin Xing Wang. 2014. «Two novel C-type lectins with a low-density lipoprotein receptor class A domain have antiviral function in the shrimp *Marsupenaeus japonicus*». *Developmental and Comparative Immunology* 42 (2): 323-32. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.10.003>.
- Zhang, Hao, Eric Peatman, Hong Liu, Tingting Feng, Liqiao Chen, y Zhanjiang Liu. 2012. «Molecular characterization of three L-type lectin genes from channel catfish, *Ictalurus punctatus* and their responses to *Edwardsiella ictaluri* challenge». *Fish and Shellfish Immunology* 32 (4): 598-608. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.12.009>.
- Zhang, Qing, Xiu Qing Wang, Hai Shan Jiang, Wen Ming Jia, Xiao Fan Zhao, y Jin Xing Wang. 2014. «Calnexin functions in antibacterial immunity of *Marsupenaeus japonicus*». *Developmental and Comparative Immunology* 46 (2): 356-63. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.05.009>.