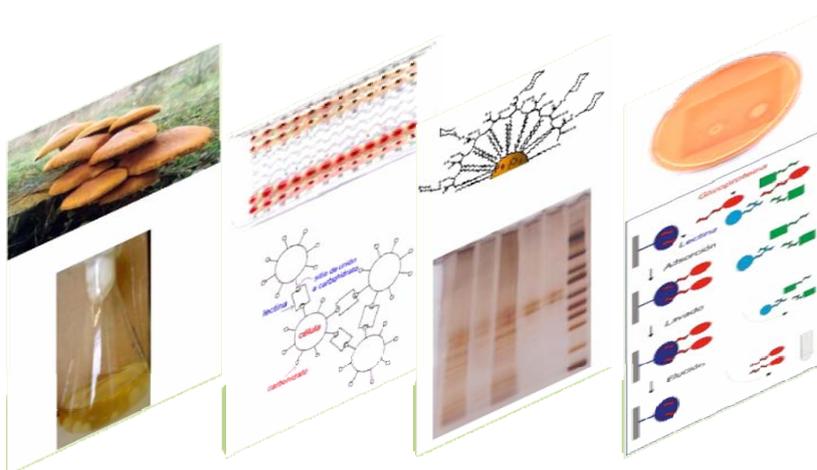


# *Producción de lectinas de hongos basidiomicetes y estudio de sus interacciones frente a glicocompuestos*



por

**Silvana Alborés Malán**

TESIS PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

**DOCTOR EN QUÍMICA**

DIRECTORES: Dra. Laura Franco Fraguas (Cátedra de Bioquímica, DepBio)

María Pía Cerdeiras, MSc DIC (Cátedra de Microbiología, DepBio)

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**2011**

## AGRADECIMIENTOS

*Agradezco ...*

*A mis directoras: a Laura, por todo lo que he aprendido en estos años y siempre estar; a Pía, por apoyarme y siempre confiar en mí.*

*A los miembros del Tribunal: Prof. Matilde Soubes, Prof. Francisco Batista y Dra. Valeria Grazú, por el tiempo dedicado.*

*A UdelaR, a PEDECIBA Química y a la ANII por la beca de Doctorado otorgada.*

*A los Proyectos CSIC- SP 325, PDT-74/12 y a PEDECIBA Química por la financiación del trabajo.*

*A CSIC y PEDECIBA Química por la financiación de la Pasantía en España.*

*Al Dr. Jesús Martínez de la Fuente y a todo el grupo de investigación del INA por hacer que mi estancia en España fuera fructífera y que la distancia y el tiempo no parecieran tan largos. A Vale, María y Mariana por todos los aportes a esta tesis y la hospitalidad.*

*A mis compañeros de Bioquímica por todos los lindos momentos y por haberme acompañado en los difíciles.*

*A Pao, Majo, Nathalie y Micaela por haber compartido algún tramo de este camino y haber comprendido que no sólo los vampiros necesitan sangre y que no da lo mismo el origen.*

*A mis compañeros de Microbiología por tantos años compartidos, en especial a los del laboratorio de Biotecnología ¡gracias por escucharme!*

*A mis amigos por acompañarme en tiempos difíciles.*

*A mi querida familia por toda la invaluable ayuda que me brindaron, en especial a mi hermana Patricia, a papá, y a mamá, que siempre está en mi corazón.*

*A mi amor Gabriel y a mis princesas Lucía y Victoria por todo el amor que me brindan cada día.*

# Tabla de contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1.1. Generalidades de las lectinas	10
1.2. Evaluación de la interacción entre lectinas y carbohidratos	14
1.2.1. Estudio de la interacción lectina-nanopartícula glicosilada	15
1.3. Roles biológicos de las lectinas	16
1.4. Aplicaciones de lectinas	18
1.4.1. Aplicación en el estudio de isoformas de glicoproteínas	20
1.4.2. Aplicaciones de lectinas como agentes antimicrobianos	24
1.4.3. Aplicaciones de las lectinas inmovilizadas	26
1.5. Lectinas fúngicas: propiedades y aplicaciones	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1. Objetivo general	31
2.2. Objetivos específicos	31
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1. Hongos basidiomicetes	32
3.2. Preparación de extractos acuosos	32
3.3. Análisis de los extractos fúngicos	34
3.3.1. Ensayo de actividad hemaglutinante (HAG)	34
3.3.2. Ensayos de inhibición de HAG	36
3.3.3. Determinación de la concentración de proteínas	37
3.3.4. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	38
3.3.5. Determinación de pI	38
3.4. Purificación de las lectinas	39
3.4.1. Purificación de la lectina de <i>Punctularia atropurpurascens</i> (PAL)	39
3.4.2. Purificación de la lectina de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	40

3.4.3.	Purificación de la lectina de <i>Gymnopilus spectabilis</i>	44
3.5.	Especificidad de GSL por carbohidratos	45
3.6.	Contenido en carbohidratos de la lectina	45
3.7.	Inmovilización de lectinas fúngicas	45
3.8.	Interacciones entre glicoproteínas y lectinas fúngicas inmovilizadas	47
3.9.	Interacciones entre gliconanopartículas y GSL	47
3.10.	Actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> de las lectinas fúngicas	48
3.10.1.	Microorganismos evaluados y condiciones de cultivo	49
3.10.2.	Estudios de actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> mediante ensayo de difusión en agar	49
3.10.3.	Concentración inhibitoria mínima (CIM <sub>m</sub> )	50
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
4.1	Relevamiento de lectinas en hongos basidiomicetes	51
4.2	Especificidad por carbohidratos	56
4.3	Aislamiento y purificación de la lectina de <i>Punctularia atropurpurascens</i> (PAL) a partir de micelio.	62
4.3.1	Condiciones de cultivo	62
4.3.2	Purificación de la lectina	62
4.4	Aislamiento y purificación de la lectina de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (PSL)	67
4.4.1	Condiciones de cultivo	67
4.4.2	Purificación de PSL por cromatografía de afinidad	69
4.4.3	Purificación de PSL por cromatografía de intercambio iónico	73
4.4.4	Purificación de PSL con nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas con Gal	76
4.5	Aislamiento y purificación de la lectina de <i>Gymnopilus spectabilis</i> (GSL)	85
4.5.1	Purificación de la lectina	85
4.5.2	Especificidad por carbohidratos	89
4.5.3	Contenido en carbohidratos de la lectina	90
4.5.4	Estabilidad a pH	90
4.5.5	Estabilidad a temperatura	91

4.6	Interacción entre lectinas fúngicas y glicocompuestos	91
4.6.1	Síntesis de adsorbentes de afinidad	92
4.6.2	Interacciones de afinidad entre lectinas y glicoproteínas modelo	95
4.6.3	Estudios de interacción glico-nanopartícula- GSL	111
4.7	Actividad antimicrobiana de las tres lectinas fúngicas	118
4.7.1	<i>Punctularia atropurpurascens</i>	119
4.7.2	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	120
4.7.3	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	121
5.	CONCLUSIONES	125
6.	PERSPECTIVAS	128
7.	BIBLIOGRAFÍA	131

# ABREVIATURAS

AHE: actividad hemaglutinante específica

BCA: ácido bicinconínico

BSA: seroalbúmina bovina

CDAP: tetrafluoro borato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio

CIM<sub>HAG</sub>: concentración inhibitoria mínima de la hemaglutinación

CIM<sub>m</sub>: concentración inhibitoria mínima del crecimiento microbiano

EDC: hidrocioruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

EPO: eritropoyetina

FP: factor de purificación

FT: fetuina

Gal: Galactosa

Gal-NAC: N- acetil galactosamina

Glc-NAC: N-acetil glucosamina

GSL: lectina de *Gymnopilus spectabilis*

HAG: hemaglutinación

HRP: peroxidasa de rábano picante

IEF: isoelectroenfoque

LF: lactoferrina

Man: Manosa

MES: ácido 2-(*N*-morfolino) etano sulfónico

MNPs: nanopartículas magnéticas

NHS:N-hidroxisuccinimida

PAL: lectina de *Punctularia atropurpurascens*

PBS: buffer fosfato salino

PMSG: gonadotrofina de suero de yeguas preñadas

PSL: lectina de *Pycnopus sanguineus*

SSB: buffer ácido bórico y borato de sodio

$T_2$ : tiempo de relajación de los protones del agua

TEA: trietilamina

TEM: microscopía electrónica de transmisión

TF: Transferrina

TG: Tiroglobulina

TTC: 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio

UL: unidad de lectina

YCB: Yeast Carbon Base

YNB: Yeast Nitrogen Base

## RESUMEN

El reconocimiento específico entre los glicanos y un grupo particular de proteínas, las lectinas, convierte a éstas en moléculas claves para entender muchos de los roles asociados a glicanos en los procesos biológicos. Las lectinas son proteínas que poseen al menos un dominio con sitio de unión a carbohidratos a través del cual interaccionan en forma específica y reversible con glicocompuestos. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza donde juegan diversas funciones y se las usa como herramientas para múltiples aplicaciones. Su uso en la identificación de isoformas de glicoproteínas relevantes para el diagnóstico de ciertas enfermedades humanas, hace que la búsqueda de nuevas lectinas capaces de interaccionar específicamente con algunas sub-poblaciones de una glicoproteína sea un gran aporte a estos fines. Las lectinas son además potentes herramientas para detección y caracterización de glicoconjugados, el análisis histoquímico de células y tejidos, para evaluar cambios en las superficies celulares durante procesos fisiológicos o patológicos, etc. Otra interesante aplicación de las lectinas es en el diseño de biosensores basados en la agregación de nanopartículas glicosiladas para la detección de analitos glicosilados. Algunas lectinas aisladas de cuerpos de fructificación de hongos basidiomicetes reconocen ciertos oligosacáridos que están presentes en glicoproteínas animales y son así importantes herramientas para la separación de glicoconjugados y para la detección histoquímica de oligosacáridos específicos.

En esta tesis se realizó un primer relevamiento sobre la presencia de lectinas en cepas de hongos basidiomicetes provenientes de colectas realizadas en montes en nuestro país, lo que permitió detectar actividad lectina en varias de ellas, demostrando su potencialidad como fuente de nuevas lectinas. Usando metodologías de afinidad y de intercambio iónico se purificaron 3 nuevas lectinas, a partir de: micelio de *Punctularia atropurpurascens* (PAL), cuerpos de fructificación de *Gymnopilus spectabilis* (GSL) y micelio de *Pycnoporus sanguineus* (PSL). Esta última se purificó además mediante el uso de glico-nanopartículas magnéticas.

En el caso de PAL, se trata de una glicoproteína con un 16 % de carbohidratos, con especificidad hacia Glc-NAc y sus formas poliméricas, quitobiosa, quitotriosa y quitosano, entre otros. En el caso de PSL, la purificación mostró microheterogeneidad de la proteína tanto en el peso molecular de las subunidades como en el pI y exhibe especificidad hacia una amplia variedad de carbohidratos, entre ellos manosa, ramnosa, galactosa y fucosa. Finalmente, GSL también es una glicoproteína con 16 % de carbohidratos, interacciona específicamente con ácidos glucurónico, galacturónico y N-acetilneuramínico, hecho este muy interesante, ya que no hay muchos reportes sobre lectinas fúngicas con especificidades hacia ácidos siálicos.

Estas 3 nuevas lectinas fúngicas fueron utilizadas como ligandos para la síntesis de nuevos adsorbentes de afinidad y se evaluaron sus capacidades de interacción frente a 5 glicoproteínas modelo. Los 3 adsorbentes fueron eficientes en separar al menos dos sub-poblaciones de estas glicoproteínas, con diferentes % de adsorción y elución en cada caso. El adsorbente PAL-Sepharose permite recuperar altos porcentajes de lactoferrina bovina, lo que permitiría aplicarlo también en procesos de purificación de esta glicoproteína.

Las tres lectinas fúngicas poseen además, actividad antimicrobiana *in vitro* frente a diferentes microorganismos: PAL inhibió el crecimiento de *Aspergillus niger*, PSL inhibió el crecimiento de *Escherichia coli*, mientras que GSL inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Aspergillus niger*.

En resumen, a partir de una colección de hongos de nuestro país se purificaron 3 nuevas lectinas las cuales presentan propiedades antimicrobianas *in vitro*, hecho casi inusual con lectinas fúngicas reportadas hasta este momento. Estas lectinas demostraron además, ser buenos ligandos de afinidad para el desarrollo de bioadsorbentes con potenciales aplicaciones tanto en separación de glicoisofomas de glicoproteínas como en purificación de las mismas.

# 1. INTRODUCCIÓN

La ubicuidad de las lectinas refleja su participación decisiva en actividades celulares muy diversas. Operan en numerosos procesos intracelulares e intercelulares, fisiológicos y patológicos. Ejemplos de los primeros son el reconocimiento de espermatozoide y óvulo durante la fecundación, adhesión entre células y célula-matriz extracelular en la embriogénesis y el desarrollo, diferenciación y proliferación celular, recambio de proteínas plasmáticas por el receptor hepático de asialo glicoproteínas, etc. Dentro de los procesos patológicos donde intervienen lectinas se encuentran la unión de bacterias, virus y toxinas a la superficie celular, inflamación, transformación maligna y metástasis, entre otros.

Los carbohidratos de la superficie celular juegan una función importante en la transferencia de señales en el reconocimiento célula-célula y en la adhesión. Además, la estructura de los oligosacáridos afecta el crecimiento celular, diferenciación, y muerte celular, y funcionan como señales para la salida y guía de las proteínas en la célula. Durante ciertas enfermedades, ocurren modificaciones en el patrón de glicosilación de las proteínas. Estos cambios pueden ser la base para el desarrollo de tests más sensibles y que ayuden a discriminar el origen de la misma. Se ha visto que durante el desarrollo de enfermedades hepáticas hay una reducción en la sialilación y un aumento de la ramificación, y que durante el cáncer se observa un aumento en la sialilación y en la fucosilación, mientras que en la inflamación el tipo de glicosilación parece depender de la enfermedad (Turner 1992).

Las interacciones moleculares basadas en el reconocimiento específico entre lectinas y glicanos de la membrana celular cumplen un papel clave en múltiples procesos biológicos. Ello se debe, en parte, al enorme potencial codificador de información de las estructuras de los

glicanos, superior al de proteínas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas. Dicho potencial informativo, codificado en la estructura de los polisacáridos, se descifra a través de su unión selectiva a lectinas a glicanos. Los polisacáridos forman parte de sistemas unicelulares y organismos pluricelulares. Se encuentran libres o unidos por enlace covalente a proteínas y lípidos de la membrana celular, a proteínas de la matriz extracelular, a las de los fluidos biológicos, etc. Los monosacáridos pueden unirse entre sí en varios puntos y varias formas, teniendo en cuenta la isomería  $\alpha/\beta$ ; con esta capacidad de crear un repertorio amplio de isómeros a partir de unos pocos azúcares sencillos, los polisacáridos constituyen las moléculas de reconocimiento por excelencia (Gallego del Sol *et al.* 2006).

Entonces, las lectinas son las moléculas responsables de descifrar códigos relativos a los carbohidratos en organismos de toda la escala evolutiva. Los mecanismos de reconocimiento específico de glicanos han surgido de forma independiente en diversos dominios proteicos, evidenciando la importancia biológica de las lectinas (Gallego del Sol *et al.* 2006).

### **1.1. Generalidades de las lectinas**

Las lectinas son proteínas que poseen al menos un dominio con sitio de unión a carbohidratos, a través del cual interaccionan en forma específica y reversible con glicocompuestos y la interacción es selectiva y puede ser de alta afinidad. El reconocimiento se da no sólo a través de residuos glicosídicos terminales específicos de cadenas laterales, sino que también involucra a residuos internos de oligosacáridos que forman parte de diferentes glicocompuestos. En el caso de lectinas di ó multivalentes cada cadena polipeptídica tiene al menos un sitio de unión a carbohidratos lo cual permite el entrecruzamiento por ejemplo entre células, a través de

sus carbohidratos de la membrana plasmática, o entre macromoléculas que contienen carbohidratos. Originalmente las lectinas fueron definidas como proteínas de unión a carbohidratos de origen no inmune que aglutinan células y precipitan polisacáridos. Sin embargo, ciertas lectinas no presentan esta capacidad ya que son monovalentes para la unión del carbohidrato. A su vez, se diferencian de enzimas que reconocen carbohidratos en que no modifican los carbohidratos a los cuales se unen (Sharon y Lis 2007).

Aunque fueron primeramente detectadas en el reino vegetal, hoy se las considera presentes en todos los organismos: en los últimos años se han identificado lectinas de origen animal, viral, bacteriano y fúngico (Guillot y Kanska 1997; Wang *et al.* 1998; Rini y Lobsanov 1999; Rüdiger y Gabius 2002; Sharon 2008; Medeiros *et al.* 2009).

Las lectinas varían en tamaño, composición aminoacídica, requerimiento de metales, organización de dominios, número de subunidades y ensamblaje, así como en su estructura tridimensional y en la constitución de sus sitios de unión a carbohidratos (Sharon y Lis 2007).

De los cientos de monosacáridos encontrados en la naturaleza, la gran mayoría de lectinas son específicas sólo hacia algunos, entre ellos manosa, glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa y ácido N-acetilneuroamínico. Estas proteínas interactúan tanto con el monosacárido en solución, como cuando forma parte de oligosacáridos complejos y este reconocimiento por estructuras oligosacáridicas más complejas puede ser hacia el monosacárido en posición terminal ó intermedia. En glicoproteínas y glicopéptidos, los oligosacáridos se unen covalentemente a través de dos tipos de enlace: el N-glicosídico, entre el azúcar reductor terminal y el grupo amida de la asparagina (N-glicanos) y el O-glicosídico: entre el azúcar y un grupo hidroxilo de un aminoácido, serina o treonina (O-glicanos) (Figura 1.1). Si bien los N-glicanos presentan un núcleo común (Man $\alpha$ 3(Man $\alpha$ 6)Man $\beta$ 4GlcNAc $\beta$ 4GlcNAc) presentan una enorme

variabilidad en la estructura (con alto contenido en manosa, complejos, híbridos) y en el número de ramificaciones (bi-,tri-, tetrantenarios) (Sharon y Lis 1997). Las lectinas son capaces de reconocer y discriminar entre distintos tipos de estructuras. Por ejemplo, las lectinas Concanavalina A (Con A, lectina de *Canavalia ensiformis*) y LCA (lectina de *Lens culinaris*) ambas son específicas para  $\alpha$ -manósidos y tienen afinidad por estructuras oligosacáridas similares pero no idénticas. Ambas lectinas reconocen estructuras oligosacáridas unidas por enlaces de tipo N-glicosídico a una asparagina (Asn) en una cadena proteica, sin embargo, la sustitución del núcleo trimanosídico típico en estas cadenas de oligosacáridos, por estructuras de tipo lactosamínico (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc), o por la adición de una fucosa (Fuc) en el inicio de la estructura, no es tolerado por Con A (Figura 1.2 A). Sin embargo, LCA interacciona con estas estructuras con gran especificidad (Figura 1.2 B). Además, la Con A reconoce con mayor afinidad los oligosacáridos N-linked con estructura biantenaria que tri o tetrantenaria, demostrando que el tipo de estructura que los oligosacáridos adopten influye fuertemente en la afinidad (Debray *et al.* 1981).

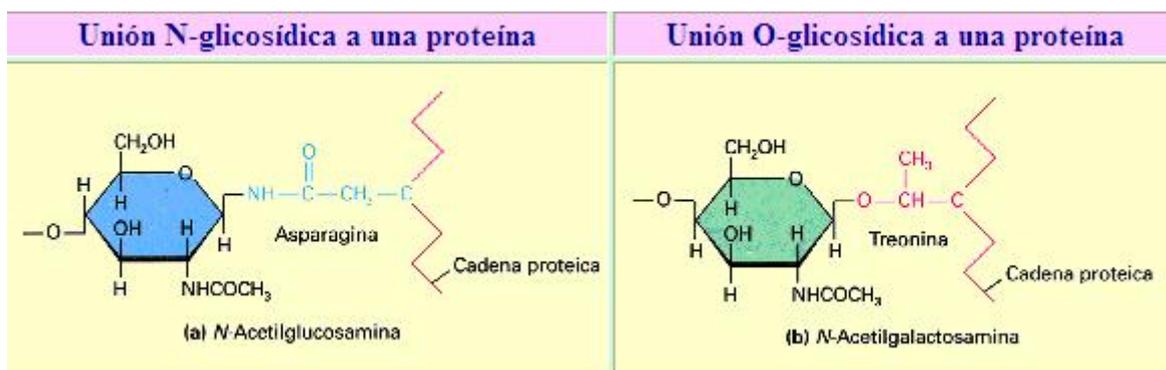


Figura 1.1. Uniones N- y O- glicosídicas presentes en glicoproteínas. Extraído de (Mathews *et al.* 2002).

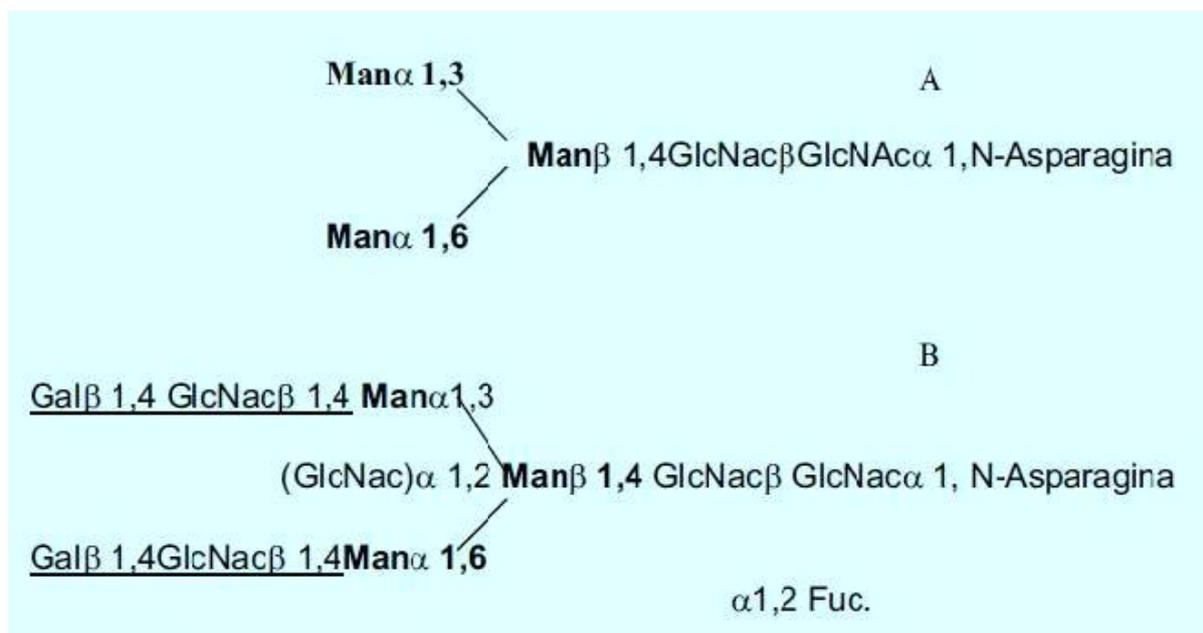


Figura 1.2. N-glicanos reconocidos por las lectinas Con A y LCA. A: En negrita se observa el núcleo trimanosídico reconocido por la lectina Con A. B: Subrayado se observan las sustituciones lactosamínicas en el núcleo trimanosídico que interfieren con el reconocimiento de la lectina Con A, pero que no afecta la interacción de la lectina LCA con estas estructuras. Extraído de (Hernandez Cruz *et al.* 2005).

La elucidación de estructuras cristalinas de lectinas animales con sus ligandos ha mostrado que los sitios de unión son relativamente de baja afinidad y que la selectividad se logra principalmente por una combinación de enlaces de hidrógeno (con grupos hidroxilo de los carbohidratos) y de fuerzas de van der Waals. A su vez, la mayor selectividad puede alcanzarse mediante contactos adicionales entre los carbohidratos y la proteína, a veces involucrando moléculas de agua o cationes divalentes. La región de contacto entre el carbohidrato y el polipéptido típicamente involucra sólo uno a tres residuos de monosacáridos. En consecuencia, estos sitios de unión de la lectina tienden a ser de relativa baja afinidad pero alta especificidad. La habilidad de tales sitios para mediar interacciones biológicamente relevantes en el sistema intacto requiere multivalencia (Varki *et al.* 1999).

## 1.2. Evaluación de la interacción entre lectinas y carbohidratos

El ensayo de aglutinación usando glóbulos rojos ha sido el más ampliamente utilizado en los trabajos de laboratorio para la evaluación de la interacción entre proteínas y carbohidratos. La aglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específicas (como las lectinas o los anticuerpos) que reconocen determinadas estructuras moleculares, formando una red que precipita. Cuando las células que aglutinan son glóbulos rojos el fenómeno se denomina hemaglutinación (Hierholzer *et al.* 1969).

La aglutinación está afectada por muchos factores, como ser la accesibilidad de sitios receptores, la fluidez de la membrana y el estado metabólico de las células. A su vez está influenciado por condiciones externas al ensayo tal como temperatura, concentración celular, entre otras. La contribución relativa de los diferentes factores depende de la lectina y de las células utilizadas.

La inhibición por carbohidratos (simples o complejos) de la aglutinación mediada por lectinas y permite determinar la especificidad entre la lectina y dichos carbohidratos.

Más recientemente se han desarrollado otros métodos de detección como ser microarreglos de diferentes carbohidratos acoplados a pocillos de placas de microtitulación (Bryan *et al.* 2002; Nakamura-Tsuruta *et al.* 2006; Pohleven *et al.* 2009) o métodos basados en la similitud de secuencia entre nuevas proteínas descubiertas y lectinas ya conocidas, mediante búsqueda de homologías en base de datos ya sea a nivel de proteína o de cDNA (Drickamer y Dodd 1999; Khan y Khan 2011). También, cuando las lectinas son glicosiladas, pueden ser detectadas *in situ* en tejidos o células, por tinción para glicoproteínas derivatizadas (Gabius 1994).

### 1.2.1. Estudio de la interacción lectina-nanopartícula glicosilada

Las nanopartículas glicosiladas son otra importante herramienta que ha contribuido al conocimiento de las interacciones lectina-carbohidrato. Por un lado permiten compensar la baja afinidad de este tipo de interacciones con una presentación multivalente de los ligandos (de la Fuente y Penadés 2006). A su vez, al tener un tamaño similar al de las lectinas la interacción con ellas es más eficaz. Por otro lado, es posible poder controlar y analizar su derivatización (Barrientos *et al.* 2003), lo cual permitiría poder diseñar una plataforma de interacción multivalente con una composición homogénea de carbohidratos.

Si bien durante los últimos años se han venido utilizando las nanopartículas para desarrollar biosensores utilizando anticuerpos o sondas de ADN como elementos de reconocimiento biológico, son pocos los ejemplos de su uso como una herramienta útil en el ámbito de la Glicómica (de la Fuente y Penadés 2006). Es posible encontrar ejemplos del uso de nanopartículas funcionalizadas con carbohidratos para evaluar interacciones carbohidrato-carbohidrato (Barrientos *et al.* 2003; de la Fuente y Penadés 2004; de la Fuente y Penadés 2005), o para su uso en terapias antiadhesivas. En cuanto al uso de gliconanopartículas para el estudio de interacciones carbohidrato-lectina existen algunas publicaciones que utilizan gliconanopartículas de oro, fluorescentes (QDs) o magnéticas (Robinson *et al.* 2005; Sun *et al.* 2006).

En el caso particular de las gliconanopartículas magnéticas el grupo del Prof. Josephson y del Prof. Weissleder es pionero en utilizar la propiedad que tienen las nanopartículas superparamagnéticas de modificar los tiempos de relajación transversal ( $T_2$ ) de los protones del agua para el diseño de biosensores. El grado de modificación de los valores de  $T_2$  depende del estado coloidal de las nanopartículas magnéticas, es así que su agregación acorta de forma drástica los valores de  $T_2$ . Este fenómeno ha sido utilizado por el grupo de Weissleder para desarrollar biosensores utilizando anticuerpos o sondas de ADN como

elementos de reconocimiento biológico, y también para demostrar que podría ser usado en la detección de analitos glicosilados (Perez *et al.* 2002; Perez *et al.* 2004). Con este fin utilizaron la multivalencia que presenta la Con A para así generar agregados de nanopartículas superparamagnéticas funcionalizadas con glucosa y acoplaron la detección de glucosa a los incrementos de  $T_2$  generados por desagregación específica de estos agregados.

### 1.3. Roles biológicos de las lectinas

Muchas lectinas de plantas, están implicadas en la protección de la planta frente a animales predadores y fitopatógenos. Se ha reportado que diferentes lectinas inhiben la esporulación y crecimiento fúngico de *Trichoderma viride*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum sp.* y *Gibberella zae*, entre otros (Chen *et al.* 2005). También se ha descrito como rol de lectinas vegetales la mediación de la unión de bacterias fijadoras de nitrógeno a las raíces de plantas leguminosas; algunos de los factores de nodulación liberados por la bacteria son glicoconjugados por lo cual se considera que algunas lectinas vegetales estarían involucradas en esta importante vía de señalización. Otras posibles funciones de las lectinas vegetales serían como proteínas de almacenamiento en semillas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica de células embrionarias, elongación de paredes celulares, etc. (Varki *et al.* 1999).

En el caso de lectinas de origen viral, se ha demostrado por ejemplo que la hemaglutinina del virus de la influenza reconoce y se une a receptores que contienen ácido siálico en la superficie de células blanco, iniciando la interacción virus-célula (Sharon y Lis 2007).

Las lectinas presentes en bacterias y parásitos intestinales median la adherencia específica de carbohidratos a las células epiteliales en el tracto gastrointestinal o urinario, facilitando la infección. Ocasionalmente, lectinas bacterianas se unen a carbohidratos en células fagocíticas provocando la muerte de las bacterias por un proceso llamado lectinofagocitosis. Un ejemplo lo constituye *Escherichia coli* que se adhiere a células epiteliales y esta adhesión es inhibida específicamente por Man y metil-manósido (Sharon y Lis 2007).

En animales, las lectinas solubles pueden activar el complemento, mientras que otras, unidas a membranas, pueden matar organismos infecciosos, demostrando su participación en la inmunidad innata. Las lectinas asociadas a membrana también funcionan en el reclutamiento de glicoproteínas del sistema circulatorio por parte de diferentes organelos celulares, en la migración de linfocitos recirculantes de la corriente sanguínea hacia los nódulos linfáticos, bazo y otros órganos linfoides, y en el proceso de metástasis. Se ha demostrado que la exposición de residuos internos de galactosa (Gal) en glicoproteínas de suero tal como la fetuina lleva a una marcada disminución en el tiempo de vida en circulación de dicha glicoproteína; la remoción de Gal restaura los tiempos de vida en circulación a niveles normales. Las lectinas también inducen el agrupamiento de receptores sobre linfocitos y otras clases de células, lo cual es requerido para varias actividades de las lectinas tal como estimulación mitogénica e inducción de apoptosis. También actúan inhibiendo la coagulación (Varki *et al.* 1999; Sharon y Lis 2007).

Para las lectinas fúngicas se han propuesto diversos roles tales como participación en el proceso de formación de primordio previo a la formación del cuerpo de fructificación, formación de estructuras miceliales que facilitan la penetración de hongos parasíticos en el organismo hospedero, así como reconocimiento molecular durante la etapa temprana de micorrización (Giollant *et al.* 1993; Swamy *et al.* 2004; Leonidas *et al.* 2007). En el hongo *Lentinula edodes* se ha demostrado que la actividad

de la lectina intracelular varía según las etapas de desarrollo del hongo (Vetchinkina *et al.* 2008). En estudios realizados con la levadura *Paracoccidioides brasiliensis* se reportó que en presencia de anticuerpos específicos se interrumpía la unión lectina-quitina, resultando en la inhibición del crecimiento de la levadura (Ganiko *et al.* 2007). A su vez, se ha sugerido que las lectinas serían las principales responsables de la actividad insecticida presente en cuerpos de fructificación de hongos (Wang *et al.* 2002; Trigueros *et al.* 2003). Recientemente, estudios realizados con la lectina del hongo *Coprinopsis cinerea* sugirieron un posible rol de las lectinas fúngicas en la defensa contra predadores por unión a los carbohidratos específicos del huésped. Se demostró que la toxicidad del nemátodo *Caenorhabditis elegans* dependía de la interacción entre la lectina fúngica y un glicoconjugado que contenía fucosa (Butschi *et al.* 2010).

#### **1.4. Aplicaciones de lectinas**

Las lectinas han demostrado ser invaluable herramientas para la detección aislamiento y caracterización de glicoconjugados, principalmente de glicoproteínas, para histoquímica de células y tejidos y para evaluar los cambios que ocurren en las superficies celulares durante procesos fisiológicos o patológicos, desde diferenciación celular a cáncer.

Como sus interacciones con biomoléculas ó con células enteras pueden ser revertidas mediante competencia por carbohidratos simples, ello puede ser tomado como evidencia de la presencia de carbohidratos en la célula. Es así que la unión a la lectina ha sido frecuentemente usada para demostrar que los receptores de membrana para muchas hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y toxinas, son glicoconjugados.

La habilidad de las lectinas para afectar la proliferación y adhesión celular uniéndose a glicoconjugados de la superficie celular es ampliamente utilizado en biología experimental, citología, genética y oncología (Kilpatrick 2000; Marty-Detraves *et al.* 2004).

Otras aplicaciones han sido tipificación sanguínea, fraccionamiento de linfocitos y de células de médula ósea para el trasplante de médula ósea, estimulación de linfocitos en pacientes inmuno comprometidos, etc. (Sharon y Lis 2007).

Además, la presencia de determinadas lectinas en diferentes especies o géneros las convierten en una herramienta a considerar en estudios taxonómicos y filogenéticos (Sharon y Lis 2007).

También han sido utilizadas en el estudio de microorganismos y para el estudio de sus estructuras superficiales. Es así que la presencia de *Bacillus anthracis* puede ser confirmada fácilmente por aglutinación con las lectinas SBA (soybean agglutinin) o HPA (*Helix pomatia* agglutinin) y *Neisseria gonorrhoeae* puede ser identificada con la lectina WGA. Lectinas de diferentes orígenes han sido también utilizadas como herramientas de diagnóstico para la identificación de varios serogrupos de estreptococos alfa hemolíticos. A su vez, se han utilizado lectinas para la detección de ácidos teicoicos sobre bacterias tales como *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, para examinar la composición y organización de paredes celulares de levaduras, así como para la detección y caracterización de glicoconjugados en biofilms bacterianos (Sharon y Lis 2007).

La unión de una lectina a cierto tipo de células puede ser rápidamente revertida lo que representa una ventaja con respecto a los anticuerpos ya que en general es imposible remover los anticuerpos de las células a las cuales están unidas (Sharon y Lis 2007).

Muchas lectinas, obtenidas principalmente por purificación mediante cromatografía de afinidad con carbohidratos inmovilizados, están disponibles comercialmente en forma nativa o como derivados; ejemplos

de esto son las lectinas fluorescentes ampliamente utilizadas en microscopía y lectinas inmovilizadas para la separación y caracterización de oligosacáridos y glicoproteínas.

#### **1.4.1. Aplicación en el estudio de isoformas de glicoproteínas**

La utilización de lectinas en la identificación de isoformas de glicoproteínas (glicoisofomas) es actualmente una importante contribución en el laboratorio para el diagnóstico de enfermedades humanas (Durand y Seta 2000).

Las proteínas individuales, aunque comparten el mismo nombre y propiedades tales como función y estructura, muchas veces existen como isoformas que muestran heterogeneidad de diferentes tipos. La más común resulta de variaciones en la estructura de los carbohidratos de las glicoproteínas. Prácticamente todas las proteínas identificadas en el suero son glicosiladas (Sharon y Lis 1997) con algunas excepciones como la albúmina,  $\alpha$ -amilasa, proteína C-reactiva y  $\beta$ -microglobina. Las glicoproteínas pueden tener desde 1 hasta 200 o más unidades de carbohidratos. En los animales superiores, los monosacáridos más comunes presentes en glicoproteínas son hexosas (Man, Gal, Glc), hexosaminas (Glc-NAc, Gal-NAc), deoxihexosas (fucosa), pentosas (xilosa) ácidos urónicos (glucurónico, idurónico) y ácidos siálicos. Esta diversidad puede ser luego aumentada por modificaciones de algunos grupos químicos. Los grupos hidroxilos de los monosacáridos pueden ser fosforilados, sulfatados, metilados y *o*-acetilados. Los grupos amino pueden permanecer libres, ser acetilados o N-sulfatados. Los grupos carboxilo pueden, ocasionalmente, sufrir lactonización con grupos hidroxilos cercanos. Además, se han descubierto más de 30 tipos de ácido siálico. Las cantidades relativas de los monosacáridos introducidos en las proteínas están reguladas a través de una compleja combinación de

diversos factores. La diversidad molecular que puede ser entonces generada a partir de estructuras de oligosacáridos es enorme. Pero, a pesar de la enorme cantidad de combinaciones posibles de monosacáridos, las combinaciones realmente utilizadas en la naturaleza son limitadas. Las funciones más específicas y esenciales son mediadas por secuencias de oligosacáridos inusuales, secuencias terminales inusuales, ó por modificaciones posteriores de los propios azúcares. Las gonadotrofinas humanas poseen entre 20 y 30 isoformas diferentes, que se pueden separar en base a las cargas y así los niños, los hombres, las mujeres jóvenes y las de edad avanzada poseen todas formas distinguibles entre ellos de esta proteína (Lönnberg 2002).

La microheterogeneidad es un hecho común de la glicosilación, el cual aumenta aún más la complejidad en la determinación de la glicosilación en proteínas. Esto es probablemente debido a la combinación de una producción al azar y a isoformas altamente específicas producidas para una cierta función. La heterogeneidad de una glicoproteína dada se podría explicar como parte de un proceso rápido de glicosilación en la célula, que resulta en la producción no uniforme o en variaciones intracelulares específicas, donde cada célula produce una forma.

La importancia clínica de las isoformas de las glicoproteínas radica en que las estructuras de los oligosacáridos unidos a proteínas pueden modular procesos biológicos afectando por ejemplo la conformación de la proteína, los procesos degradativos, las interacciones moleculares y celulares y el tiempo de recambio (Varki 1993).

La información acerca de las proporciones relativas de las diferentes isoformas y su concentración absoluta es una herramienta importante para entender su rol biológico y puede ser utilizada en el diagnóstico de enfermedades. En este sentido, la búsqueda de lectinas que sean capaces de interactuar con algunas subpoblaciones de glicoproteínas, permitiría aportar una herramienta al diagnóstico.

*A continuación se hace referencia a algunas de las glicoproteínas usadas en este trabajo.*

### **Transferrina (TF)**

Esta glicoproteína del plasma que se encuentra en concentración 50 $\mu$ M se encarga del transporte de hierro en la sangre y posee al menos 9 isoformas relacionadas con variaciones en sus carbohidratos. El análisis de las concentraciones de estas isoformas permite monitorear el abuso de alcohol (Stibler *et al.* 1986), el síndrome tipo I de glicoproteínas deficientes de carbohidratos, conocida como Deficiencia Congénita de Glicosilación (CDG en inglés) o la pérdida de fluido cerebro-espinal (Stibler *et al.* 1998).

### **Lactoferrina (LF)**

Es otra proteína globular perteneciente a la familia de las transferrinas que muestra una gran afinidad por iones hierro. Fue primeramente purificada a partir de la leche, sin embargo está presente en otros fluidos corporales y es muy abundante en fluidos mucosos. Tiene actividad antimicrobiana por lo que es considerada un componente de la inmunidad innata. También tiene actividad antitumoral, anti-inflamatoria e inmunoregulatoria. La disponibilidad comercial de LF recombinante ha permitido profundizar en ensayos clínicos dirigidos a evaluar la inocuidad y eficacia de formulaciones simples o combinadas de la LF con otras moléculas bioactivas. Debido a que variaciones en el patrón de glicosilación de LF pueden llegar a alterar su actividad biológica, es esencial la identificación de las distintas glico-isoformas recombinantes producidas en distintos organismos (Aguila y Brock 2001).

### **Gonadotropina**

La gonadotropina sérica de yeguas gestantes (PMSG) es una glicoproteína secretada durante la gestación, pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas que incluye la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH). Estas hormonas, son heterodímeros compuestos de dos subunidades asociadas no covalentemente. Dentro de una especie la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha$  es idéntica mientras que la subunidad  $\beta$  de cada hormona posee secuencias únicas (hormona-específica). Ambas cadenas son glicosiladas y la deglicosilación de la cadena alfa resulta en pérdida de bioactividad, pero no afecta la unión específica de la hormona a su receptor. Los carbohidratos en PMSG representan un 45 % del peso total y el 10% es debido específicamente al ácido siálico (Moore y Ward 1980).

### **Eritropoietina (EPO)**

Esta hormona de naturaleza glicoproteica es el principal regulador de la producción de glóbulos rojos, la cual existe como una mezcla compleja de isoformas; la mayor parte de éstas corresponden a diferencias en los carbohidratos, que constituyen el 40% de la masa molecular de la EPO. Desde 1988, la EPO recombinante humana (rhEPO) está disponible comercialmente, con propósitos terapéuticos para ciertas clases de anemias, como las causadas por insuficiencia renal (Skibeli *et al.* 2001). Sin embargo, esta hormona ha sido también usada con propósitos ilegítimos, en dopaje en deportes de alto impacto y desde 1990, está oficialmente prohibida por el Comité Olímpico Internacional, por lo que resulta de interés desarrollar nuevos métodos para distinguir rhEPO de las formas endógenas (Lasne *et al.* 2002).

#### 1.4.2. Aplicaciones de lectinas como agentes antimicrobianos

Otra prometedora aplicación de las lectinas es como agentes antimicrobianos.

Los agentes infecciosos resistentes, o sea aquellos que no son destruidos o inhibidos por los compuestos antimicrobianos usuales, son una creciente causa de preocupación en los organismos de salud pública. La tuberculosis, la gonorrea, la malaria y las otitis infecciosas en niños pequeños son sólo algunas de las enfermedades que se han convertido en difíciles de tratar debido a la aparición de cepas resistentes y multiresistentes (NAID 2011). Particularmente importante es el aumento en la resistencia de *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria gram positiva coloniza la piel en aproximadamente el 40 % de las personas sanas. Es común que cause infecciones en la piel, en tejidos blandos, infecciones endovasculares, neumonía, artritis séptica, endocarditis, etc. Uno de los patógenos clínicamente más problemático en el presente es el *S. aureus* metilino resistente (MRSA), una de las bacterias más difíciles de tratar en pacientes y de erradicar del ambiente hospitalario. En el Reino Unido el número de muertos a causa de MRSA fue de 781 en 2009 (ONS 2010). Recientemente, se ha demostrado que los agentes etiológicos más prevalentes en infecciones en sangre son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Luzzaro *et al.* 2011). Además especies de los géneros *Candida* y *Aspergillus* son patógenos humanos muy comunes (Segal y Walsh 2006; Pfaller y Diekema 2007). *A. niger* puede causar efectos pulmonares severos; la aspergilosis invasiva es una causa mayor de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (Faber *et al.* 2009). Como consecuencia, las industrias farmacéuticas buscan activamente nuevos agentes antimicrobianos de diversas fuentes.

Entre el enorme número de lectinas de origen vegetal publicadas a la fecha, se han descrito algunas con actividad antimicrobiana (Paiva *et al.* 2010; Wong *et al.* 2010) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Actividad antimicrobiana de lectinas vegetales. Extraído de (Paiva et al. 2010).

Plant lectins with antimicrobial activity.

Plant (tissue)	Lectin specificity	Antimicrobial activity
<i>Araucaria angustifolia</i> (seed)	GlcNAc	<i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passiflorae</i>
<i>Artocarpus incisa</i> (seed)	GlcNAc	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Artocarpus integrifolia</i> (seed)	GlcNAc	<i>F. moniliforme</i> , <i>S. cerevisiae</i>
<i>Astragalus mongholicus</i> (root)	Lactose D-Gal	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Drechslera turcia</i>
<i>Eugenia uniflora</i> (seed)	Carbohydrate complex	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Corynebacterium bovis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> sp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Gastrodia data</i> (corms)	$\alpha$ -Man GlcNAc	<i>B. cinerea</i> , <i>Ganoderma lucidum</i> , <i>Gibberella zeae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Valsa ambiens</i>
<i>Hevea brasiliensis</i> (latex)	Chitotriose	<i>B. cinerea</i> , <i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>pisi</i> , <i>Phycomyces blakesleeanae</i> , <i>Pyrenophora tritici-repentis</i> , <i>Pyricularia oryzae</i> , <i>Septoria nodorum</i> , <i>Trichoderma hamatum</i>
<i>Myracrodruon urundeuva</i> (heartwood)	GlcNAc	<i>B. subtilis</i> , <i>Corynebacterium callunae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>Fusarium decemcellulare</i> , <i>Fusarium lateritium</i> , <i>Fusarium fusarioides</i> , <i>Fusarium verticilloides</i>
<i>Ophiopogon japonicus</i> (rhizome)	Man	<i>Gibberella saubinetii</i> , <i>R. solani</i>
<i>Opuntia ficus indica</i> (cladodes)	Glc/Man	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i>
<i>Phaseolus coccineus</i> (seeds)	Sialic acid	<i>Helminthosporium maydis</i> , <i>Gibberella sanbinetti</i> , <i>R. solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>Phthirusa pyrifolia</i> (leaf)	Fru-1.6-P2	<i>B. subtilis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>F. lateritium</i> , <i>R. solani</i>
<i>Pisum sativum</i> (seed)	Man	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Trichoderma viride</i>
<i>Sebastiania jacobinensis</i> (bark)	Carbohydrate complex	<i>F. moniliforme</i> , <i>F. oxysporum</i>
<i>Talisia esculenta</i> (seeds)	Man	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>S. cerevisiae</i>
<i>Triticum vulgare</i> (seeds)	GlcNAc	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i>
<i>Urtica dioica</i> (rhizome)	GlcNAc	<i>B. cinerea</i> , <i>C. lindemuthianum</i> , <i>Phoma betae</i> , <i>Phycomyces blakesleeanae</i> , <i>Septoria nodorum</i> , <i>Trichoderma hamatum</i> , <i>T. viride</i>

D-Gal: galactose; Fru-1,6-P2: fructose-1,6-bisphosphate; Glc: glucose; GlcNAc: N-acetylglucosamine; Man: mannose.

Algunas lectinas animales también podrían inhibir el crecimiento de microorganismos (Sanchez Riera *et al.* 2003; Kawsar *et al.* 2010). Aunque también se han realizado estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* con lectinas de origen fúngico (Han *et al.* 2005; Chumkhunthod *et al.* 2006; Li *et al.* 2008) dichas lectinas fúngicas no produjeron inhibición del crecimiento microbiano en las condiciones ensayadas.

La actividad antibacteriana exhibida por ciertas lectinas sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se da a través de la interacción de la lectina con algunos componentes de la pared celular bacteriana incluyendo ácidos teicoico y teicurónico, peptidoglicanos y lipopolisacáridos (Bourne *et al.* 1994). La inhibición del crecimiento fúngico puede ocurrir a través de la unión de lectinas a las hifas, resultando en una pobre absorción de los nutrientes así como por interferencia del proceso de germinación de esporas (Selitrennikoff 2001).

#### **1.4.3. Aplicaciones de las lectinas inmovilizadas**

Las lectinas, unidas a un soporte sólido (lectinas inmovilizadas) poseen diversas e interesantes aplicaciones. Por lejos, la más ampliamente usada es en la purificación de glicocompuestos. Como ejemplo, se ha sintetizado un adsorbente de afinidad usando la lectina de soja (*Glycine max*) como ligando, la cual fue inmovilizada y usada en procesos a escala banco, para la purificación y producción del polisacárido capsular de *Streptococcus pneumoniae* cepa 14 (Franco Fraguas *et al.* 2003b).

Otra importante aplicación es en el ámbito de producción de glicoproteínas. La bioseparación y purificación de productos es el principal inconveniente para las industrias biotecnológicas y farmacéuticas. Los procesos conocidos como "*downstream processing*", generalmente

representan el costo mayor en el proceso de producción de proteínas. Esto, junto a los requerimientos cada vez mayores de productos con alta pureza y actividad, ha llevado a que en las últimas décadas se haya incrementado notablemente la aplicación de tecnologías selectivas en procesos de gran escala. Además, los adsorbentes insolubles ofrecen importantes ventajas que los ha llevado a un uso cada vez más generalizado en trabajos a escala analítica y están siendo cada vez más utilizados en el *downstream processing*. Poseen alta estabilidad mecánica lo que permite utilizar mayores presiones, mayores velocidades de fase móvil y partículas menores, lo cual implica mayores velocidades de transferencia de masa. El escalado desde escala analítica a escala de producción resulta más reproducible, lo que genera productividades potencialmente superiores y mejoras en el proceso económico. (Cartellieri *et al.* 2002). La literatura abunda en información acerca del uso de las lectinas inmovilizadas para la purificación de una enorme variedad de glicoproteínas. En particular, se menciona a WGA inmovilizada para la purificación de la glicoproteína fetuina, a partir de suero fetal bovino. La purificación se realiza en un solo paso, aplicando el suero filtrado a una columna empaquetada con el adsorbente. El rendimiento reportado es de 1.6 mg fetuina/100ml de suero. La lectina de *Sambucus nigra* inmovilizada, se usa para la purificación de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, la cual interacciona con la lectina a través de los residuos de ácidos siálicos unidos por enlaces  $\alpha$ 2,6 (Cartellieri *et al.* 2002).

Otra aplicación de enorme potencial de las lectinas inmovilizadas es en la separación de isoformas de una glicoproteína. Recientemente, se ha reportado el uso de columnas de afinidad con WGA inmovilizada, para diferenciar EPO humana nativa de alguna de sus formas recombinantes (Franco Fraguas *et al.* 2008).

Las lectinas inmovilizadas también han sido utilizadas con éxito con otra finalidad: como adsorbentes para inmovilización por afinidad de enzimas de naturaleza glicoproteica de interés biotecnológico. Con A-

Sepharose resulta ser un muy buen adsorbente de afinidad para la inmovilización de la glicoproteína  $\beta$ -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (Franco Fraguas *et al.* 2001). Este ha sido puesto a punto y se adapta muy bien a procesos de hidrólisis de lactosa.

### **1.5. Lectinas fúngicas: propiedades y aplicaciones**

Algunas especies de hongos presentan varias lectinas que pueden estar estrechamente relacionadas, difiriendo por ejemplo en su punto isoeléctrico o pequeñas variaciones en el peso molecular, o ser muy diferentes llegando a tener especificidades diferentes (aún presentando estructuras relacionadas)(Guillot y Kanska 1997).

Si bien mucho se sabe sobre lectinas aisladas a partir de cuerpos de fructificación, recién en los últimos años se han publicado algunos trabajos sobre la obtención de lectinas a partir de micelio y en algunos casos a partir del extracto extracelular (Tsivileva *et al.* 2008).

También han sido detectadas en distintas etapas del crecimiento fúngico, involucradas en dormancia, así como en morfogénesis (Guillot y Kanska 1997).

La mayoría de estas lectinas están constituidas por dos o cuatro subunidades que pueden ser o no idénticas, unidas en general por enlaces no covalentes. Sin embargo existen algunas excepciones como las lectinas monoméricas de los hongos *Lentinula edodes* (Tsivileva *et al.* 2008) y de *Cordyceps militaris* (Jung *et al.* 2007) con pesos moleculares de 45 y 31 kDa, respectivamente. El rango de peso molecular está entre 16 y 100 kDa para la mayor parte de las lectinas fúngicas reportadas, aunque la mayoría corresponden a valores entre 26 y 36 kDa (Khan y Khan 2011). Muchas lectinas fúngicas son glicosiladas y la mayoría presenta un contenido de carbohidratos entre 2 y 16 % (Conrad y Rudiger 1994; Khan y Khan 2011). A su vez, la mayoría de las lectinas fúngicas

presentan puntos isoeléctricos en el rango de 5-8, aunque se han reportado algunas con pI de 3.75 o 10.6 (Khan y Khan 2011).

A la fecha se han reportado muy pocas estructuras cristalinas de lectinas fúngicas. La lectina de unión a fucosa de *Aleuria aurantia* presenta una estructura diferente a la demás lectinas conocidas. La lectina de *Flammulina velutipes* presenta similitud estructural a la fibronectina humana. Las lectinas de *Xerocomus chrysenteron* (XCL) y *Agaricus bisporus* (ABL) se asemejan a las actinoporinas, una familia de toxinas formadoras de poros; ambas reconocen Gal-NAc y Gal, mientras que ABL también reconoce al antígeno TF (transfer factor), un disacárido sobreexpresado en glicoproteínas de la superficie celular en carcinomas humanos. Tanto ABL como XCL presentan actividad antiproliferativa sobre diferentes líneas celulares. La lectina de *Sclerotium rolfsii* también pertenece a la familia de lectinas fúngicas específicas del antígeno TF. Las lectinas de *Coprinopsis cinerea* (CGL2) y *Agrocybe cylindrae* (ACG) comparten un dominio de reconocimiento de carbohidratos con galectinas, una gran familia de lectinas animales de unión a  $\beta$ -galactósidos con un dominio de reconocimiento a carbohidratos altamente conservado. Mientras CGL2 tiene especificidad única y se une al tetrasacárido de grupo sanguíneo A, ACG reconoce sialoconjugados. La lectina de *Laetiporus sulphureus* presenta un dominio N- terminal diferente y un C-terminal similar al encontrado en algunas toxinas. La lectina de *Psathyrella velutina*, a diferencia de otras lectinas fúngicas conocidas, se une a  $Ca^{2+}$  de una manera similar que las integrinas (Leonidas *et al.* 2007).

Se ha determinado la constante de afinidad para algunas lectinas fúngicas. La lectina de *Fusarium solani* presentó muy bajas constantes de afinidad para mono y oligosacáridos pero muy altas para glicoproteínas (Khan *et al.* 2007). En el caso de la lectina de *Ganoderma lucidum* se observó dos veces mayor afinidad por N-glicanos que por O-glicanos (Thakur *et al.* 2007). La lectina dimérica del hongo *Aleuria aurantia*

presenta cinco sitios de unión por subunidad, uno de los cuales tiene alta afinidad por fucosa y oligosacáridos que contienen fucosa (Olausson *et al.* 2008). Estudios comparativos de unión de las lectinas de *Aleuria aurantia* (AAL) y *Aspergillus oryzae* (AOL) revelaron que AOL presentaba constantes de afinidad 3 a 6 veces superiores para oligosacáridos  $\alpha$ -1,6 fucosilados que AAL; a su vez sólo AAL reconocía oligosacáridos  $\alpha$ -1,3 fucosilados (Matsumura *et al.* 2009).

Dentro de las posibles aplicaciones de las lectinas fúngicas se ha demostrado que muchas de ellas tienen actividad antiproliferativa contra líneas celulares tumorales humanas (Liua *et al.* 2001; Koyama *et al.* 2002; Zhao *et al.* 2009), así como diversas actividades inmunomodulatorias (Paaventhana *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003; Ho *et al.* 2004).

Además, varias lectinas aisladas de cuerpo de fructificación de hongos basidiomicetes poseen especificidades hacia determinados oligosacáridos presentes en glicoproteínas de origen animal y son así, importantes herramientas para la separación de glicoconjugados y para la detección histoquímica de oligosacáridos específicos (Mo *et al.* 2000).

Existe a nivel comercial, una carencia de herramientas de afinidad altamente específicas, como pueden ser las lectinas fúngicas, que puedan aplicarse a la purificación eficiente de una glicoproteína dada, en forma rápida, a bajo costo y con probabilidad de ser utilizadas a nivel de procesos de producción. Si bien se ha reportado la presencia de más de cincuenta lectinas en hongos, únicamente una, la proveniente de *Agaricus bisporus*, está disponible comercialmente.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Aislamiento, purificación y producción de lectinas de hongos basidiomicetes y evaluación de sus interacciones frente a glicocompuestos.

### 2.2. Objetivos específicos

- 1) Selección de cepas fúngicas buenas productoras de lectinas
- 2) Aislamiento, purificación y producción de las lectinas de *Punctularia atropurpurascens*, *Gymnopilus spectabilis* y *Pycnoporus sanguineus*.
- 3) Estudio de las interacciones lectina-glicocompuestos y sus posibles aplicaciones:
  - i) utilización de las tres lectinas purificadas en la preparación de adsorbentes de afinidad y evaluación de su potencial uso frente a glicoproteínas de interés biotecnológico y
  - ii) evaluación de estas lectinas como agentes de defensa frente a microorganismos

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Hongos basidiomicetes

Los micelios y /o cuerpos de fructificación de los hongos *Abortiporus biennis*, *Bjerkandera adusta*, *Coriolus sp.*, Corticiacea, *Gymnopilus sp.*, *Gymnopilus spectabilis*, *Ganoderma resinaceum*, *Impicoide sp.*, *Inocutis jamaicensis*, *Inonotus sp.*, Poliporacea, *Pycnoporus sanguineus* y *Trametes versicolor* provinieron de colectas realizadas en monte de *Eucalyptus globulus globulus* en Uruguay. Los cuerpos de fructificación de *Gymnopilus spectabilis*, *Ganoderma lucidum* y *Pycnoporus sanguineus* fueron colectados en monte nativo en Uruguay y en el caso de *Agaricus bisporus* obtenidos en un mercado local.

Los micelios de *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus djmour*, *Pleurotus ostreatus* y *Punctularia atropurpurascens* provinieron de la Colección de la Cátedra de Microbiología General (CCMG), Montevideo, Uruguay.

### 3.2. Preparación de extractos acuosos

A partir de los micelios de *Abortiporus biennis*, *Bjerkandera adusta*, *Coriolus sp.*, Corticiacea, *Gymnopilus sp.*, *Gymnopilus spectabilis*, *Ganoderma resinaceum*, *Impicoide sp.*, *Inocutis jamaicensis*, *Inonotus sp.*, Poliporacea, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa*, *Lentinula edodes*, *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotus djmour*, *Pleurotus ostreatus* y *Punctularia atropurpurascens* crecidos en medio Agar Extracto de Malta (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) se inocularon matraces con medio 1.25 % Extracto de Malta (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK). Los matraces se incubaron a 28 °C en shaker a 100 rpm durante 14 días. Luego del período de incubación se filtró para separar el micelio y la fracción extracelular.

Además, para los hongos *Punctularia atropurpurascens*, *Pycnoporus sanguineus* y *Gymnopilus spectabilis* se ensayaron otras condiciones de crecimiento que se describen a continuación. Los experimentos se

realizaron por triplicado y los resultados obtenidos para las diferentes condiciones de cultivo se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) y Test de Tukey (Software Infostat). Los valores fueron considerados significativamente diferentes cuando  $P < 0.05$ .

### ***Punctularia atropurpurascens***

Se realizaron cultivos por triplicado en matraces con medio 1.25 % Extracto de Malta incubados a 28 °C durante 14 días, sin agitación o con agitación en shaker a 100 rpm. Además se evaluó por triplicado la actividad lectina en el extracto proveniente del cultivo en medio Yeast Nitrogen Base (YNB, Difco) suplementado con quitina, incubado en shaker a 100 rpm, a 28 °C durante 14 días.

### ***Pycnoporus sanguineus***

El cultivo se realizó por triplicado tanto en condiciones estáticas como con agitación (100 rpm) a 28 °C en medio 1.25 % Extracto de Malta. Se evaluaron algunas variaciones en los medios de cultivo. Se varió las fuentes de carbono y de nitrógeno y las incubaciones se realizaron a 28 °C sin agitación y durante 14 días. Los medios utilizados para estos ensayos fueron medio 1.25 % Extracto de Malta, medio Yeast Nitrogen Base (YNB) suplementado con fructosa, medio YNB suplementado con galactosa, medio Yeast Carbon Base (YCB, Difco) suplementado con amonio y medio YCB suplementado con nitrato. También se realizaron en paralelo cultivos a 25 °C y a 28 °C sin agitación durante 14 días en medio 1.25 % Extracto de Malta.

### ***Gymnopilus spectabilis***

El cultivo se realizó por triplicado tanto en condiciones estáticas como con agitación (100 rpm) a 28 °C en medio 1.25 % Extracto de Malta durante 14 días.

En todos los casos el micelio se trató en mortero con N<sub>2</sub> líquido y el polvo de micelio obtenido fue resuspendido en buffer 50 mM fosfato de sodio pH 7.4, suplementado con 0.15M NaCl (buffer fosfato salino PBS).

Luego de dos horas de incubación con agitación se filtró y centrifugó durante 30 minutos a 8.000 rpm. El sobrenadante obtenido se guardó para los análisis posteriores.

Además se utilizaron cuerpos de fructificación de los hongos *Gymnopilus spectabilis*, *Pycnoporus sanguineus* y *Ganoderma lucidum* obtenidos en Monte Nativo en colectas realizadas en nuestro país y de *Agaricus bisporus* disponible comercialmente. A partir de los mismos se prepararon extractos acuosos según se describe. Los cuerpos de fructificación se procesaron con buffer PBS pH 7.4. Se incubó por dos horas con agitación y posteriormente se centrifugó 60 minutos a 8.000 rpm. Los sobrenadantes se utilizaron como material de partida para los ensayos de actividad hemaglutinante.

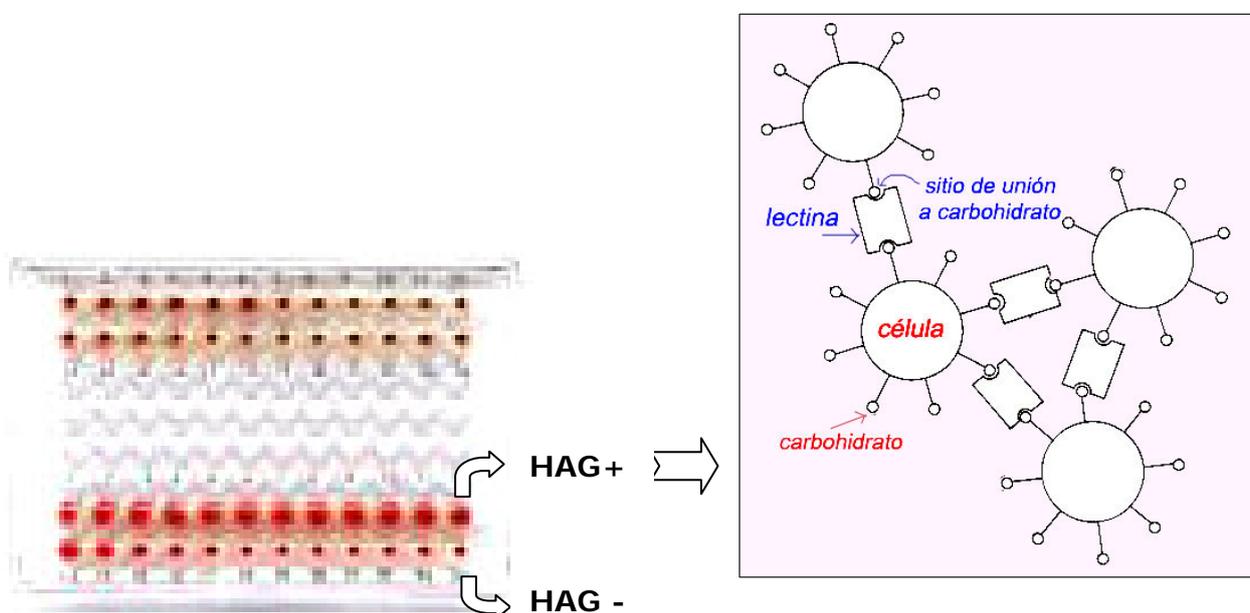
### **3.3. Análisis de los extractos fúngicos**

#### **3.3.1. Ensayo de actividad hemaglutinante (HAG)**

Se determinó la presencia de lectina en base a su capacidad de aglutinar glóbulos rojos animales. Para el ensayo de hemaglutinación (HAG) se utilizaron glóbulos rojos de ratón, oveja, conejo y de origen equino según el caso, obtenidos a partir de sangre fresca recogida con anticoagulante. Los glóbulos rojos se separaron por centrifugación suave a 4500 rpm durante 3 minutos y se lavaron 4 veces con buffer PBS. Luego se separaron los eritrocitos por centrifugación suave y se preparó una suspensión al 4 % (v/v) en PBS. En algunos casos se trató la suspensión de glóbulos rojos con una solución de tripsina (1 mg/ml) en PBS. Se incubó durante 1 hora a 37 °C, luego los glóbulos rojos se separaron por centrifugación suave a 4500 rpm durante 3 minutos y se lavaron 4 veces con buffer PBS. A partir de este pellet se prepararon las suspensiones al 4 % (v/v) en PBS.

Los ensayos de HAG se llevaron a cabo en microplacas de titulación de fondo redondo. 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 y 25  $\mu$ l de suspensión de glóbulos rojos al 4 %. Se mezcló por agitación suave y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se registraron como positivos aquellos pocillos en los que se observó aglutinación de los glóbulos rojos y negativos en los que se observó sedimentación fácilmente redispersable por agitación (Figura 3.1). Cada muestra se analizó por triplicado. En cada ensayo se incluyó como control positivo una solución de Con A y como control negativo buffer PBS.



**Figura 3.1. Ensayo de actividad hemaglutinante.**

La actividad HAG se estimó mediante la realización de este mismo ensayo sobre diluciones seriadas al medio de cada muestra. Se definió el título de lectina o unidad de lectina (UL) como el recíproco de la mayor dilución que da aglutinación visible de glóbulos rojos animales luego de 30 minutos de incubación. Se definió actividad hemaglutinante 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.

### **3.3.2. Ensayos de inhibición de HAG**

Se determinó la especificidad de unión de la lectina mediante un ensayo de inhibición de la HAG mediada por diferentes carbohidratos. Para estos ensayos se utilizó la concentración de lectina correspondiente a la HAG<sub>50%</sub>, definida como la correspondiente a la dilución de la muestra previa a la última que causa HAG visible. El ensayo se realizó siguiendo el mismo procedimiento que para el ensayo de actividad HAG, pero sustituyéndose 25 µl de 0.15 M NaCl por 25 µl del carbohidrato en estudio (en las concentraciones que se indican) y preparados en 0.15M NaCl. Se utilizaron los siguientes mono-, di-, y trisacáridos: 100 mM 1-amino-1-deoxi-β-D-galactosa, arabinosa, fructosa, ácido galacturónico, ácido glucurónico, glucosamina, Glc, glucosa-6P, ribosa, fucosa, galactosa (Gal), galactosilamina, manosa (Man), metil-D-manopiranosido, N-acetil-galactosamina (Gal-NAc), N-acetil-glucosamina (Glc-NAC), ramnosa, sorbitol, ácido N-acetil-neuramínico (identificado en el texto como ácido siálico), lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, 10 mM N-acetil-lactosamina, 7.9 mM sialilactosa, 25 mM quitobiosa, 18 mM quitotriosa. Se evaluaron glicosaminoglicanos como heparán sulfato y condroitín sulfato y polisacáridos como quitina y quitosano (2 mg/ml). También se utilizaron como haptenos glicoproteínas como eritropoyetina recombinante humana (Eprex de Janssen-Cilag, 33.6 µg/ml y de Claussen, Uruguay, 80 µg/ml), gonadotropina sérica aislada de suero de yeguas preñadas (PMSG, a partir de la sigla en inglés, pregnant mare serum gonadotropin) en concentración 4 mg/ml (glicoproteína donada por la empresa Syntex, Uruguay), ferritina (1 mg/ml), fetuina de suero fetal bovino (FT, 8 mg/ml), peroxidasa de rábano picante (HRP, 8 mg/ml), transferrina (TF, 8 mg/ml) y tiroglobulina bovinas (TG, 8 mg/ml). Las últimas 5 glicoproteínas mencionadas fueron adquiridas a Sigma. También

se utilizó la glicoproteína lactoferrina bovina (LF, 8mg/ml), la cual fue una donación de la empresa Murray Goulburn, Australia.

Eventualmente, se determinó la mínima concentración de carbohidrato capaz de inhibir la hemaglutinación. Para ello se utilizaron diluciones seriadas al medio del carbohidrato en estudio y una dilución de lectina correspondiente a la que causa un 50 % HAG (penúltima dilución seriada de la lectina que permite apreciar aglutinación visible, HAG<sub>50%</sub>). Se definió la concentración inhibitoria mínima (CIM<sub>HAG</sub>) como la mínima concentración de carbohidrato utilizada en el ensayo capaz de inhibir la HAG.

#### **Desialilación química de glicoproteínas**

Se realizó según (Franco Fraguas et al. 2003a). Se pesó 8.0 mg de las glicoproteínas LF, FT, TF, PMSG y TG y se agregó 500 µl de 0.2 N HCl. Para el caso de EPO se tomó una ampolla comercial conteniendo 500 µl (concentraciones 33.6 µg/ml o de 80µg/ml) y se procedió como en los otros casos. Se calentó en baño a 80 °C durante una hora, se enfrió hasta 25 °C y se neutralizó con 0.5M NaOH. Se gel filtró en columnas NAP-5 (Sephadex G-25).

#### **3.3.3. Determinación de la concentración de proteínas**

Para proteínas solubles, se determinó la concentración usando el método del ácido bicinónico (BCA) (Smith et al. 1985). Se incubaron 100 µl de una dilución apropiada de muestra con 2 ml de reactivo BCA durante 15 minutos a 60 °C. Se enfrió hasta temperatura ambiente y se registró la A<sub>560</sub> nm. Se realizó una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar en el rango de 0 – 0.3 mg/ml. Cada muestra se ensayó al menos por duplicado.

Para determinar concentración de proteínas inmovilizadas se utilizó la técnica del BCA optimizada (Giacomini et al. 1998). El derivado de Sepharose se lavó en placa con agua destilada y se escurrió el exceso de líquido por vacío. Se pesaron por triplicado alícuotas de 100.0 mg del gel

escurrido y se agregó 2ml de reactivo BCA, se incubó 15 minutos a 60 °C y se procedió como se describió anteriormente.

#### **3.3.4. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y reductoras (usando  $\beta$ -mercaptoetanol) utilizando geles homogéneos (PhastGel 12.5, GE Healthcare) y geles con gradiente (PhastGel Gradient 8-25, GE Healthcare). Las electroforesis se realizaron en equipo PhastSystem (Pharmacia, Uppsala, Suecia) según las especificaciones del fabricante. Las muestras a analizar fueron pretratadas de la siguiente forma: 25  $\mu$ L de la muestra se mezclaron con 25  $\mu$ L de buffer 10mM Tris/HCl pH 8.0, suplementado con 1 mM EDTA, 2 % SDS y 10% glicerol (sample buffer), 1  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol y 1  $\mu$ L de azul de bromofenol. La mezcla se calentó durante 5 minutos en baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar y se utilizó para el análisis. En la corrida electroforética se incluyeron estándares de peso molecular (14.4–97.0 kDa, GE Healthcare, Suecia) utilizando una mezcla de  $\alpha$ -lactalbúmina (14.4 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa), anhidrasa carbónica (30.4 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), seroalbúmina (67 kDa) y fosforilasa b (94 kDa). Las proteínas fueron visualizadas por tinción con plata siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

#### **3.3.5. Determinación de pI**

Se realizó mediante isoelectroenfoque (IEF) utilizando el mismo equipo Phast System. Las muestras se corrieron en geles Phast-Gel IEF 3-9 y se utilizó un kit de calibración de pI (3-9) como estándares. Los geles fueron revelados mediante tinción con plata de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante.

### **3.4. Purificación de las lectinas**

A continuación se describen las técnicas utilizadas en cada caso individual para la purificación de las 3 lectinas propuestas en esta tesis.

#### **3.4.1. Purificación de la lectina de *Punctularia atropurpurascens* (PAL)**

Se utilizaron extractos de micelio obtenidos luego de 14 días de fermentación a 28 °C, con agitación 100 rpm, en medio 1.25 % Extracto de Malta. La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad, usando cuatro adsorbentes diferentes, tres de ellos disponibles en el laboratorio (quitosan-, fetuin- y Glc-NAc-Sepharose). Para estos casos se aplicaron 2 ml de extracto a cada columna (diámetro 1.5 cm, alturas 1.8, 2.5 y 2.5 cm, respectivamente) empaquetada con el adsorbente. El material no adsorbido fue recolectado y la columna se lavó con buffer PBS hasta no detectar HAG ni UA<sub>280</sub> nm en las fracciones. Se realizó elución competitiva usando 0.1 M Glc-NAc colectándose fracciones de 2 ml las cuales fueron gel filtradas en columnas pd-10 (Sephadex G-25) y usadas para posteriores análisis.

El otro adsorbente de afinidad ensayado lo constituyó una quitina insoluble, siendo el propio soporte el ligando de afinidad. Se tomó 0.5 g de quitina, se suspendió en 4 ml de PBS y la suspensión se filtró en placa filtrante. Se pesaron 0.2 g de soporte hinchado, el cual se trató con exceso de buffer PBS y dicha suspensión se pasó a columna (diámetro 1 cm) dejando sedimentar por gravedad. Se aplicó 3 ml de extracto de micelio gel filtrado y se dejó en contacto toda la noche. Se lavó la columna con PBS y la elución se realizó con fracciones de 1 ml de ácido acético 0.2 M, recogidas en tubos con 2 ml de PBS para neutralizar. En cada fracción eluída se realizó ensayo de HAG y aquellos con actividad de lectina fueron unidos, liofilizados y resuspendidos en 0.5 ml de PBS para análisis electroforéticos.

### **3.4.2. Purificación de la lectina de *Pycnoporus sanguineus***

Se utilizaron dos estrategias de purificación: una mediante cromatografía de intercambio iónico y otra mediante estrategias de afinidad. Los extractos aplicados en todas los ensayos de purificación que se describen a continuación provienen de micelio del hongo *Pycnoporus sanguineus* crecido en cultivo estático, en medio 1,25 % Extracto de Malta, a 28 °C y durante 14 días de fermentación.

#### **Purificación mediante cromatografía de intercambio iónico**

Se preparó un columna de DEAE-Cellulose (diámetro 1.5 cm) empaquetada con 3.0 ml de gel. Se aplicaron 7 ml de un pool de extractos de micelio. El material no adsorbido fue recolectado y la columna se lavó con buffer PBS hasta no detectar HAG ni UA<sub>280</sub> nm en las fracciones. Se eluyó con 0.5 M NaCl recogándose fracciones de 3 ml y aquellas con actividad HAG fueron unidas, dializadas exhaustivamente contra agua destilada durante 24 hs y luego liofilizadas.

#### **Purificación mediante estrategias de afinidad**

Se sintetizaron los adsorbentes Manosil-Sepharose (Man-Sepharose) y Galactosil-Sepharose (Gal-Sepharose) mediante inmovilización covalente del ligando en Sepharose (Franco Fraguas *et al.* 2003b). Para ello el soporte (Sepharose-4B) se lavó con agua destilada en placa filtrante mediante vacío. El gel escurrido se suspendió en 4M NaOH, se agregó epiclorhidrina en exceso y una punta de espátula de borohidruro de sodio y se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se lavó el gel con 2M NaOH y luego con 0.5 M NaOH. El gel escurrido se incubó con la solución del carbohidrato correspondiente a inmovilizar (20 % de Man o Gal en 0.5 M NaOH). La suspensión se incubó con agitación suave a temperatura ambiente durante toda la noche. El gel se lavó en placa filtrante con solución de 0.5 M NaOH. Los grupos epóxido activos remanentes se bloquearon con  $\beta$ -

mercaptoetanol incubando con agitación durante 1-2 horas a temperatura ambiente. El gel se lavó con 0.5 M NaOH, agua destilada y PBS.

Se aplicaron 3 ml de un pool de extractos de micelio de *Pycnopus sanguineus* a una columna de Man-Sepharose (diámetro 1 cm, altura 1 cm). Se recogió el material no adsorbido y la columna se lavó con buffer PBS hasta no detectar HAG ni UA<sub>280</sub> nm. Se eluyó con 0.1 M manosa en PBS, recogándose fracciones de 1 ml.

En otro experimento se aplicaron 18 ml de un nuevo pool de extractos a la columna de Man-Sepharose. El material no adsorbido fue recolectado y la columna fue lavada con buffer PBS hasta no detectar HAG ni UA<sub>280</sub> nm en las fracciones. Se eluyó con 0.1 M de metilmanósido, las fracciones se gel filtraron en columnas pd-10 (Sephadex G-25) y se realizaron los análisis correspondientes.

El material recuperado en el percolado y lavados anteriores fueron aplicados a una columna de Gal-Sepharose (diámetro 1 cm, altura 2 cm). El material eluído fue gel filtrado como se describió anteriormente.

Finalmente, se empleó una estrategia de afinidad para la purificación de la lectina mediante el uso de nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas con Gal. Esta parte del trabajo se realizó en el marco de una pasantía en el Instituto de Nanociencia de Aragón, Zaragoza, España.

#### **Funcionalización de las MNPs con Galactosa**

Las MNPs utilizadas para el ensayo de purificación fueron de origen comercial (Ademtech o Chemicell), de 200 nm de diámetro y con grupos carboxilos en la superficie.

Se ensayaron diferentes condiciones de activación para la funcionalización de MNPs (Carboxyl Adembeads, *Ademtech*) con 4-aminofenil-galactosa (Sigma). La activación se realizó utilizando hidroclicloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC).

Para obtener una alta densidad de ligando pero sin producir la agregación de las nanopartículas se utilizaron diferentes concentraciones de EDC y NHS para la activación (Tabla 3.1).

Para cada ensayo se incubó 1 mg de las MNPs con 90  $\mu$ l de 10 mM buffer ácido 2-(*N*-morfolino)etano sulfónico pH 6 (buffer MES), 5  $\mu$ l de NHS y 5  $\mu$ l de EDC. Se incubó 20 minutos con agitación a 37°C. Se centrifugó 1 min a 13.400 rpm y rápidamente se separó el sobrenadante. Se lavó 2 veces con 200  $\mu$ l buffer MES y se agregó 100  $\mu$ l de 4-aminofenil-galactosa (2.1 mg/ml) en buffer MES. Se incubó durante dos horas con agitación a 37°C. Se realizó un ensayo en paralelo incubando 100  $\mu$ l de 4-aminofenil-galactosa sin MNPs. Se centrifugó y en los sobrenadantes se determinó la concentración de 4-aminofenil-galactosa no unida a las MNPs, mediante el método del fenol sulfúrico (Dubois et al. 1956). A partir de solución stock de 4-aminofenil-galactosa (400  $\mu$ g/ ml) se realizó curva de calibración en el rango de concentración 0 - 60  $\mu$ g/ ml. Se tomó 1 ml de solución de la muestra, el blanco (agua destilada) ó solución estándar en tubos de ensayo, se agregó 0.5 ml de 5 % fenol y rápidamente 2.5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se llevó a vortex y se dejó reposar 10-15 minutos, se incubó en baño de agua a 30 °C por 15 minutos y se midió la  $A_{492}$  nm.

**Tabla 3.1. Optimización de funcionalización de MNPs con galactosa aminada**

EDC ( $\mu$ mol)	NHS ( $\mu$ mol)	Galactosa aminada ( $\mu$ mol)
1.25	1.875	7.5
2.5	3.75	7.5
2.5	3.75	3.75
5	7.50	3.75

Una alícuota de las MNPs glicosiladas (contenidas en el precipitado) fue utilizada para determinar el potencial Z (medida de la carga superficial de las MNPs) y el resto se lavó con buffer para su posterior utilización en el ensayo de purificación de la lectina. Las medidas del potencial Z se realizaron a 25 °C con el equipo Brookhaven Zeta PALS. Los valores obtenidos para cada muestra fueron el promedio de diez medidas.

En otro experimento se repitió el ensayo de funcionalización descrito anteriormente (5  $\mu\text{mol}$  EDC y 7.5  $\mu\text{mol}$  NHS en 10 mM buffer MES pH 6 ) pero la unión del ligando Gal se realizó a pH 8 (7.5  $\mu\text{mol}$  4-aminofenil-galactosa). Nuevamente, una alícuota de las MNPs glicosiladas (contenidas en el precipitado) fue utilizada para determinar el potencial Z.

En un tercer experimento se utilizaron las MNPs de Chemicell descritas anteriormente. La funcionalización se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito para las MNPs de Ademtech bajo las siguientes condiciones: 5  $\mu\text{mol}$  EDC y 7.5  $\mu\text{mol}$  NHS en buffer MES pH 6 y 7.5  $\mu\text{mol}$  de 4-aminofenil-galactosa en 10 mM buffer bicarbonato pH 8.5.

#### **Purificación de la lectina con Gal-MNPs**

Se utilizó un pool de extractos de micelio de *Pycnoporus sanguineus* (volumen total: 25 ml) liofilizado, obtenido en las condiciones previamente descritas (cultivo estático, en medio 1.25 % Extracto de Malta, a 28 °C).

En el primer ensayo de purificación se incubó 1 mg de Gal-MNPs (Ademtech, obtenidas a pH 8) con 135  $\mu\text{l}$  de extracto de micelio (15 mg de liofilizado resuspendido en PBS) durante dos horas a 37°C. Se centrifugó 5 min a 13400 rpm, se guardó el sobrenadante y el precipitado, conteniendo Gal-MNPs, se lavó 2 veces con buffer MES y se eluyó por competencia con Gal (25 mg en 200  $\mu\text{l}$  de MES); se incubó toda la noche, se centrifugó durante 5 min a 13400 rpm y se separó el sobrenadante (fracción eluida).

Se repitió el procedimiento de purificación pero con las siguientes modificaciones: se utilizaron las MNPs de Chemicell funcionalizadas con Gal, se realizaron tres lavados con 500  $\mu$ l buffer PBS 0.1% Tween 100mM NaCl y se realizaron dos eluciones con 0.2 y 0.5 M Gal.

En ambos casos se realizó SDS-PAGE en condiciones reductoras (con  $\beta$ -mercaptoetanol) y utilizando geles con gradiente (8-25). Las muestras a analizar fueron pretratadas de la siguiente forma: 40  $\mu$ L de la muestra se mezclaron con 10  $\mu$ L de buffer de ruptura y se calentó durante 5 minutos en baño de agua a ebullición. Se dejó enfriar y se sembraron 20  $\mu$ l de cada muestra para el análisis. En la corrida electroforética se incluyeron estándares de peso molecular (10–260 kDa, ProSieve, USA). Las proteínas fueron visualizadas por tinción con plata.

### **3.4.3. Purificación de la lectina de *Gymnopilus spectabilis***

En este caso se utilizaron dos estrategias cromatográficas: cromatografía de afinidad (Man-Sepharose) e Intercambio iónico (DEAE-Cellulose).

La columna de Man-Sepharose (diámetro 1 cm) fue empaquetada con 12 ml de adsorbente y equilibrada con buffer PBS. Se aplicaron 150 ml del extracto clarificado de *Gymnopilus spectabilis* con bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 42.0 ml/h. Se lavó con PBS y se eluyó con 0.1 M de Man en PBS. Se recolectaron fracciones de 4 ml y se gel filtraron en columna pd-10 (Sephadex G-25). Las fracciones con actividad HAG fueron unidas y analizadas mediante electroforesis.

Para la cromatografía de intercambio iónico se hinchó DEAE-Cellulose (17.0 g) en agua destilada durante 24 horas a temperatura ambiente y luego se equilibró con buffer PBS. Se filtró por vacío y el gel se mezcló con 350 ml de extracto de *G. spectabilis* en un procedimiento en batch (agitación en shaker a 100 rpm durante 2 horas). La suspensión se filtró en placa, guardándose el percolado. El gel se lavó con buffer PBS y se realizó la elución incrementando la fuerza iónica con buffer PBS

suplementado con 1M NaCl. Se recogieron 3 fracciones y se realizó precipitación salina con sulfato de amonio (60 % de saturación) de las mismas. Se centrifugó a 5000 rpm durante 1 hora y el precipitado se resuspendió en PBS.

Se repitió el procedimiento con una nueva alícuota de extracto crudo de *G. spectabilis* pero en este caso las fracciones eluidas fueron liofilizadas, resuspendidas en un mínimo volumen de agua destilada, dializadas contra agua destilada y nuevamente liofilizadas.

En todos los casos, las fracciones fueron usadas para análisis electroforético (SDS-PAGE) y HAG.

### **3.5. Especificidad de GSL por carbohidratos**

Se determinó la especificidad de unión a carbohidratos de GSL mediante ensayos de inhibición de HAG utilizando el mismo panel de carbohidratos previamente descrito para el ensayo con el extracto crudo.

### **3.6. Contenido en carbohidratos de la lectina**

Se estimó utilizando un kit comercial para determinación de carbohidratos en glicoproteínas (Pierce, Rockford, IL). Se usaron lisozima y seroalbúmina bovina como controles negativos y ovoalbúmina, apotransferrina humana, fetuina y glicoproteína  $\alpha_1$ -ácida como glicoproteínas estándar. Las muestras de GSL purificada fueron analizadas a 0.25 y 2.5 mg/ml como se indica en el kit.

### **3.7. Inmovilización de lectinas fúngicas**

Las lectinas purificadas PAL y PSL fueron usadas como ligandos de afinidad e inmovilizadas covalentemente a través de los grupos amino a NHS-activated-Sepharose 4B (GE Healthcare), según el protocolo del fabricante. Para ello se colocó 1 g de NHS-activated-Sepharose en columna pd-10 vacía, se lavó con 6 ml de 1mM de HCl (pre-enfriado a 4 °C) y se escurrió con vacío. Se disolvió la muestra de lectina liofilizada en 4 ml de buffer 0.2M NaHCO<sub>3</sub> 0.5 M NaCl pH 8.3 (coupling buffer), se

agregó al gel escurrido y se incubó una hora a temperatura ambiente. Se lavó en forma alternada con porciones de 6ml de buffer 0.5M Etanolamina 0.5M NaCl pH 8.3 y de buffer 0.1M Acetato 0.5M NaCl pH 4.0, repitiéndose 3 veces estos lavados alternados. Finalmente se lavó con 6 ml de agua destilada, se escurrió por vacío, se separaron 100 mg de gel para análisis de proteínas y el resto del gel se lavó con buffer PBS y se guardó hasta su uso.

La lectina de *Gymnopilus spectabilis* fue también inmovilizada covalentemente a Sepharose 4B activada con reactivo tetrafluoro borato de 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP) (Franco Fraguas *et al.* 2003c). Se lavó 3 g de Sepharose con agua destilada, luego con acetona:agua (3:7) y finalmente con acetona:agua (6:4). Se drenó el gel por vacío y se transfirió 3 g de gel escurrido a un matraz. Se agregó 3 ml de acetona: agua (6:4), se mantuvo la mezcla en baño de hielo. Se agregó solución de CDAP (75 mg en 2ml de acetona: agua) bajo agitación vigorosa durante 3 minutos. Se agregó 360  $\mu$ l de la solución de 0.2M Trietilamina (TEA) durante 2 minutos. Se dejó reaccionar durante 3 minutos y se transfirió rápidamente a un matraz conteniendo 50 ml de 0.05 M de HCl previamente enfriado. Se pasó a placa filtrante y lavó el gel con agua destilada fría. El gel activado lavado y escurrido se suspendió en la solución de lectina (en 0.1M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3) y se mezcló por rotación durante 4 horas a temperatura ambiente. El gel se lavó con 50 ml de buffer 0.1M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.3, 50 ml de agua destilada, se separó una alícuota para determinación de proteína inmovilizada y el resto se suspendió en buffer PBS y se guardó hasta su uso.

El contenido de lectina inmovilizada se determinó utilizando el método del BCA optimizado (Giacomini *et al.* 1998) como se describió anteriormente.

### **3.8. Interacciones entre glicoproteínas y lectinas fúngicas inmovilizadas**

Se prepararon mini-columnas de vidrio empaquetadas con los adsorbentes de afinidad sintetizados (con aproximadamente 0.40 a 0.60 ml de gel sedimentado): PAL-Sepharose, GSL-Sepharose y PSL-Sepharose. Se aplicaron a las mismas 200  $\mu$ l de soluciones de las glicoproteínas FT, LF, TF, TG, PMSG y EPO. En cada corrida cromatográfica se lavó con PBS y las glicoproteínas adsorbidas se eluyeron con soluciones de los monosacáridos específicos según la lectina fúngica inmovilizada, o alternativamente se realizó elución inespecífica con 0.2 M ácido acético. La presencia de proteína en cada fracción de las cromatografías se siguió espectrofotométricamente mediante A280<sub>nm</sub>. En el caso de PAL-Sepharose se evaluaron las glicoproteínas PMSG, FT, LF y EPO. Se lavó con PBS y se eluyó por competencia con 0.1 M GlcNAc. En el caso de PSL-Sepharose se prepararon en paralelo dos mini-columnas empaquetadas con derivados provenientes de 2 lotes de inmovilización. En una de ellas se realizó elución específica con 0.1 M Man y en la otra se realizó elución inespecífica con 0.2 M ácido acético. Se evaluaron en este caso las glicoproteínas LF, PMSG, FT y TF. Finalmente, con GSL-Sepharose se realizaron varias cromatografías, eluyendo en algunos casos con 0.1 M Man y en otros casos con 0.2 M ácido acético como se describió anteriormente y se evaluaron las glicoproteínas: LF, PMSG, FT, asialo-LF y asialo-TF.

### **3.9. Interacciones entre gliconanopartículas y GSL**

Estos estudios se realizaron en el marco de una pasantía en el Instituto de Nanociencia de Aragón, Zaragoza, España.

#### **Funcionalización de las MNPs**

La funcionalización se realizó con 4-amino-manosa sintetizada en el Instituto de Nanociencia de Aragón y con 4-aminofenil-glucosa de origen

comercial (Sigma). Se incubó 0.5 mg de MNPs con 13.9 mg de EDC (adicionado en fracciones cada 15 minutos), 2.5 mg de 4-aminofenilglucosa o 4-amino-manosa en 250  $\mu$ l de 50 mM ácido bórico y 50 mM borato de sodio pH 9 (SSB buffer), durante dos horas. El exceso de ligando se separó por centrifugación durante 1 min a 13.400 rpm utilizando centricones (50 kDa cut off) (Moros *et al.* 2010). El mismo procedimiento se empleó para el lavado con buffer PBS.

Se realizó electroforesis en geles de agarosa (2%) preparados en buffer 0.5X tris-borato-EDTA (TBE). Para la preparación de las muestras se mezclaron 80  $\mu$ l de MNPs o Man-MNPs en agua con 20 ml de glicerol:TBE (1:4). La corrida electroforética se realizó a 80 V durante 30 minutos.

### **Estudios de agregación entre las glico-MNPs y GSL**

Se estudió la agregación entre las MNPs glicosiladas y la lectina mediante medidas del tiempo de relajación de los protones del agua ( $T_2$ ) a distintos tiempos de incubación, en un relaxómetro (Bruker Minispec). Para ello se diluyeron las MNPs glicosiladas control en PBS hasta lograr una relajatividad inicial en torno a 200 mS ( $T_2$ ). Se añadieron 5  $\mu$ l de solución de lectina en PBS (6.6  $\mu$ g de lectina) a 350  $\mu$ l de Man-MNPs y Glc-MNPs y se midió  $T_2$  en función del tiempo.

### **3.10. Actividad antimicrobiana *in vitro* de las lectinas fúngicas**

Para estos ensayos se utilizaron tanto los extractos fúngicos de partida como las lectinas purificadas (PAL, GSL y PSL) y se utilizaron métodos de difusión en agar y determinación de concentración inhibitoria mínima.

Se evaluaron las siguientes muestras, todas con actividad HAG positiva: a) extractos acuosos de micelios de *Punctularia atropurpurascens*, b) lectina de *P. atropurpurascens* purificada mediante cromatografía de afinidad en quitosan-Sepharose, c) extractos acuosos de

micelios de *Pycnoporus sanguineus*, d) lectina de *P. sanguineus* purificada mediante cromatografía de afinidad en Man-Sepharose, e) lectina de *P. sanguineus* purificada mediante cromatografía de afinidad en Gal-Sepharose, f) lectina de *P. sanguineus* purificada mediante cromatografía de intercambio iónico, g) extractos acuosos de cuerpos de fructificación de *Gymnopilus spectabilis*, h) lectina de *G. spectabilis* purificada mediante cromatografía de intercambio iónico.

### **3.10.1. Microorganismos evaluados y condiciones de cultivo**

Los microorganismos testeados en este estudio fueron *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11105), *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Aspergillus niger* (ATCC 16404). En el caso de *S. aureus* y *E. coli*, fueron cultivados 24 horas a 35 °C en sangre agar base (Difco) mientras que los hongos y levaduras fueron cultivados a 28 °C en Sabouraud agar (Oxoid), 48 y 24 horas, respectivamente.

### **3.10.2. Estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* mediante ensayo de difusión en agar**

A partir de colonias de bacterias (*S. aureus* y *E. coli*) se preparó una suspensión en suero fisiológico cuya turbidez correspondió a MacFarland Nº 1 y se adicionó 1.0 ml de esta suspensión a 100 ml of Müeller-Hinton agar (Oxoid). En el caso de la levadura *C. albicans* la suspensión correspondió a MacFarland Nº 3 y se adicionó 1 ml de dicha suspensión a 100 ml de Sabouraud agar. Para hongos filamentosos (*A. niger*) se adicionó una suspensión de conidias a 100 ml de Sabouraud agar para dar una concentración final de  $1 \times 10^5$  conidias por ml de medio.

Las muestras (extractos fúngicos o lectinas purificadas) fueron aplicadas puntualmente (50 µl) en placas de TLC (ALUGRAMR SIL G Macherey-Nagel). Como controles positivos se utilizaron Gentamicina (100 µg/ml) y Nistatina (100 UI) para bacterias y hongos, respectivamente. Las placas de TLC se colocaron en placas de Petri, se cubrieron con 15 ml de medio inoculado con el microorganismo a ensayar

(Rahalison et al. 1991) y se incubó a 35 °C durante 24 horas para *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* y 28 °C durante 48 horas para *A. niger*. Luego de la incubación se adicionó 0.1 % 2,3,5-cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) para bacterias y levaduras y se incubó 1 hora a 35 °C. Se observó la presencia de halos de inhibición del crecimiento.

### **3.10.3. Concentración inhibitoria mínima (CIM<sub>m</sub>)**

Para aquellas soluciones de lectinas que causaron inhibición del crecimiento en los ensayos de difusión en agar (produjeron halos de inhibición), se determinó la concentración inhibitoria mínima (mínima concentración a la cual no se produce crecimiento microbiano) mediante la técnica de microdilución, en microplacas de titulación de fondo plano. Para ello las muestras se liofilizaron y se retomaron en agua destilada (10 mg/ml). Para el ensayo se utilizaron 100 µl de caldo Mueller-Hinton, 100 µl de solución de lectina y 10 µl de una suspensión del microorganismo (10<sup>8</sup> microorganismos/ml). Las microplacas se incubaron a 35 °C durante 24 horas para bacterias y *C. albicans* y a 28 °C durante 48 horas para *A. niger*. Como controles se realizaron ensayos con 100 µl de caldo Mueller-Hinton, 100 µl de agua estéril, con o sin 10 µl de cada suspensión.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Relevamiento de lectinas en hongos basidiomicetes

La mayoría de las cepas fúngicas analizadas provienen de colectas realizadas en montes naturales o cultivados en nuestro país. Se realizó un relevamiento de lectinas en extractos preparados a partir de micelio o cuerpos de fructificación de 23 cepas de hongos. La actividad HAG se determinó utilizando eritrocitos de ratón y de oveja.

Como resultado, los extractos de los hongos *Abortiporus biennis*, *Coriolus sp.*, *Ganoderma lucidum*, *Ganoderma resinaceum*, *Phanaerochaete chrysosporium*, Poliporacea y *Pycnoporus sanguineus* causaron HAG de eritrocitos de ratón pero no de oveja (Tabla 4.1). Con los extractos de *Gymnopilus spectabilis* ocurrió lisis de los glóbulos rojos por lo que se realizó una gel filtración de los extractos en columnas comerciales pd-10 (Sephadex G-25). Mediante esta estrategia, si los componentes del extracto responsables de la lisis son moléculas de peso molecular menores a 5000 Da (límite de exclusión del Sephadex G-25), se lograría visualizar el resultado de la HAG. En este caso, luego de la gel filtración, se observó HAG positiva frente a eritrocitos de ratón y HAG negativa frente a eritrocitos de oveja, mostrando que la gel filtración en pd-10 fue efectiva para levantar la lisis. Los extractos de *Pleurotus djmour* y *Punctularia atropurpurascens* causaron HAG tanto frente a eritrocitos de ratón como de oveja (Tabla 4.1). Adicionalmente, se realizó un tratamiento de los glóbulos rojos de oveja con solución de tripsina. Este tratamiento en general aumenta la sensibilidad de los eritrocitos (Wang y Ng 2003), pero en este caso, se obtuvieron los mismos resultados negativos de HAG con los extractos ensayados.

**Tabla 4.1. Actividad HAG en extractos fúngicos.**

Extracto fúngico	Proteínas (mg / ml)	HAG	
		O	R
<i>Abortiporus biennis (m)</i>	2.8	-	+
<i>Agaricus bisporus (cf)</i>	2.5	+	+
<i>Bjerkandera adusta (m)</i>	3.1	-	-
<i>Coriolus sp. (m)</i>	3.4	-	+
<i>Corticiacea (m)</i>	5.4	-	-
<i>Ganoderma lucidum (cf)</i>	1.0	-	+
<i>Ganoderma resinaceum (m)</i>	3.6	-	+
<i>Grifola frondosa (m)</i>	1.0	+	+
<i>Gymnopilus spectabilis (cf)</i>	2.0	lisis, -	lisis,+
<i>Gymnopilus spectabilis (m)</i>	3.6	lisis, -	lisis,+
<i>Gymnopilus sp. (m)</i>	4.3	-	-
<i>Impicoides sp. (m)</i>	2.1	-	-
<i>Inocutis jamaicensis (m)</i>	7.0	-	-
<i>Inonotus sp. (m)</i>	6.5	-	n.d.
<i>Lentinula edodes (m)</i>	1.5	-	n.d.
<i>Phanaerochaete chrysosporium (m)</i>	1.5	-	+
<i>Pleurotus djmour (m)</i>	1.0	+	+
<i>Pleurotus ostreatus (m)</i>	2.1	lisis	+
Poliporacea (m)	0.8	-	+
<i>Punctularia atropurpurascens(m)</i>	2.8	+	+
<i>Pycnoporus sanguineus (cf)</i>	0.7	-	+
<i>Pycnoporus sanguineus (m)</i>	2.0	-	+
<i>Trametes versicolor (m)</i>	5.0	-	-

O: GR de oveja; R: GR de ratón, n.d.: no determinado  
(m): micelio, (cf): cuerpo de fructificación  
(+) indica HAG positiva; (-) indica HAG negativa.

Los extractos de *Phanaerochaete chrysosporium*, *Punctularia atropurpurascens* y *Pycnoporus sanguineus* fueron también evaluados frente a eritrocitos de conejo, observándose HAG positiva.

Para los 15 extractos acuosos que dieron HAG positiva frente a eritrocitos de ratón, se determinó la actividad HAG específica, expresada como unidades de lectina por mg de proteína (Tabla 4.2).

De acuerdo a la bibliografía la detección de la lectina de *A. bisporus*, una de las primeras lectinas fúngicas reportadas, se realizó a partir de cuerpos de fructificación y utilizando eritrocitos humanos en el ensayo de HAG; en estas condiciones se detectó una actividad específica de 67 UL/mg de proteína (Presant y Kornfeld 1972). Los ensayos de actividad HAG en esta tesis se realizaron con extracto de micelio del hongo *A. bisporus* y utilizando eritrocitos de ratón; en estas condiciones la actividad específica fue de 128 UL/mg de proteína (Tabla 4.2).

Los ensayos de HAG realizados con extracto de micelio del hongo *Grifola frondosa* dieron resultados de HAG positiva tanto con eritrocitos de ratón (40 UL/mg de proteínas) como de oveja. De acuerdo a la bibliografía consultada, la presencia de lectinas en cuerpos de fructificación y micelio de este hongo se detectó mediante HAG frente a eritrocitos de conejo y humanos (Nagata *et al.* 2005; Stepanova *et al.* 2007); la actividad específica detectada con eritrocitos de conejo para el extracto de micelio fue de 3 UL/mg de proteína. Los valores superiores de actividad específica obtenidos en esta tesis sugieren una mayor sensibilidad del ensayo de HAG utilizando eritrocitos de ratón para la lectina de este hongo. El extracto de micelio de *Pleurotus ostreatus* causó lisis de eritrocitos de oveja y luego de gel filtrado, la HAG fue negativa. Sin embargo, dicho extracto aglutinó eritrocitos de ratón con una actividad específica de 31 UL/ mg de proteína (Tablas 4.1 y 4.2). Si bien se ha reportado el aislamiento y purificación de una lectina por este

hongo, la detección de actividad HAG se realizó con extractos de cuerpo de fructificación y utilizando eritrocitos humanos y de conejo; dados los fenómenos de lisis que también se reportaron, no se indican en dicho trabajo los valores de actividad específica (Conrad y Rudiger 1994).

La actividad de lectina específica frente a eritrocitos de ratón en extractos provenientes de cuerpos de fructificación de *Ganoderma lucidum* fue de 80 UL/ mg proteína. Aunque ya se ha publicado la presencia de lectinas provenientes de micelio y cuerpo de fructificación de este hongo, los ensayos de HAG se realizaban con una fuente de eritrocitos diferente (humanos); la actividad específica con eritrocitos humanos fue de 1000 UL/mg en cuerpos de fructificación (Kawagishi *et al.* 1997; Thakur *et al.* 2007).

Se observa que de todos los extractos analizados, los tres que presentaron mayor actividad de lectina específica fueron los correspondientes a los hongos *Punctularia atropurpurascens*, *Pycnoporus sanguineus* y *Gymnopilus spectabilis*. De acuerdo a la bibliografía consultada, no se encontraron reportes acerca de la descripción de lectinas en estas especies fúngicas, por lo que estas tres cepas se seleccionaron para el presente trabajo de tesis como fuentes productoras de nuevas lectinas. Para estas tres especies fúngicas se analizaron extractos acuosos preparados a partir de micelio, de cuerpo de fructificación y de extractos extracelulares. De todos los extractos ensayados, el proveniente de micelio de *P. atropurpurascens* fue el que presentó mayor actividad HAG específica siendo muy baja para el extracto extracelular del mismo hongo (50 UL/ mg proteína). Los extractos provenientes de cuerpo de fructificación de *P. sanguineus* y *G. spectabilis* presentaron mayor actividad específica que los provenientes de micelio (Tabla 4.2). A su vez, los extractos extracelulares provenientes de estos dos hongos no presentaron actividad HAG frente a eritrocitos de ratón. El cultivo de *G. spectabilis* se realizó tanto en condiciones estáticas como

con agitación (100 rpm); en condiciones estáticas no se obtuvo actividad HAG. La actividad de lectina de extractos de de *P. sanguineus* fue además determinada utilizando eritrocitos equinos; los títulos obtenidos fueron superiores a los alcanzados con los glóbulos rojos de ratón. Por este motivo para los ensayos de HAG que se describen a continuación, realizados con extractos provenientes de este hongo, se utilizaron eritrocitos equinos o de ratón, indicado para cada ensayo particular.

**Tabla 4.2. Actividad hemaglutinante específica (AHE) de extractos fúngicos frente a eritrocitos de ratón.**

Extracto fúngico	Proteínas (mg / ml)	HAG (UL / ml)	AHE (UL / mg prot.)
<i>Abortiporus biennis</i> (m)	2.8	40	14
<i>Agaricus bisporus</i> (m)	2.5	320	128
<i>Coriolus sp.</i> (m)	3.4	40	12
<i>Ganoderma lucidum</i> (cf)	1.0	80	80
<i>Ganoderma resinaceum</i> (m)	3.6	320	89
<i>Grifola frondosa</i> (m)	1.0	40	40
<i>Gymnopilus spectabilis</i> (cf)	2.0	320	159
<i>Gymnopilus spectabilis</i> (m)	3.6	160	44
<i>Phanaerochaete chrysosporium</i> (m)	1.5	80	53
<i>Pleurotus djmour</i> (m)	1.0	80	80
<i>Pleurotus ostreatus</i> (m)	2.6	80	31
Poliporacea (m)	0.8	80	100
<i>Punctularia atropurpurascens</i> (m)	2.9	1280	441
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (m)	2.0	160	80
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (cf)	0.7	160	229

(m): micelio, (cf): cuerpo de fructificación.

## 4.2 Especificidad por carbohidratos

La hemaglutinación *per se* es un fenómeno inespecífico, por lo que para poder atribuirlo a la presencia de lectinas, se recurre a ensayos de inhibición de la HAG mediada por carbohidratos, como se explicó previamente (Introducción). Para realizar este estudio se seleccionaron los extractos de cada hongo que presentaban mayor actividad HAG específica (AHE): micelio, para el caso de *Punctularia atropurpurascens* y cuerpos de fructificación para los casos de *Pycnoporus sanguineus* y *Gymnopilus spectabilis*. Se investigó la especificidad de las actividades de lectinas detectadas en los extractos fúngicos utilizando un panel de mono-, di-, tri- y algunos polisacáridos. Los resultados se resumen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Efecto de los carbohidratos sobre la HAG de extractos fúngicos

<i>Carbohidratos</i>	Resultado de la HAG*		
	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	<i>Punctularia atropurpurascens</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
ácido glucurónico	-	+	-
glucosamina	+	+	-
Glc	+	-	+
Glc-6P	+	+	+
sorbitol	n.d.	-	n.d.
Glc-NAc	+	-	-
trehalosa	-	-	-
quitobiosa	+	-	-
quitotriosa	+	-	+
qitosano	n.d.	-	n.d.

Resultado de la HAG*				
<i>Carbohidratos</i>	<i>Gymnopilus spectabilis</i>	<i>Punctularia atropurpurascens</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	
1-amino-1-deoxi-Gal	+	+	-	
ácido galacturónico	-	+	-	
fucosa	+	+	-	
Gal	+	+	-	
galactosilamina	-	+	-	
Gal-NAc	+	+	+	
melibiosa	-	+	-	
lactosa	-	+	-	
N-acetil-lactosamina	-	-	-	
sialillactosa	-	-	-	
Man	-	+	-	
metil-D-manopiranosido	-	+	-	
ramnosa	+	+	-	
fructosa	+	+	+	
sacarosa	+	+	-	
rafinosa	+	+	-	
ácido siálico (Neu5ácido)	-	+	n.d.	
Arabinosa	+	+	-	
ribosa	+	+	-	
condroitin-sulfato	+	-	+	
heparan-sulfato	n.d.	-	-	

\*Eritrocitos de ratón

Resultado de HAG (+): indica que no inhibe.

Resultado de HAG (-): indica que inhibe.

n.d.: no determinado.

### ***Punctularia atropurpurascens***

Se observa que la actividad de lectina presente en el extracto de micelio de *Punctularia atropurpurascens* es inhibida por Glc-NAC y sus formas poliméricas, la quitobiosa, quitotriosa y el quitosano. Se determinó la CIM<sub>HAG</sub> como se describió en Materiales y Métodos (correspondiente a una concentración de lectina de 400 UL/ml) y la misma fue de 36 mM para Glc-NAC y 3 mM para quitotriosa. Esto indica que la forma oligosacáridica es mejor reconocida por la lectina que el monosacárido correspondiente. La actividad HAG también es inhibida por Glc, sorbitol y el disacárido trehalosa, pero no por el ácido glucurónico lo que sugiere que el grupo OH en el C6 estaría involucrado en la interacción lectina-carbohidrato (Figura 4.1). Además los glicosaminoglicanos heparán sulfato y condroitín sulfato también inhibieron la HAG. El reconocimiento del heparán sulfato puede deberse a la Glc-NAC presente en su estructura; sin embargo no se explica la inhibición producida por condroitín sulfato. El monosacárido Gal y los carbohidratos relacionados galactosilamina, ácido galacturónico, fucosa y Gal-NAC no produjeron inhibición de la HAG cuando se realizó el ensayo con extractos de micelio de *Punctularia atropurpurascens*. La HAG tampoco fue inhibida por Man, ramnosa o metilmanósido.

### ***Pycnoporus sanguineus***

Tanto los extractos de micelio como de cuerpo de fructificación de *P. sanguineus* presentaron inhibición de la HAG por una amplia variedad de monosacáridos (Gal, ácido galacturónico, fucosa y galactosilamina; Man, ramnosa y metilmanopiranosido); también causaron inhibición lactosa, melibiosa, quitobiosa, sacarosa, trehalosa, rafinosa, sialillactosa y heparán sulfato, sugiriendo una amplia especificidad de la lectina y/o la presencia de varias lectinas con diferentes especificidades. Del análisis de los monosacáridos que inhiben la HAG, resulta coherente que inhiban

galactosa, galactosilamina, ácido galacturónico y fucosa (de hecho, ésta es la 6-deoxigalactosa). Ello llevaría a que el OH involucrado en la unión a la lectina sería el del C4. Por otro lado, manosa, ramnosa (6-deoximanosa) y metil-manósido también inhiben la HAG. En este caso, manosa y galactosa se diferencian en el OH del C4 (son epímeros), por lo que el OH del C4 podría estar involucrado, pero no sería crítico que el OH estuviese en posición axial o ecuatorial. También inhiben glucosamina, Glc-NAc, ácido glucurónico, trehalosa y quitobiosa; de acuerdo a las estructuras de este grupo de carbohidratos nuevamente se mantiene constante el OH del C4 de los monosacáridos lo que indicaría que ese carbono estaría involucrado en la interacción. Dado que el heparán sulfato está constituido por Glc-NAc y ácido glucurónico no resulta sorprendente que dicho glicosaminoglicano inhiba la HAG causada por este extracto fúngico.

En estudios de aislamiento y purificación de lectinas a partir de micelios y de cuerpos de fructificación de una misma especie fúngica se han encontrado en algunos casos lectinas con diferentes propiedades como lo reportado para los hongos *Ganoderma lucidum* y *Pleurotus cornucopiae* (Oguri *et al.* 1996; Kawagishi *et al.* 1997). En otros casos, los carbohidratos ensayados inhibieron de la misma forma la actividad HAG de las lectinas provenientes tanto de micelio como de cuerpo de fructificación, como lo observado para el hongo *Volvariella volvacea* (She *et al.* 1998). En los estudios de inhibición de HAG realizados en esta tesis con *P. sanguineus* se obtuvieron los mismos resultados tanto con extractos de micelio como de cuerpo de fructificación.

### ***Gymnopilus spectabilis***

La actividad HAG fue inhibida por Man pero no por ramnosa (6-deoxi-Man) por lo cual el OH en el C6 estaría involucrado en la interacción lectina-monosacárido. Además los disacáridos lactosa y melibiosa produjeron inhibición de la HAG lo que indica que el cambio en el enlace glicosídico (entre C1 y C4 en el primero y entre C1 y C6 en el segundo) no imposibilita la interacción con la lectina (Figura 4.1).

Si bien Gal, 1-amino-1-deoxi-Gal y Gal-NAc no inhiben la HAG causada por el extracto de cuerpo de fructificación de *G. spectabilis*, cuando el OH del C6 está oxidado (ácido galacturónico) o reducido (fucosa) sí se produce inhibición de la HAG.

El ácido glucurónico y el disacárido trehalosa inhibieron la HAG; sin embargo Glc y sus derivados analizados no inhiben la HAG. Dado que Glc y Gal son epímeros en el C4 y basados en los resultados anteriores se podría inferir que el OH del C4 no estaría involucrado.

Una característica particular de este extracto fúngico, inusual en las lectinas reportadas a la fecha, es la inhibición producida por los tres ácidos: galacturónico, glucurónico y siálico, lo que sugiere que el grupo carboxílico participa en la interacción con la lectina.

*Estos resultados de inhibición de HAG son la base para la selección de las estrategias de afinidad usadas en este trabajo para la purificación de las 3 lectinas.*

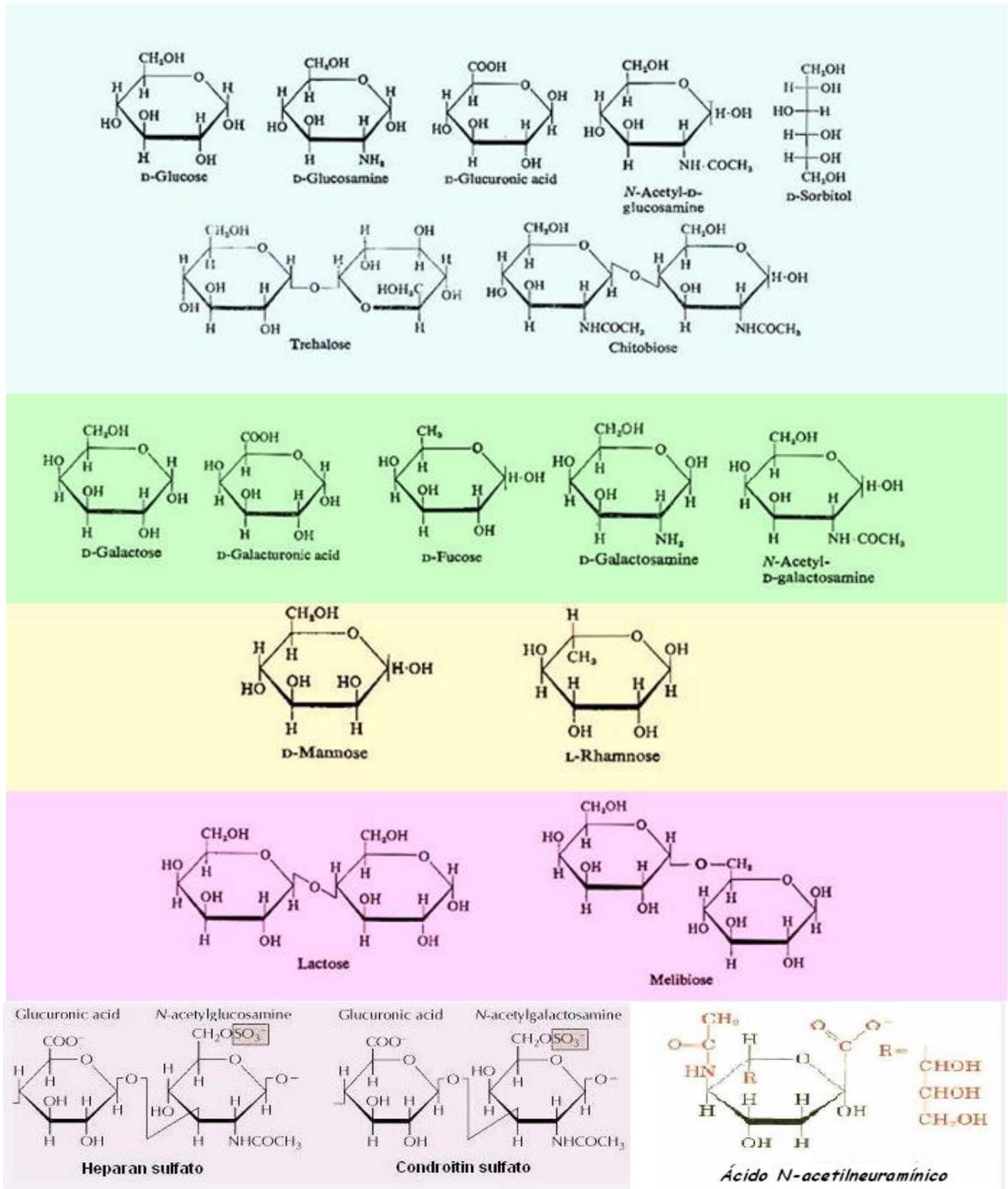


Figura 4.1. Estructura de algunos mono y disacáridos utilizados en los ensayos de inhibición de la HAG. Extraído de (Dawson *et al.* 1969; Lehninger *et al.* 1995). En el caso de Heparán sulfato y Chondroitin sulfato se muestra el disacárido de la unidad repetitiva respectiva.

### **4.3 Aislamiento y purificación de la lectina de *Punctularia atropurpurascens* (PAL) a partir de micelio.**

#### **4.3.1 Condiciones de cultivo**

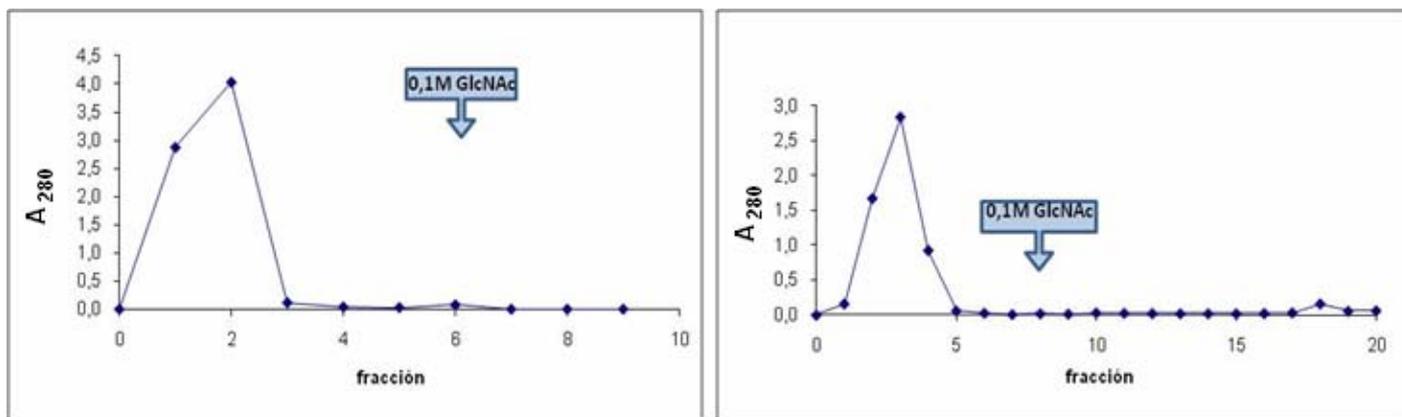
Se realizaron cultivos del hongo en distintas condiciones, durante 14 días de fermentación. En condiciones de cultivo con agitación en shaker a 100 rpm se obtuvo mayor actividad lectina que sin agitación (1280 y 80 UL/ml, respectivamente). Teniendo en cuenta que esta lectina reconoce quitina se realizaron cultivos utilizando el medio YNB con quitina para estudiar si se producía algún cambio en la HAG detectada; como resultado no se obtuvo actividad HAG en estos extractos lo que podría deberse a que no hubiera lectina o que la lectina se hubiera unido a la quitina (al ser insoluble no se separa del micelio durante la filtración) y estuviera inhibiendo la HAG.

A partir de estos resultados, se seleccionaron las condiciones de cultivo del hongo para la obtención de los extractos: medio 1.25 % Extracto de Malta, con agitación a 100 rpm y a 28 °C.

#### **4.3.2 Purificación de la lectina**

A partir de los resultados obtenidos con los extractos de *Punctularia atropurpurascens* en los estudios de inhibición de HAG (Tabla 4.3), se empleó una estrategia de afinidad para la purificación de la lectina. Dado que Glc-NAc inhibe la HAG en solución, se utilizó el adsorbente de afinidad Glc-NAc-Sepharose disponible en el laboratorio.

Se preparó una columna con Glc-NAc-Sepharose y se aplicó el extracto de micelio, recuperándose toda la actividad HAG aplicada en el percolado de la columna. Este resultado se explicaría por una relativa baja afinidad de la lectina por el monosacárido. En realidad este resultado se observa para el caso de las lectinas de unión a quitina aisladas a partir de plantas: a pesar de que la lectina es específica para Glc-NAc, la interacción con el monosacárido es muy débil y de ahí que la columna no sea efectiva en adsorber la lectina. Sí es llamativo que la CIM para Glc-NAc es mucho menor (36 mM) para esta lectina fúngica que para el caso por ejemplo, de la lectina de *Solanum commersonii*, donde una concentración de 500 mM de Glc-NAc no es capaz de inhibir la HAG (Plá *et al.* 2003) y el adsorbente Glc-NAc-Sepharose exhibe el mismo comportamiento que se observó en este caso. Se ensayó también la purificación de la lectina utilizando como adsorbente de afinidad la fetuin-Sepharose, teniendo en cuenta que la glicoproteína fetuina de suero fetal bovino (FT) produjo en solución inhibición de la HAG. Esta glicoproteína contiene una importante cantidad de residuos de quitobiosa en sus oligosacáridos (la quitobiosa inhibe la HAG) pero nuevamente, el adsorbente no resultó eficiente para la purificación la lectina, ya que no se obtuvo actividad HAG en las fracciones eluidas. Este comportamiento evidencia una diferencia marcada entre PAL y las lectinas de unión a quitina de origen vegetal (Van Damme *et al.* 1998). Los perfiles cromatográficos de los experimentos descritos se muestran en la Figura 4.2.



**Figura 4.2.** Perfil cromatográfico de extractos de micelio de *P. atropurpurascens* en Glc-NAc-Sepharose (izquierda) y fetuin-Sepharose (derecha). La flecha indica comienzo de la elución.

También se evaluaron otros dos adsorbentes de afinidad: quitosan-Sepharose y quitina. La quitina [ $\beta$ -(1 $\rightarrow$  4)-*N*-acetamido-2-deoxi-D-glucano)] es el aminopolisacárido más abundante en la naturaleza. El quitosano es el nombre dado a un grupo de quitinas parcialmente o totalmente desacetiladas (Ilyina *et al.* 2000). Ambos adsorbentes de afinidad fueron efectivos para la adsorción de la lectina y las fracciones eluidas de ambos adsorbentes causaron HAG usando eritrocitos de ratón (Figura 4.3). La SDS-PAGE de las fracciones provenientes de la purificación de la lectina de *P. atropurpurascens* con las columnas de quitosan-Sepharose y quitina evidenciaron la presencia de una banda a 67.6 kDa (Figura 4.4, líneas d y g, respectivamente). La fracción eluida de quitosan-Sepharose dio una clara y definida banda. El peso molecular de dicha subunidad correspondió a 67.6 kDa (Figura 4.5). Esta electroforesis muestra el alto grado de purificación alcanzado especialmente para el caso de quitosan-Sepharose.

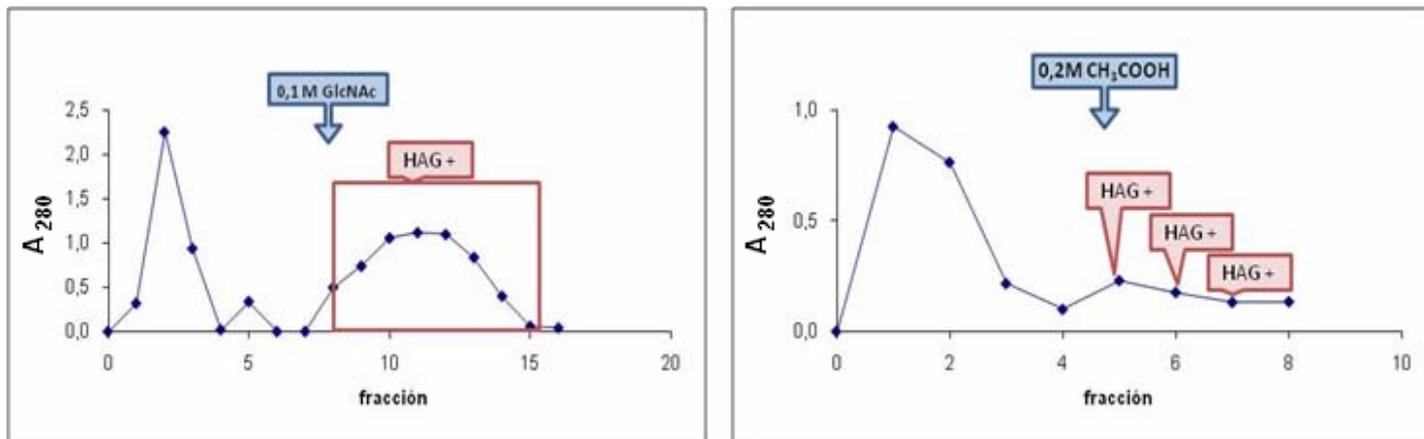


Figura 4.3. Perfil cromatográfico de extractos de micelio de *P. atropurpurascens* en quitosan-Sepharose (izquierda) y Quitina (derecha), La flecha indica comienzo de la elución.

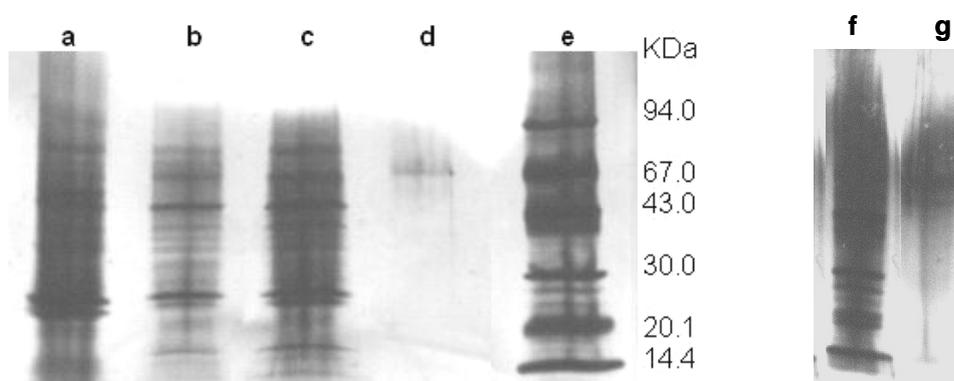
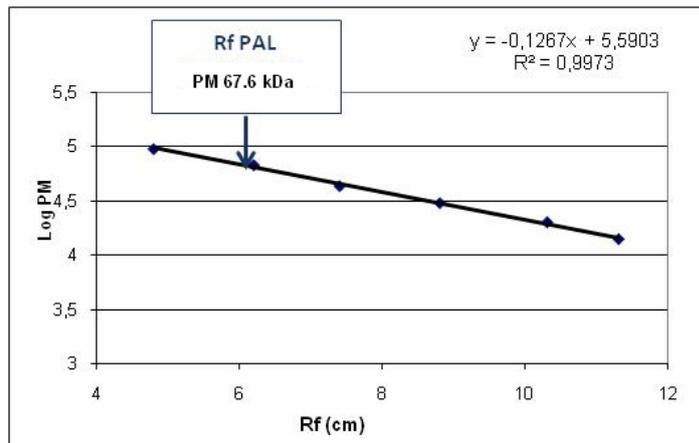
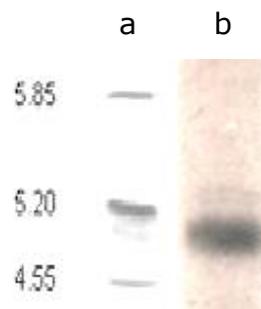


Figura 4.4. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la purificación de PAL en quitosan-Sepharose (líneas a-d) y Quitina (líneas f y g). Líneas a y f: extracto crudo, b: extracto gel filtrado, c: percolado, d y g: fracciones eluidas, e: marcador de peso molecular.



**Figura 4.5. Curva de calibración de PM.**

El isoelectroenfoque de PAL purificada mostró una banda a pI 5.0 (Figura 4.6).



**Figura 4.6. Isoelectroenfoque de la PAL purificada por cromatografía de afinidad con quitosan-Sepharose. Línea a: marcador de pI, b: fracción eluida.**

El método de purificación en un solo paso utilizando quitosan-Sepharose permitió obtener 600 µg de lectina a partir de 1.36 g de micelio (micelio producido en tres matraces de 200 ml de medio de cultivo) y fue seleccionado como método de purificación de la lectina.

#### **4.4 Aislamiento y purificación de la lectina de *Pycnoporus sanguineus* (PSL)**

Los resultados de la Tabla 4.2 muestran mayores niveles de actividad de lectina en extractos de cuerpos de fructificación respecto a extractos de micelio del hongo *P. sanguineus*. A pesar de ello los extractos utilizados para la purificación de la lectina provinieron de micelios de este hongo. Para esta elección se tuvo en cuenta que la obtención de setas resulta altamente dependiente de la época y de las condiciones de clima y que el cultivo sumergido permite un mayor control de las condiciones de producción de metabolitos de origen fúngico, con la posibilidad de realizar procesos a mayor escala bajo condiciones controladas (Nikitina *et al.* 2007).

##### **4.4.1 Condiciones de cultivo**

Para la obtención de extractos a partir de micelio se ensayaron cultivos en distintas condiciones. En condiciones de cultivo *sin agitación* se obtuvo mayor actividad lectina específica que *con agitación* (2000 y 80 UL/mg de proteína, respectivamente). Los resultados obtenidos cuando se ensayaron distintas fuentes de carbono y nitrógeno muestran que no hay diferencias significativas en las actividades específicas entre el medio Extracto de Malta y el medio YNB + galactosa o YCB + amonio (Tabla 4.4). Por ello, para la producción de la lectina se trabajó con el medio Extracto de Malta por ser de menor costo y debido a que en los demás medios ensayados no se obtuvo actividad específica significativamente superior.

**Tabla 4.4. Actividad específica de extractos de *P. sanguineus* obtenidos a partir de distintos medios de cultivo (cultivo estático a 28 °C)**

Medio de cultivo	Actividad específica (UL/mg prot)
<b>Extracto de Malta</b>	458 <sup>ab</sup>
<b>YNB + fructosa</b>	168 <sup>a</sup>
<b>YNB + galactosa</b>	668 <sup>b</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

Medio de cultivo	Actividad específica (UL/mg prot)
<b>Extracto de Malta</b>	376 <sup>a</sup>
<b>YCB + amonio</b>	190 <sup>ab</sup>
<b>YCB + nitrato</b>	0 <sup>b</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05)

Cuando el cultivo se realizó a 25 °C no se observaron diferencias significativas en la actividad lectina con respecto a lo obtenido a 28 °C (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5. Actividad específica de extractos de *P. sanguineus* obtenidos a partir de distintas temperaturas de incubación (cultivo estático, medio Extracto de Malta)**

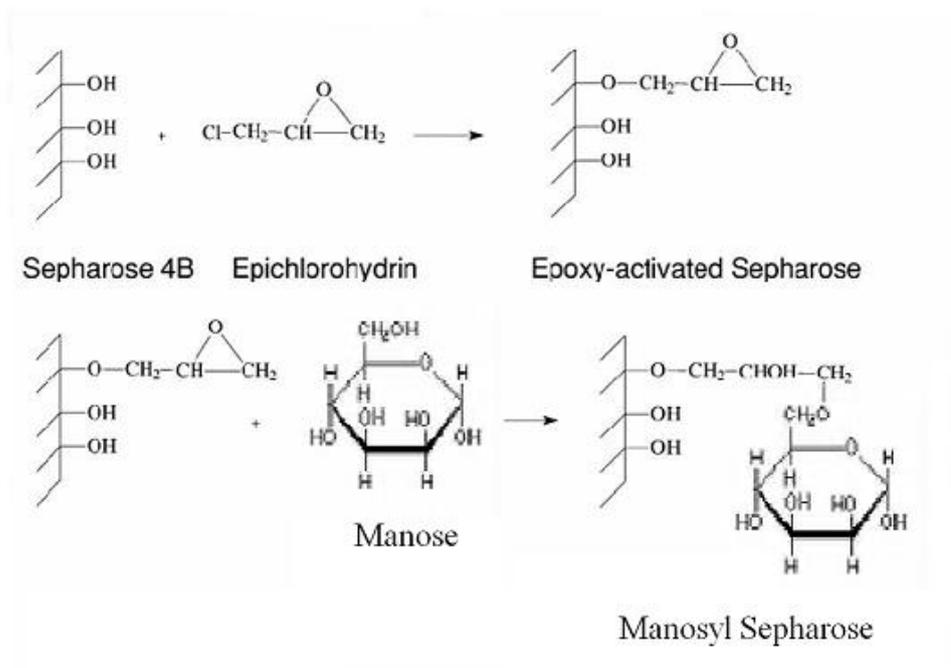
Temperatura	Actividad específica (UL/mg prot)
28 °C	245 <sup>a</sup>
25 °C	278 <sup>a</sup>

Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

Para los ensayos de purificación de la lectina se utilizaron entonces los extractos de *P. sanguineus* obtenidos de micelio crecidos a 28 °C, en medio 1,25 % Extracto de Malta y sin agitación.

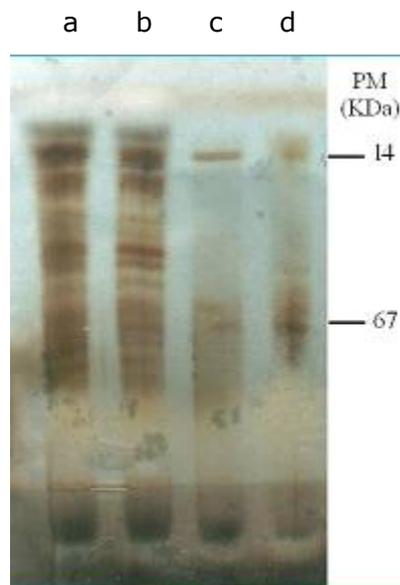
#### **4.4.2 Purificación de PSL por cromatografía de afinidad**

De acuerdo a los resultados obtenidos en estudios de inhibición de HAG para los extractos de *Pycnopus sanguineus* (Tabla 4.3) se empleó, en una primera instancia, una estrategia de purificación basada en el reconocimiento en solución del monosacárido Man. Para eso se sintetizó el adsorbente Man-Sepharose, mediante activación del soporte con epíclorhidrina (Figura 4.7). El adsorbente sintetizado contiene 6.1  $\mu\text{mol}$  Man/ g gel escurrido, determinado mediante método del BCA como se indicó en Materiales y Métodos.



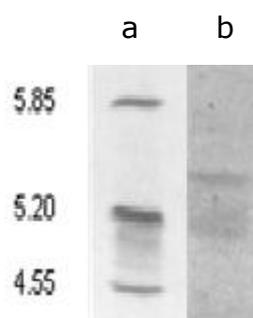
**Figura 4.7. Síntesis de Man-Sepharose por activación con epiclorhidrina.**

El extracto de *Pycnoporus sanguineus* se aplicó a una columna de Man-Sepharose. La SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad muestra la presencia de una banda de 14 kDa y un doblete a aproximadamente 67 kDa (Figura 4.8).



**Figura 4.8. SDS-PAGE de las fracciones de cromatografía por afinidad en Man-Sepharose de *Pycnoporus sanguineus*. Línea a: extracto crudo, b: percolado, c: fracción 1 (eluido), d: fracción 2 (eluido).**

El isoelectroenfoco de la PSL purificada mostró dos bandas de pI 5.5 y 5.2 (Figura 4.9).



**Figura 4.9.** Isoelectroenfoco de la PSL purificada por cromatografía de afinidad con Man-Sepharose. Líneas a: marcador de pI, b: fracción eluida

Se aplicó un nuevo pool de extractos (1280 UL/ml, 3657 UL/mg de proteína) en la columna de Man-Sepharose y se eluyó con 0.1 M de metilmanósido. En este caso prácticamente toda la actividad HAG se recuperó en el percolado y primer lavado. Ello podría deberse a una disminución de la capacidad de la columna luego del primer uso. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la Figura 4.10 (izquierda). A pesar de esto, la SDS-PAGE de las fracciones provenientes de esta cromatografía de afinidad muestra en el eluido un doblete de bandas a 67 kDa que correspondería a la lectina (Figura 4.11, línea c), no observándose la banda de 14 kDa presente en el eluido de la corrida anterior en Man-Sepharose.

Estos análisis muestran un doblete de bandas de pI y un doblete de bandas en la SDS-PAGE, lo cual podría estar relacionado con cierta microheterogeneidad de esta proteína. Dicha variación se estaría evidenciando tanto a través del peso molecular de las subunidades, como en la carga de las (al menos) 2 formas nativas de la proteína.

Dado que la actividad HAG del extracto de *P. sanguineus* fue inhibida también por Gal (Tabla 4.3), el material recuperado en el percolado y lavados anteriores (todos con actividad HAG frente a

eritrocitos equinos) fueron aplicados a una columna de Gal-Sepharose. Nuevamente, toda la actividad HAG se recuperó en el percolado y primer lavado de esta nueva columna de afinidad, no detectándose actividad en el eluido gel filtrado. Cuando se realizó SDS-PAGE se observaron en el percolado las bandas a 67 kDa (presentes también débilmente en el eluido) y una banda de 14 kDa que no está presente en el eluido (Figura 4.11, líneas e y f). El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 4.10 (derecha).

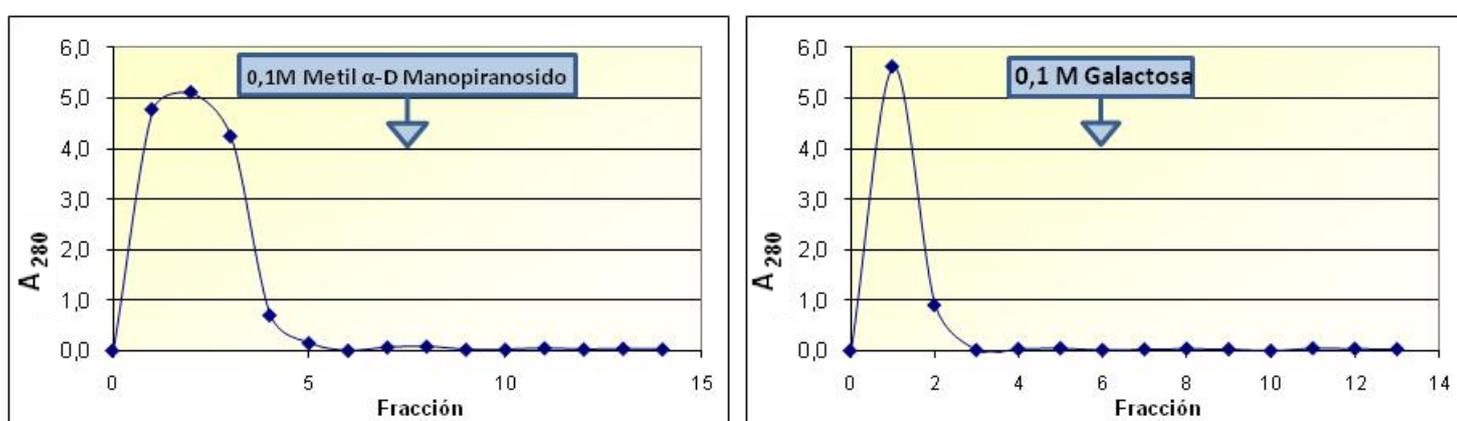


Figura 4.10. Perfiles cromatográficos de extractos de *P. sanguineus* en Man-Sepharose (izquierda) y Gal-Sepharose (derecha)

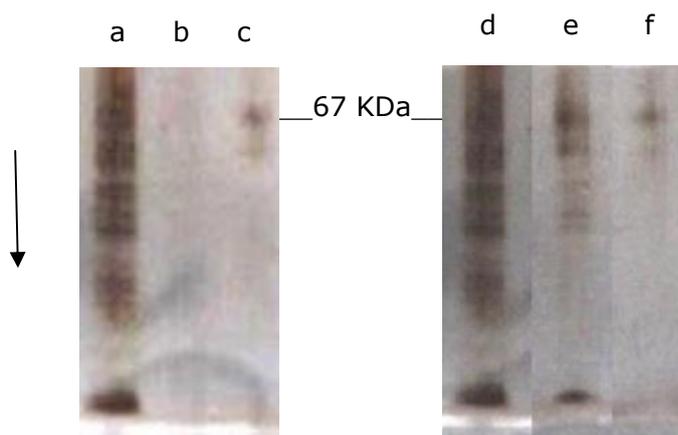


Figura 4.11. SDS-PAGE de las fracciones de cromatografía por afinidad en Man-Sepharose (izquierda, líneas a-c) y Gal-Sepharose (derecha, líneas d-f) de *Pycnopus sanguineus*. Línea a: percolado, b: lavado, c: eluido, d: extracto, e: percolado, f: eluido. *Tinción con plata*.

Estos resultados indican que tanto Man como Gal inmobilizadas reconocen la lectina de *P. sanguineus* como lo demuestra la presencia de las mismas bandas proteicas en la SDS-PAGE de ambos eluidos (Figura 4.11) pero con muy baja afinidad, dado que la mayor parte de la actividad de lectina se recupera en los percolados de ambas columnas. La pureza de estos eluidos determinó que los mismos fuesen unidos, dializados y liofilizados; el material resultante resuspendido en buffer fue utilizado para la preparación de los adsorbentes de afinidad (4.6.1).

#### 4.4.3 Purificación de PSL por cromatografía de intercambio iónico

En un tercer lote de producción de extracto fúngico, se ensayó otra estrategia de purificación, utilizando un pool de extractos obtenidos de micelio luego de 14 días de fermentación y en condiciones estáticas. Con este material se realizó una cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Cellulose. El perfil cromatográfico se muestra en la Figura 4.12.

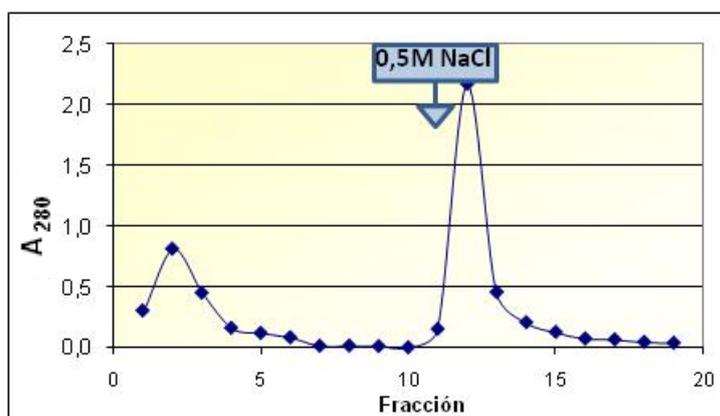


Figura 4.12. Perfil cromatográfico de extractos de micelio de *P. sanguineus* en DEAE-Celullose. La flecha indica comienzo de la elución.

Las fracciones eluidas del intercambio iónico presentaron alta actividad lectina frente a glóbulos rojos equinos, recuperándose entre las dos fracciones el 69 % de la actividad de lectina aplicada (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6. Purificación de PSL en DEAE-Celullose**

	HAG (UL/ml)	AHE (UL/mg)	UL totales	Rendimiento (%)	FP
Extracto crudo	8000	12614	56000	100	-
Fracción 1 (eluido)	2560	232727	7680	13.7	18.5
Fracción 2 (eluido)	10240	682667	30720	54.9	5.4

Estas fracciones eluidas fueron unidas, dializadas y liofilizadas, obteniéndose 1.7 mg de PSL a partir de 1.85 g de micelio (micelio obtenido del cultivo en 3 matraces con 200 ml de medio de cultivo). Ello representa un rendimiento de 900 µg de PSL/ g de micelio. Este liofilizado fue posteriormente retomado en 1.5 ml de agua destilada con una actividad de lectina de 81920 UL/ml frente a glóbulos rojos equinos, lo que muestra una destacada sensibilidad de los glóbulos rojos de este origen frente a PSL.

La SDS-PAGE de dicha muestra produjo bandas débiles pero que coincidirían con las obtenidas en los eluidos de la Cromatografía de Afinidad (Figura 4.13). Los PM de dichas subunidades fueron 68.7 y 55.2 kDa (Figura 4.14).

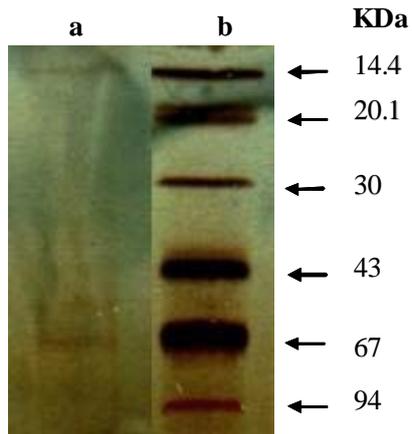


Figura 4.13. SDS-PAGE de la fracción eluida de cromatografía de intercambio iónico de *Pycnopus sanguineus*. Línea a: pool de fracciones eluidas de CII liofilizadas, b: marcador de peso molecular.

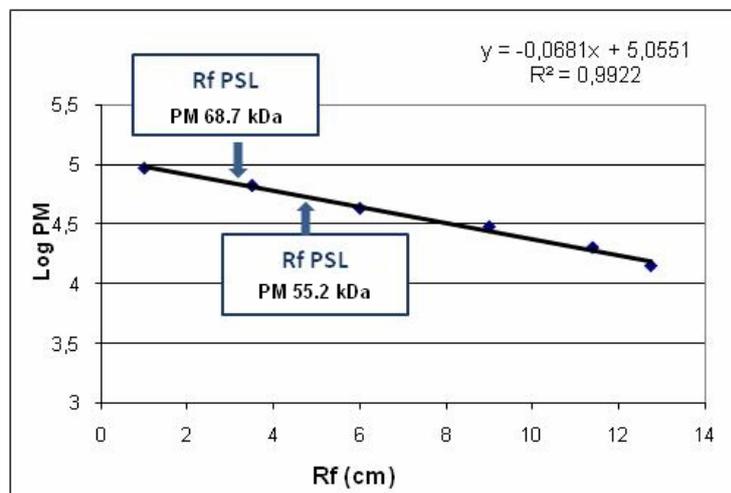


Figura 4.14. Curva de calibración de PM.

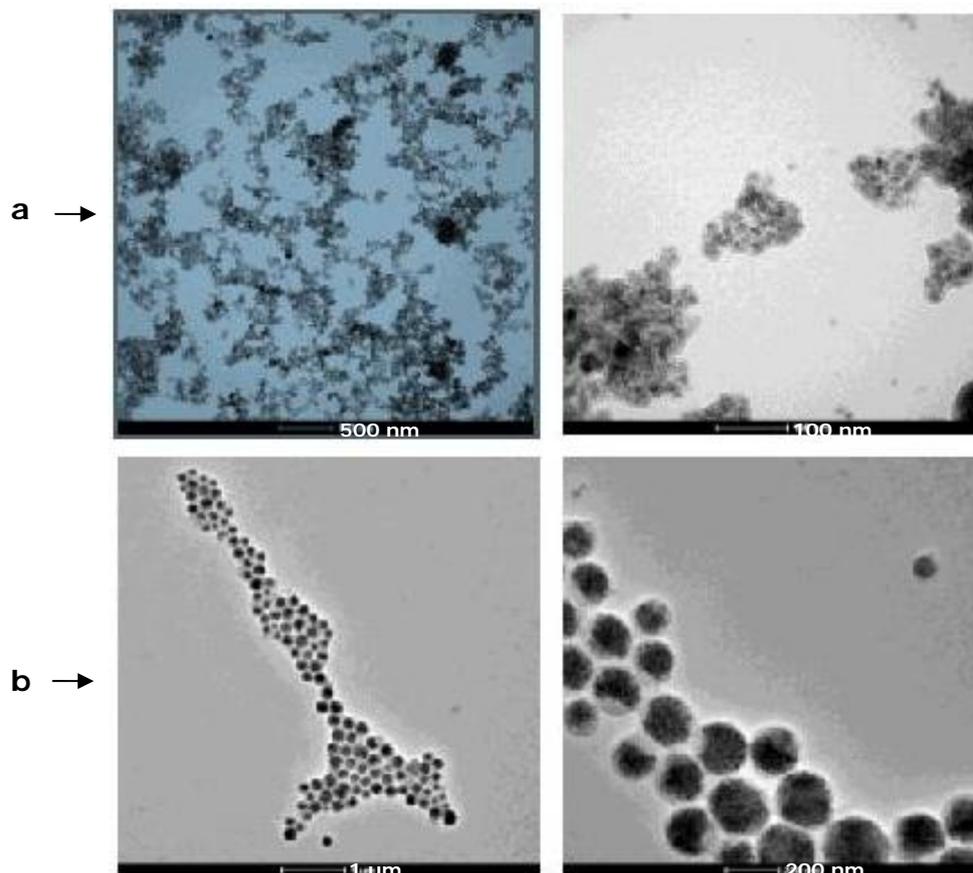
#### 4.4.4 Purificación de PSL con nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas con Gal

Finalmente, se ensayó una estrategia de purificación basada en la utilización de MNPs funcionalizadas con Gal. Estas MNPs al ser magnéticas pueden separarse con un imán, lo cual las hace ideales para desarrollar procesos que permitan la purificación y concentración de la PSL de forma sencilla y en un único paso (Figura 4.15).



Figura 4.15. Esquema general del proceso de purificación de PSL con MNPs funcionalizadas con Gal.

La Figura 4.16 muestra imágenes de TEM (microscopía electrónica de transmisión) de las MNPs utilizadas. Estas MNPs son de origen comercial y tienen un tamaño de 200 nm. Se eligieron MNPs con grupos carboxilos en su superficie los cuales pueden ser utilizados para unir distintos tipos de biomoléculas de forma covalente.

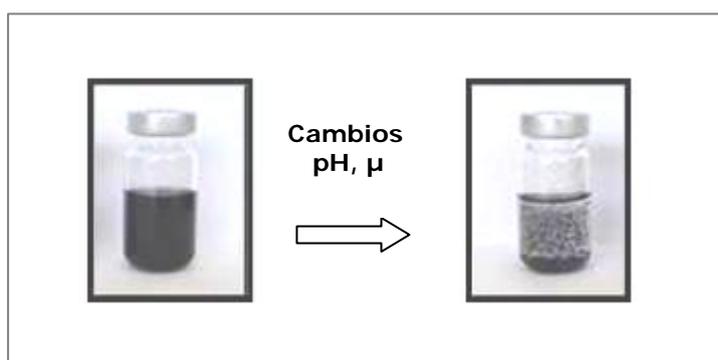


**Figura 4.16.** Imagen de TEM de MNPs comerciales de 200 nm. a: Chemicell; b: Ademtech. (Foto cedida por el Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza).

Basados en los resultados de inhibición de la actividad HAG producida por Gal se seleccionó este monosacárido para la funcionalización de las MNPs.

Es importante mencionar que la principal limitación a la hora de querer funcionalizar MNPs radica en las grandes diferencias existentes entre la gran variedad actual de nanopartículas en cuanto a tamaño, área superficial, densidad de grupos reactivos, etc. Es indispensable que durante su funcionalización las MNPs se mantengan estables en suspensión, y debido a su tamaño nanométrico la estabilidad coloidal de estos materiales depende de un delicado balance entre fuerzas de atracción (van der Waals y/o magnéticas) y de repulsión (electrostáticas y/o estéricas). Es así que pequeños cambios en el pH o la fuerza iónica

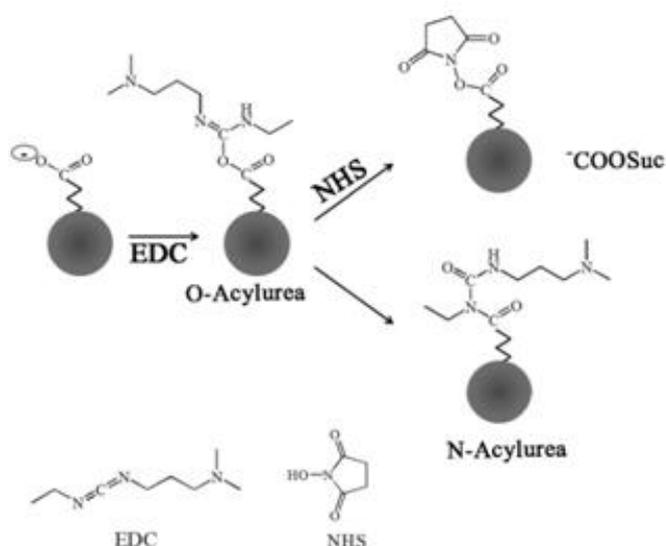
del medio pueden llevar a su rápida agregación, lo cual imposibilita la funcionalización de las mismas de forma escalable y reproducible (Figura 4.17). Este balance de fuerzas es muy distinto para cada tipo de nanopartícula, lo que hace que no existan protocolos universales de funcionalización y que sea necesario optimizarlos para cada tipo de nanopartícula en particular.



**Figura 4.17. Agregación de MNPs por cambios de pH y/o fuerza iónica**

Para funcionalizar las MNPs con Gal se utilizó una Gal comercial aminada (4-aminofenil-galactosa). Dado que las MNPs contienen grupos carboxilos en su superficie, estos se activaron mediante unión de carbodiimida (EDC) asistida por N-hidroxisuccinimida (NHS). Las carbodiimidias N-sustituidas pueden reaccionar con ácidos carboxílicos para formar intermediarios o-acilurea altamente reactivos (Figura 4.18). En principio este intermediario puede reaccionar de forma directa con la amina primaria de la 4-aminofenil-galactosa pero esta reacción sufre de ciertas limitaciones: la velocidad de reacción es lenta, el intermediario es susceptible a sufrir hidrólisis (lo cual lo hace tener una vida media muy corta en soluciones acuosas) y a su vez a través de un rearrreglo mediante una transferencia intramolecular de un acilo se genera N-acilurea la cual es inactiva. Para competir con esta última reacción y generar por lo tanto un intermediario reactivo más estable, se utiliza la NHS para asistir a la unión de aminas primarias en presencia de EDC. La reacción incluye la

formación de un éster intermediario muy reactivo (producto de la condensación del ácido carboxílico con NHS) capaz de luego reaccionar de forma covalente con aminas primarias. Si bien este intermediario reactivo es más estable que la O-acilurea también sufre inactivación a lo largo del tiempo por hidrólisis en medio acuoso.

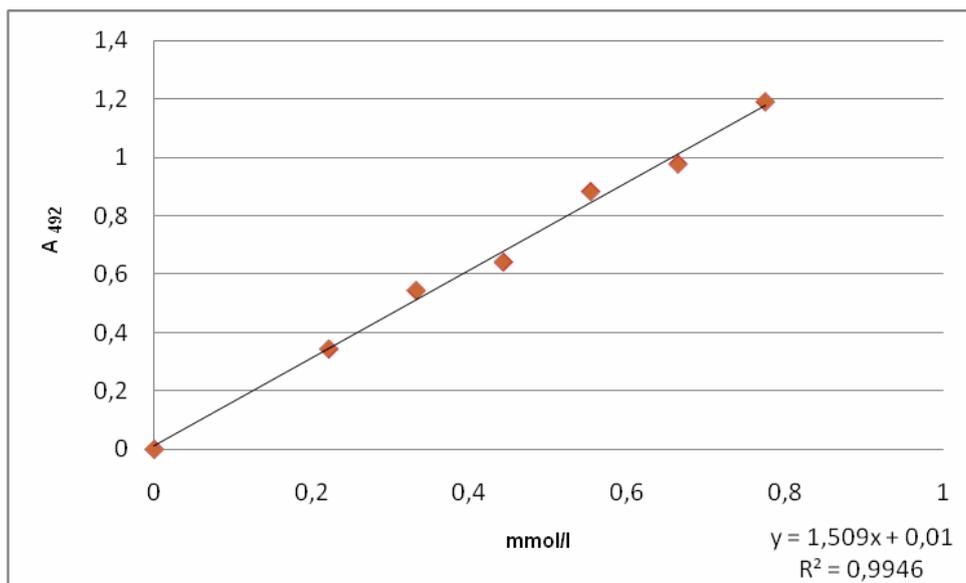


**Figura 4.18.** Esquema donde se muestran los pasos del mecanismo de activación de los grupos COOH de las MNPs mediante unión de cabodiimida asistida o no por NHS. Por simplicidad la EDC ha sido representada en su forma neutra aunque en las condiciones de reacción utilizadas se encuentra en su forma catiónica. Extraído de (Puertas *et al.* 2011).

Los parámetros más importantes a optimizar en esta reacción de activación son el exceso de EDC/NHS, concentración de Gal a usar y el pH de incubación. Dado que el intermediario reactivo que se genera durante la activación de los carboxilos de las MNPs no es estable en soluciones acuosas, es esencial poder optimizar la cantidad de EDC/NHS a añadir para poder funcionalizar las MNPs con una densidad de Gal adecuada. La activación de EDC asistida por NHS cambia la densidad de carga negativa superficial de las MNPs; por cada grupo que resulta activado se pierde una carga negativa. Por lo tanto la activación de un excesivo número de

grupos carboxilo puede generar la desestabilización y agregación de las MNPs ya que estas se mantienen estables en solución acuosa por fuerzas de repulsión electrostática. A su vez también es importante para la activación el pH de la reacción. El amino primario de la Gal es un grupo ionizable por lo que sólo cuando está desprotonado es capaz de actuar como nucleófilo y reaccionar con los grupos carboxilos de las MNPs activados con EDC/NHS. El rendimiento de la reacción será mayor a pHs alcalinos, dado que aumenta el porcentaje de moléculas de Gal desprotonadas. Sin embargo el aumento del pH de la reacción disminuye la estabilidad del intermediario reactivo por lo que para la funcionalización de las MNPs con una correcta densidad de Gal es necesario encontrar un compromiso entre concentración de Gal a añadir y pH de incubación. Es por esto que distintas concentraciones de EDC/NHS, Gal y distintos pHs fueron ensayados (Tabla 3.1, *Materiales y Métodos*). Para poder evaluar cuales fueron las mejores condiciones de reacción se evaluó tanto el consumo de Gal en el sobrenadante de reacción como el cambio en la densidad de cargas negativas de las MNPs.

Para cuantificar el consumo de Gal en el sobrenadante de la reacción se realizó una curva de calibración con 4-aminofenil-Gal (Figura 4.19) por el método de fenol sulfúrico. A partir de la misma se determinó la concentración de dicho carbohidrato en los sobrenadantes (Gal no unida a las MNPs). Se calculó la Gal unida por diferencia entre los  $\mu\text{mol}$  de Gal aplicados y los  $\mu\text{mol}$  de Gal en el sobrenadante.



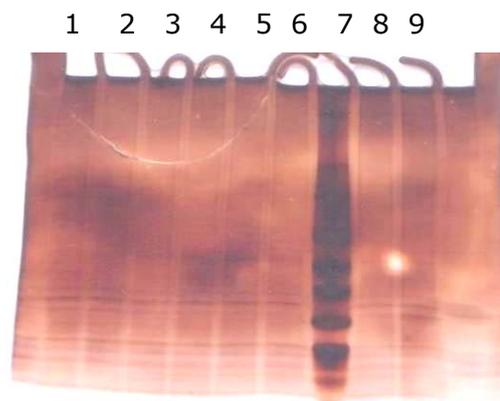
**Figura 4.19. Curva de calibración de 4-aminofenil-Gal.**

En primer lugar se comenzó a trabajar con las MNPs de Ademtech, dado que presentan una mayor estabilidad coloidal con el pH y una mejor distribución de tamaños que las de la casa comercial Chemicell. Al funcionalizar las MNPs a pH 6, la mayor unión de ligando se obtuvo con 2.5  $\mu\text{mol}$  de EDC y 7.5  $\mu\text{mol}$  de 4-aminofenil-Gal (Tabla 4.7), no produciéndose un aumento de la Gal unida al aumentar la cantidad de EDC.

**Tabla 4.7. Unión de Gal al funcionalizar las MNPs a pH 6.0**

EDC ( $\mu\text{mol}$ )	Gal aplicada ( $\mu\text{mol}$ )	% unido	Gal unida ( $\mu\text{mol}$ )
1.25	7.5	18	1.35
2.5	7.5	34.5	2.58
2.5	3.75	34.5	1.3
5	3.75	55	2.06

La densidad de Gal unida a las MNPs en estas condiciones de reacción no fue suficiente, sin embargo, para lograr una unión específica de la lectina de *P. sanguineus* a las MNPs, y lograr por lo tanto su purificación. La Figura 4. 20 muestra la SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la purificación llevada a cabo con las MNPs obtenidas con dos densidades distintas de Gal (1.35 y 2.6  $\mu\text{mol}$  de Gal). No se observa una purificación de la PSL ya que las bandas proteicas que se obtienen en el eluido de las proteínas unidas a las MNPs son fruto de interacciones inespecíficas con las MNPs. Al unir una baja densidad de Gal quedan muchos grupos carboxilos sin funcionalizar los cuales pueden unir proteínas del extracto.



**Figura 4.20. SDS-PAGE de fracciones provenientes de purificación de PSL con gal-MNPs (Adamtech).** 1: extracto crudo (dil 1/50), 2: extracto crudo (dil 1/100), 3: sobrenadante Gal-MNPs (1.35  $\mu\text{mol}$ ), 4:sobrenadante Gal-MNPs (2.6  $\mu\text{mol}$ ), 5. sobrenadante Gal-MNPs (1.35  $\mu\text{mol}$ ) (dil 1/10), 6. sobrenadante Gal-MNPs (2.6  $\mu\text{mol}$ )(dil 1/10), 7. marcador de peso molecular, 8. eluido Gal-MNPs (1.35  $\mu\text{mol}$ ), 9. eluido Gal-MNPs (2.6  $\mu\text{mol}$ )

Para aumentar la cantidad de Gal unida a las MNPs se incrementó el pH de reacción de 6 a 8. Al comparar las medidas de potencial Z (medida de la carga superficial de las MNPs) se comprobó que hubo un aumento en el número de Gal unidas al incrementar el pH a 8. Por cada Gal que se une a las MNPs se pierde una carga neta negativa, por lo que cuanto

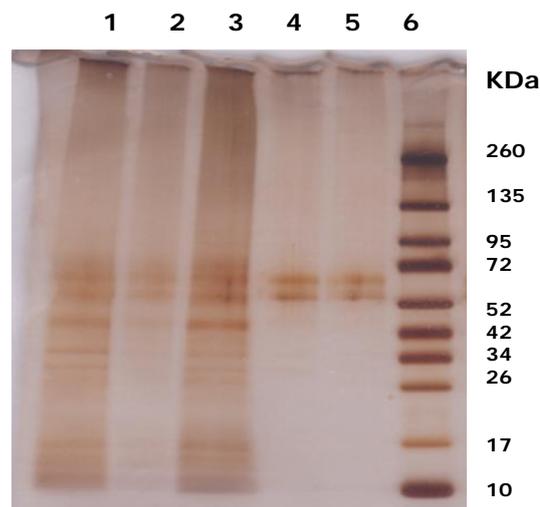
mayor sea el número de Gal unidas menor será la densidad de carga neta negativa de las MNPs. Se observó una diferencia de potencial para las Gal-MNPs funcionalizadas a pH 8 con respecto a las MNPs control (sin funcionalizar) (Tabla 4.8). Esta disminución de carga superficial estaría indicando la mayor unión de Gal (menos grupos carboxilo libres). En el caso de las MNPs activadas a pH 6, si bien por cuantificación de los sobrenadantes de reacción sabemos que se ha unido Gal, la densidad unida no es lo suficientemente alta para que pueda apreciarse un cambio en la densidad de cargas negativas de las mismas respecto al control.

**Tabla 4.8. Potencial Z de MNPs funcionalizadas con Gal**

	Potencial Z
MNPs control (Ademtech)	-30
Gal-MNPs (obtenidas a pH 6)	-30
Gal-MNPs (obtenidas a pH 8)	-16

A pesar del incremento en la densidad de moléculas de Gal unidas al realizar la funcionalización a pH 8, no se logró la unión específica de la PSL y por lo tanto su purificación. Para que haya una unión selectiva de la lectina es necesaria una densidad mínima de Gal sobre la superficie de las MNPs. Si bien se logró mejorar la funcionalización de las MNPs de Ademtech podría ser que estas MNPs no tuvieran un suficiente número de grupos carboxilos para alcanzar la densidad de Gal óptima necesaria. Por esta razón se decidió cambiar el tipo de MNPs comercial y utilizar las que comercializa Chemicell. Si bien estas MNPs tienen una dispersión de tamaños peor, el número de carboxilos por mg reportado es superior que en el caso de las de Ademtech. La funcionalización de las MNPs de Chemicell se realizó en las condiciones optimizadas para las MNPs de Ademtech a pH alcalino. Con estas MNPs sí se logró purificar la PSL (Figura 4.21). Antes de eluir la PSL unida de las MNPs se realizaron

lavados con sal y Tween para así eliminar cualquier proteína unida de forma inespecífica por interacción iónica o hidrofóbica. La elución de la PSL unida de forma específica por interacción carbohidrato-lectina se llevó a cabo con dos concentraciones de Gal.



**Figura 4.21. SDS-PAGE de fracciones provenientes de purificación de PSL con gal-MNPs (Chemicell). 1: extracto crudo (dilución 1/10), 2: sobrenadante (dilución 1/10), 3: lavado, 4: fracción eluida con 0,2 M galactosa, 5: fracción eluida con 0,5 M galactosa, 6: marcador de peso molecular**

En la Figura 4.21 se observan dos bandas tipo doblete (correspondientes a 68.7 y 55.2 kDa) en ambas fracciones eluidas, que coinciden con las obtenidas durante la purificación de PSL mediante cromatografía de afinidad e intercambio iónico.

Estos resultados muestran que se puede lograr la purificación de la lectina de *P. sanguineus* mediante estrategias diferentes: de afinidad, utilizando columnas (Man-Sepharose y Gal-Sepharose) o Gal-MNPs y de intercambio iónico, alcanzándose en todos los casos, preparaciones similares en cuanto a pureza de la lectina como lo evidencian las diferentes corridas electroforéticas.

Asimismo, se evaluó la interacción entre la lectina y el monosacárido Gal mediante 3 técnicas diferentes: usando Gal como

hapteno en ensayos de inhibición de HAG, donde se vio que la lectina reconoce a este monosacárido; luego, usando Gal inmovilizada en Sepharose, donde nuevamente se observó interacción como lo demuestra la presencia de la lectina en el eluido de la columna; y finalmente, usando Gal inmovilizada en MNPs, con idéntico resultado.

#### 4.5 Aislamiento y purificación de la lectina de *Gymnopilus spectabilis* (GSL)

##### 4.5.1 Purificación de la lectina

Debido a la alta actividad de lectina específica presente en los extractos de cuerpos de fructificación (Tabla 4.3), se utilizó este material para la purificación de la lectina. Se utilizaron dos estrategias de purificación diferentes: cromatografía de afinidad con Man-Sepharose y cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Cellulose. Los resultados de la purificación obtenidos en la cromatografía de afinidad se resumen en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9. Purificación de GSL por Cromatografía de Afinidad en Man-Sepharose**

	C (mg/ml)	Proteína (mg)	HAG (UL/ml)	AHE (UL/mg)	Rendimiento (%)	Factor purif.
Extracto crudo	2.01	301.5	320	159	100	-
Eluidos	0.02	0,22	400	20000	8.3	126

Se observa que se recupera actividad de lectina en el material eluido con 0.1M Manosa, con un rendimiento en actividad del 8.3 %, y un factor de purificación de 126.

Se ensayó también una cromatografía de intercambio iónico con DEAE-Cellulose en sistema batch. Se recolectaron dos fracciones (cada una de 200 ml) de eluidos con 1M NaCl. Para concentrar estos eluidos se procedió a una diálisis de las mismas contra agua destilada y la solución fue precipitada con sulfato de amonio (60 % saturación), pero este procedimiento no introdujo mejoras en el rendimiento ya que la mayor actividad lectina se perdió luego del paso de precipitación, debido principalmente a la inexistencia de un precipitado real, que permaneció como flóculos en la superficie de la solución salina. Cuando se intentó separar este material no fue posible removerlo ni por centrifugación ni por separación mecánica como un sistema bifásico. Se decidió no incluir esta etapa de concentración.

La cromatografía de intercambio iónico se repitió con una nueva alícuota de extracto crudo de *G. spectabilis*. En este caso las fracciones eluidas fueron liofilizadas, resuspendidas en un mínimo volumen de agua destilada, dializadas contra agua destilada y liofilizadas. El polvo se resuspendió en PBS y en este caso se logró un factor de purificación de 115, del orden del obtenido por cromatografía de afinidad, pero con un mayor rendimiento (Tabla 4.10).

**Tabla 4.10. Purificación de GSL por Cromatografía de Intercambio Iónico en DEAE-Cellulose**

	C (mg/ml)	Proteína (mg)	HAG (UL/ml)	AHE (UL/mg)	Rendim. (%)	Factor purif.
Extracto crudo	2,01	251,1	320	159	100	-
Eluidos	0,07	0,7	1280	18286	32	115

Las fracciones eluidas de ambas cromatografías fueron analizadas por SDS-PAGE en geles homogéneos 12%, obteniéndose en ambos casos los mismos perfiles de bandas (Figura 4.22).

Los PM correspondientes a las subunidades son 64.4 y 52.1 kDa (Figura 4.23)

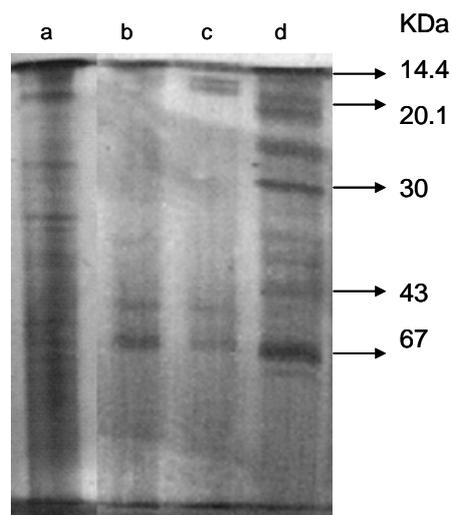


Figura 4.22. SDS-PAGE del material eluido obtenido de los procesos de purificación. Línea a: extracto crudo; b: fracción eluida de CII; c: fracción eluida de Man-Sepharose; d: marcador de peso molecular. Tinción con plata.

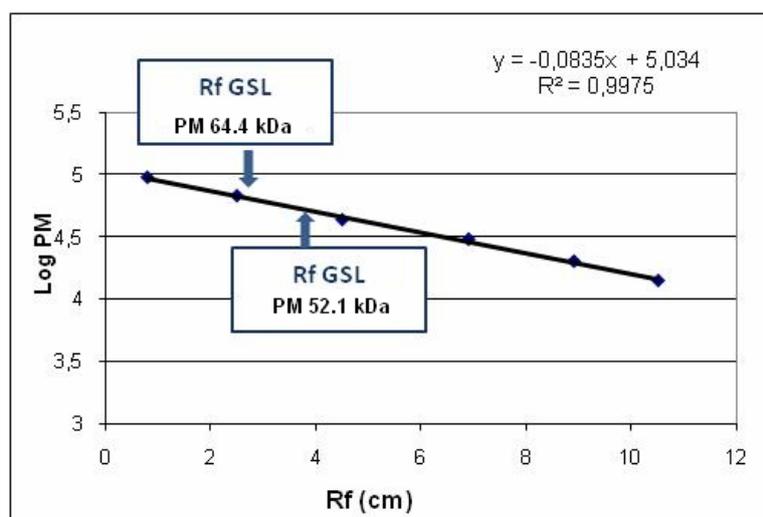
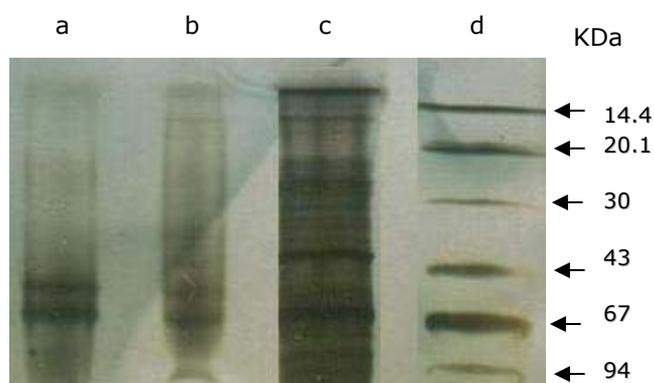


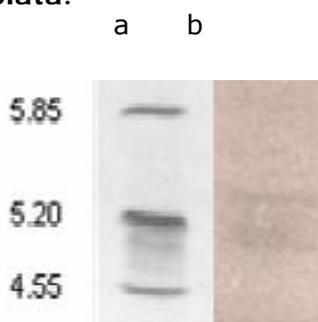
Figura 4.23. Curva de calibración de PM.

En esta Cromatografía de Intercambio Iónico se recogieron 3 eluidos y los mismos se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 4.24). Se observa que las dos primeras fracciones eluidas con 1 M NaCl, presentan un alto grado de pureza detectándose en estos casos las dos bandas previamente descritas. Sin embargo, la tercera fracción muestra una complejidad mayor de bandas por lo que se descarta esta fracción.

El isoelectroenfoco de la GSL purificada por cromatografía de afinidad con Man-Sepharose mostró dos bandas a PI 5.1 y 5.3 (Figura 4.25).



**Figura 4.24.** SDS-PAGE de las fracciones eluidas de CII. Línea a: fracción 1 (eluido); b: fracción 2 (eluido); c: fracción 3 (eluido); d: marcador de peso molecular. Tinción con plata.



**Figura 4.25.** Isoelectroenfoco de la GSL purificada por intercambio iónico. Líneas a: marcador de pI, b: fracción eluida

La cromatografía de intercambio iónico en batch permitió obtener 2,4 mg de GSL de alta pureza a partir de 114 g de cuerpos de fructificación del hongo, lo que da un rendimiento de 2,15 mg de GSL por 100 g de cuerpos de fructificación.

Con la lectina purificada se realizaron a continuación estudios de especificidad frente a carbohidratos, contenido de carbohidratos de la propia lectina y estabilidad frente al pH y la temperatura.

#### **4.5.2 Especificidad por carbohidratos**

En los ensayos de HAG utilizando distintas fuentes de eritrocitos se obtuvieron los mismos resultados que cuando se utilizó el extracto crudo. La GSL purificada causó HAG de eritrocitos de rata y ratón pero no de equinos, conejo u oveja.

La especificidad de la lectina purificada fue confirmada repitiendo los ensayos de HAG con el mismo panel de carbohidratos usados con el extracto crudo. Nuevamente galactosilamina, Man, metil-manopiranososa, y trehalosa causaron inhibición de la HAG. Los tres ácidos evaluados (siálico, galacturónico y glucurónico), así como lactosa, sialillactosa y N-acetilactosamina, todos inhibieron la HAG. La concentración de ácido siálico mínima inhibitoria de la hemaglutinación (correspondiente a 640 UL ml<sup>-1</sup>) fue de 12.5 mM.

#### 4.5.3 Contenido en carbohidratos de la lectina

Los resultados muestran que GSL es una glicoproteína con un 16 % de contenido en carbohidratos, de acuerdo a la determinación usando el kit de carbohidratos. Si bien muchas lectinas de origen fúngico son glicosiladas sólo unas pocas como la de *Agaricus edulis* (18%) y *Fomes fomentarius* (25%) contienen un tan alto contenido de carbohidratos (Conrad y Rüdiger 1994).

#### 4.5.4 Estabilidad a pH

La GSL es estable en un rango de pH entre 2.0 y 8.0 durante 18 hs de incubación, mientras que a pH 10 la actividad HAG remanente cae al 50 % (Figura 4.26). Este amplio rango de estabilidad a pH supera al de otras lectinas fúngicas previamente estudiadas; las lectinas de los hongos *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus* y *Mycoleptodonoides aitchisonii* fueron estables a pH superiores a 5, 5.5 y 4, respectivamente (Kawagishi *et al.* 2000; Kawagishi *et al.* 2001; Chumkhunthod *et al.* 2006).

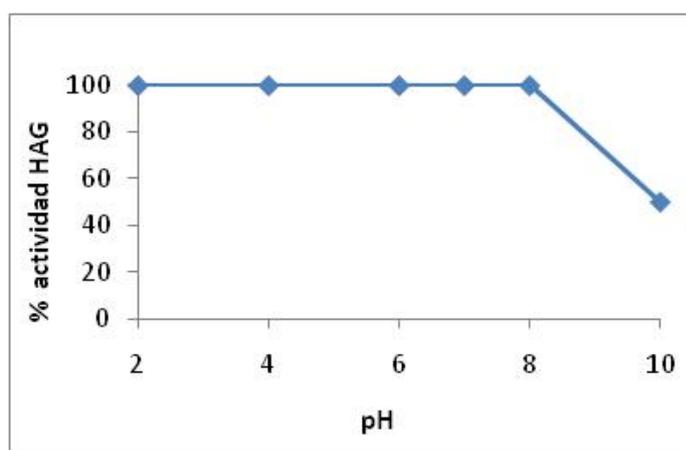


Figura 4.26. Efecto del pH sobre la actividad hemaglutinante de GSL

#### 4.5.5 Estabilidad a temperatura

A 40 °C la actividad HAG de la lectina se reduce 50 % respecto a la obtenida a 20 °C durante 30 minutos de exposición y a partir de 80 °C ya no presenta actividad HAG para ese tiempo de exposición (Figura 4.27).

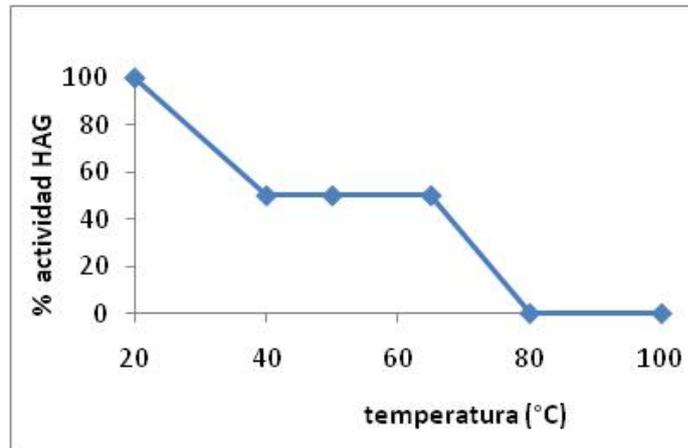


Figura 4.27. Efecto de la temperatura sobre la actividad hemaglutinante de GSL

#### 4.6 Interacción entre lectinas fúngicas y glicocompuestos

Las interacciones lectina-carbohidrato pueden variar según se evalúen en solución o con la lectina inmovilizada en un soporte sólido. Esto puede deberse a que la orientación de los sitios de reconocimiento de carbohidratos en una lectina inmovilizada pueden verse afectados por el proceso de inmovilización (Sharon y Lis 2007). Es por esto que cuando se inmoviliza una lectina es importante entre otras cosas, proteger este sitio de unión, y para ello por ejemplo, se realiza la inmovilización en presencia del monosacárido que es reconocido por la lectina. Posteriormente a la inmovilización, el monosacárido se libera por lavados exhaustivos del adsorbente con un buffer.

En este trabajo se evaluó la interacción entre las 3 lectinas fúngicas purificadas (GSL, PAL y PSL) y varias glicoproteínas modelo, a través de dos estrategias diferentes: i) se usaron estas glicoproteínas como haptenos en solución en ensayos de inhibición de la hemaglutinación usando eritrocitos de ratón. Ello permite tener información sobre la interacción lectina-glicoproteína en solución y ii) se sintetizaron adsorbentes de afinidad (mediante la inmovilización covalente de las lectinas a soporte de agarosa) y se estudió el comportamiento cromatográfico de alguna de estas glicoproteínas frente a dichos adsorbentes. Este estudio nos permite por un lado, evaluar si el proceso de inmovilización afecta la interacción lectina-glicoproteína y además, evaluar si el comportamiento cromatográfico en sí puede ser usado como una herramienta para purificar una glicoproteína o para separar isoformas de la misma.

Para el caso particular de GSL, se evaluó además la interacción entre lectina y partícula derivatizada con carbohidratos; para ello se usaron nanopartículas magnéticas que se funcionalizaron con monosacáridos (mediante unión covalente) y se estudiaron las interacciones entre estas glico-nanopartículas y GSL mediante ensayos de agregación.

#### **4.6.1 Síntesis de adsorbentes de afinidad**

##### **PAL-Sepharose**

La lectina purificada mediante cromatografía de afinidad en quitosan-Sepharose (Figura 4.4) fue inmovilizada en forma covalente en NHS-activated Sepharose<sup>®</sup> (Figura 4.28). La densidad de lectina inmovilizada en el soporte fue de 1.2 mg PAL/g gel escurrido, equivalente a 0.8 mg PAL/ ml gel sedimentado, lo que da un rendimiento de inmovilización del 55 %. Cantidades similares de lectinas fúngicas

inmovilizadas utilizando el mismo soporte activado fueron obtenidas para estudios realizados con los hongos *Aspergillus oryzae* y *Aleuria aurantia* (Matsumura *et al.* 2009). Si bien los porcentajes de inmovilización de proteínas descritos para este soporte activado se encuentran cercanos al 70-80 %, la glicosilación de la proteína puede ser la causa del menor % de inmovilización alcanzado (55 %), ya que se determinó que PAL es una glicoproteína con un 16 % de glicosilación. Esta determinación se realizó con el mismo kit comercial utilizado para determinar la glicosilación de GSL.

### PSL-Sepharose

Para la síntesis del adsorbente de afinidad PSL-Sepharose se utilizó el lote de producción de PSL obtenido mediante las cromatografías de afinidad realizadas en forma consecutiva en Man-Sepharose y Gal-Sepharose (Figura 4.11) y se inmovilizó en NHS-activated Sepharose. Mediante este proceso se obtuvo un derivado con una densidad de 0.76 mg PSL / g gel escurrido y cuando se repitió el proceso de síntesis, se obtuvo otro derivado con una carga muy similar, 0.71 mg PSL / g gel escurrido, siendo los rendimientos de inmovilización del 50 % y 48 %, respectivamente.

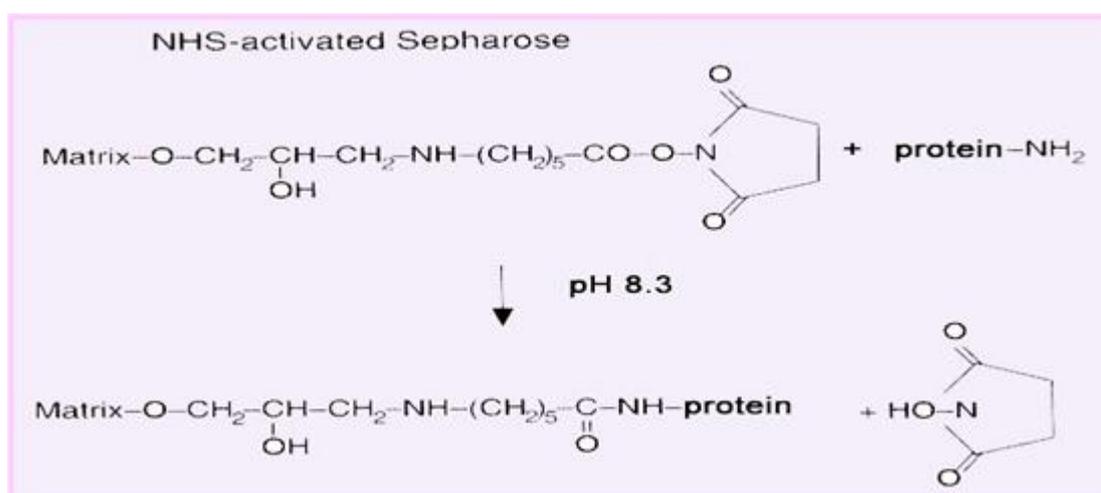


Figura 4.28. Inmovilización de proteínas por método de activación con NHS.

## GSL-Sepharose

Para la síntesis de GSL-Sepharose se utilizó la lectina purificada mediante intercambio iónico (Tabla 4.10) y la inmovilización covalente se realizó vía activación con CDAP (Figura 4.29).

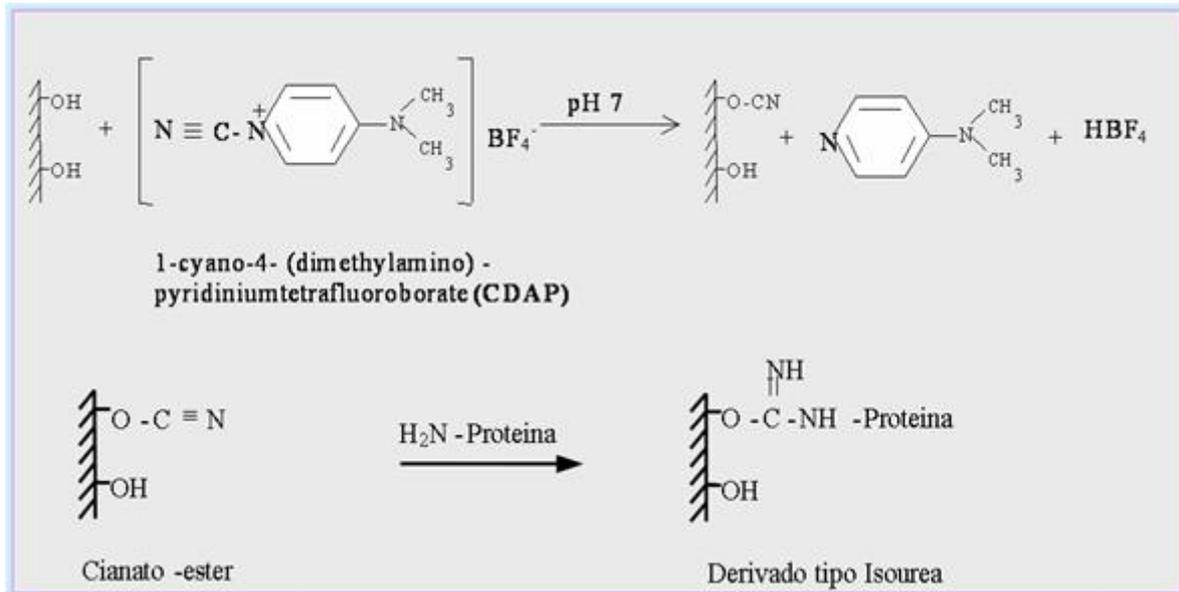


Figura 4.29. Inmovilización de proteínas por método de activación con reactivo CDAP

Se obtuvo un derivado con una carga de 0.033 mg GSL/g gel escurrido con un rendimiento de inmovilización de 21 %. Este porcentaje de inmovilización es bastante bajo pudiendo deberse a que el reactivo CDAP estuviese hidrolizado. Pero no se debe descartar el hecho que GSL es una glicoproteína con 16 % de glicosilación y nuevamente los carbohidratos presentes en la superficie de la proteína pueden estar interfiriendo en el proceso de inmovilización. Se ha reportado que en geles activados con estructuras del tipo cianato ester como las que se tiene en este caso, la glicosilación de la proteína disminuye los niveles de inmovilización. De todos modos el adsorbente obtenido no fue descartado y se utilizó en los procesos cromatográficos que se describen a continuación.

#### 4.6.2 Interacciones de afinidad entre lectinas y glicoproteínas modelo

##### Reconocimiento entre PAL y glicoproteínas en solución

La lectina de *Punctularia atropurpurascens* (PAL) purificada por cromatografía de afinidad en quitosan-Sepharose fue utilizada en el ensayo de inhibición de la HAG con glóbulos rojos de ratón. Las glicoproteínas animales PMSG, EPO, ferritina, LF, FT y TF y la glicoproteína vegetal HRP, fueron usadas como haptenos; todas estas glicoproteínas inhibieron la HAG y por lo tanto interaccionan con la lectina en solución.

Además, algunas de estas glicoproteínas fueron desialiladas químicamente y las correspondientes asialo-glicoproteínas fueron también evaluadas como haptenos: la HAG no fue inhibida por asialo-EPO, asialo-PMSG, asialo-FT y asialo-TF (Tabla 4.11).

Estos resultados sugieren que el ácido siálico terminal en dichas glicoproteínas participa directamente en la interacción con la lectina, aunque este ácido no inhibe la HAG de PAL (Tabla 4.3). Este comportamiento se ha reportado para otras lectinas fúngicas que reconocen sialo-glicoproteínas pero no sus formas desialiladas; un ejemplo es la lectina del hongo *Cordyceps militaris* donde la HAG es inhibida por fetuina, mucina submaxilar porcina y tiroglobulina pero no por las correspondientes formas desialiladas. Los monosacáridos fucosa, galactosa y manosa tampoco inhiben la HAG producida por esta lectina (Jung *et al.* 2007). Este resultado coincide con el obtenido para el ensayo de inhibición con PAL (Tabla 4.3), lo que estaría indicando que estas lectinas no interaccionan con dichos monosacáridos.

**Tabla 4.11. Efecto de las glicoproteínas sobre la actividad HAG de PAL**

<i>Glicoproteínas</i>	<i>HAG</i>
EPO	-
PMSG	-
Fetuina	-
Transferrina	-
Asialo-EPO	+
Asialo-PMSG	+
Asialo-fetuina	+
Asialo-transferrina	+
Lactoferrina	-
Ferritina	-
Peroxidasa	-

HAG (+): indica que no inhibe la HAG; HAG (-): indica que inhibe la HAG

Es sabido que los monosacáridos son reconocidos con diferente afinidad por una lectina, dependiendo si está aislado o si está formando parte de una cadena oligosacáridica. Muchas veces la lectina reconoce a un determinante complejo en el glicoconjugado, más que a un residuo simple del carbohidrato. Glicoconjugados estructuralmente diferentes pueden compartir un determinante común reconocido por una lectina, pero la presentación o accesibilidad del determinante a la lectina puede depender de otras características estructurales del glicocompuesto particular. Por ejemplo, la lectina Concanavalina A (Con A), libre ó inmovilizada en Sepharose (lectina con especificidad hacia manosa y glucosa) interacciona con alta afinidad con oligosacáridos organizados en complejos N-linked biantenarios y en oligosacáridos con alto contenido de manosa. Pero la Con A posee muy baja afinidad por oligosacáridos N-linked tri y tetraantenarios y por oligosacáridos O-linked (Debray *et al.*

1981). Como resultado, es difícil predecir la afinidad entre una lectina en solución o en fase sólida, y una glicoproteína.

De los monosacáridos presentes en las estructuras de las glicoproteínas LF, EPO, TF y FT (Figuras 4.30-4.33) PAL sólo reconoce a Glc-NAc (Tabla 4.3). Tampoco reconoce el disacárido lactosa; sin embargo, esta lectina sí es capaz de reconocer el disacárido N-acetilactosamina y el trisacárido sialilactosa. Además, el disacárido quitobiosa inhibe la HAG causada por esta lectina. De acuerdo a las estructuras presentes en estas glicoproteínas, PAL podría estar reconociendo así, estructuras tipo quitobiosas internas y/o la N-acetilactosamina y silalilactosa de los oligosacáridos N-linked de estas glicoproteínas.

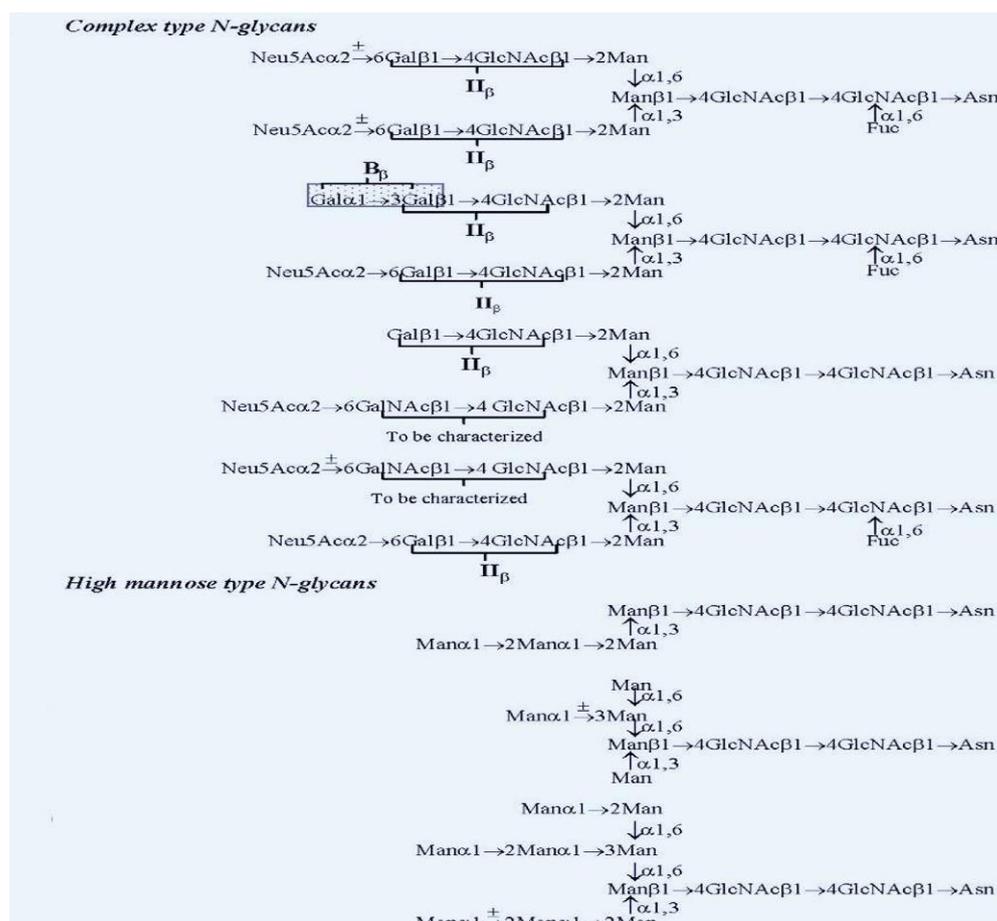


Figura 4.30. Estructura de oligosacáridos de lactoferrina bovina (Yen *et al.* 2011)

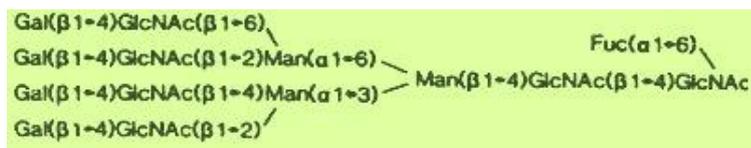


Figura 4.31. Estructura de oligosacáridos desialilados más común de eritropoyetina (EPO) (Tsuda *et al.* 1988)



Figura 4.32. Estructura de oligosacáridos de transferrina (Ueda *et al.* 2002)

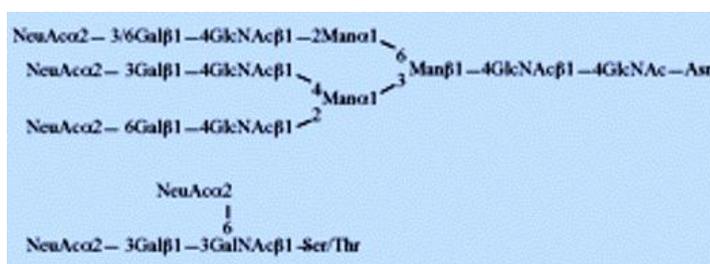


Figura 4.33. Estructura de oligosacáridos de fetuina (Ueda *et al.* 2002)

## Interacciones de afinidad entre PAL inmovilizada y glicoproteínas

Una estrategia para estudiar la interacción entre las glicoproteínas y la lectina inmovilizada consiste en estudiar el propio proceso cromatográfico y comparar los comportamientos exhibidos por diferentes glicoproteínas frente al mismo adsorbente. Con este propósito se prepararon mini-columnas empaquetadas con el adsorbente de afinidad PAL-Sepharose y se procedió como se describió en Materiales y Métodos.

Se utilizaron las glicoproteínas: PMSG, FT, LF, y EPO. La elución se realizó con Glc-NAc, monosacárido específico para la lectina de acuerdo a

los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (Tabla 4.3).

Al aplicar una solución de LF bovina a la columna se observó que el 60 % de la glicoproteína aplicada es retenida en la columna y es posteriormente eluida por competencia (Figura 4.34). De acuerdo a los resultados de inhibición, PAL podría estar interaccionando con esta glicoproteína a través de estructuras tipo quitobiosas internas en los N-glicanos complejos o con los de alto contenido en manosa y/o N-acetilactosamina y sialilactosa de los oligosacáridos complejos N-linked (Figura 4.30).

En los ensayos realizados con PMSG y FT se obtuvieron bajos porcentajes de adsorción/desorción (4 % y 5 %, respectivamente). En el caso de FT este resultado reafirma la baja eficacia obtenida en la purificación de PAL con el adsorbente fetuin-Sepharose. La diferencia entre las estructuras de los oligosacáridos de FT (estructura triantenaria en N-glicanos, Figura 4.33) y LF (estructura biantenaria en N-glicanos complejos, Figura 4.30) podría indicar que PAL reconoce con más afinidad la estructura biantenaria, lo que explicaría el mayor porcentaje de recuperación en eluidos de lactoferrina (60 %) respecto a fetuina (5 %).

Las corridas electroforéticas (SDS-PAGE) de las fracciones eluidas de las cromatografías de lactoferrina y fetuina en PAL-Sepharose corroboran la presencia de las bandas correspondientes a dichas glicoproteínas (Figura 4.35 A y 4.35 B, respectivamente).

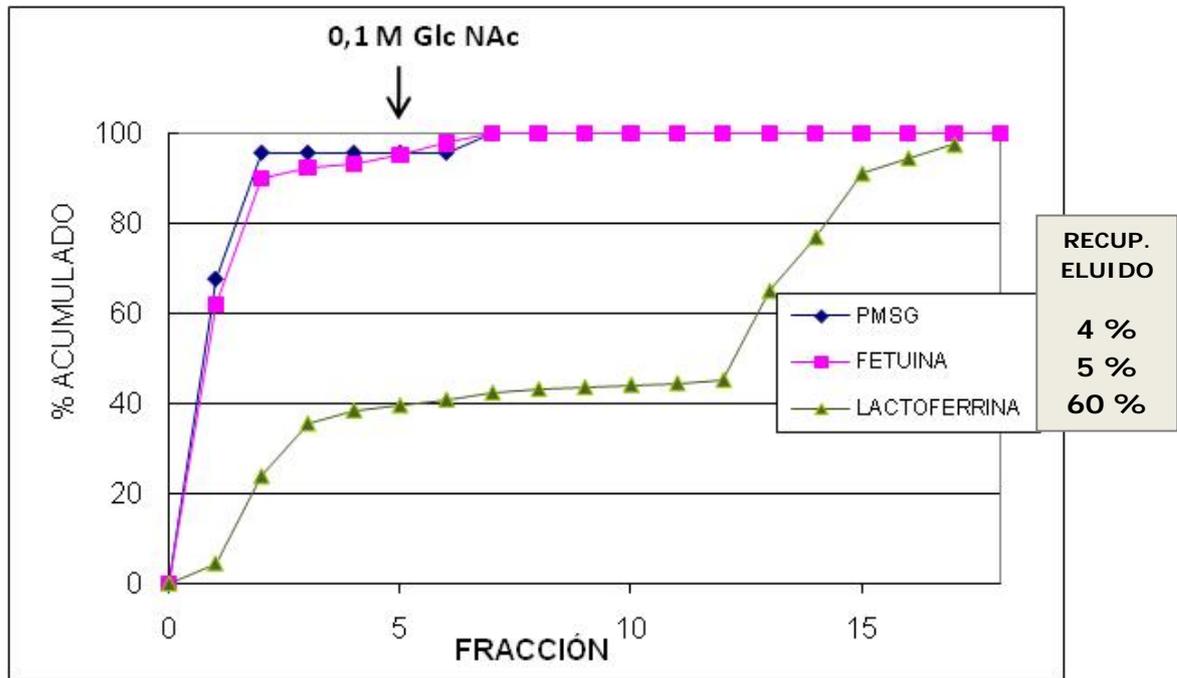


Figura 4.34. Cromatografía de afinidad de glicoproteínas en PAL-Sepharose. La flecha indica comienzo de la elución.

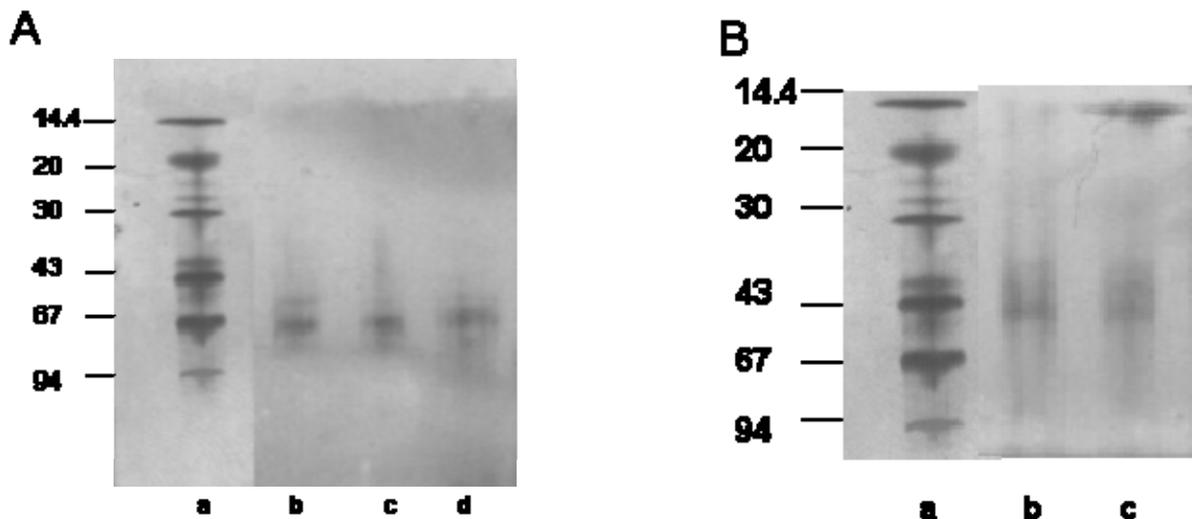
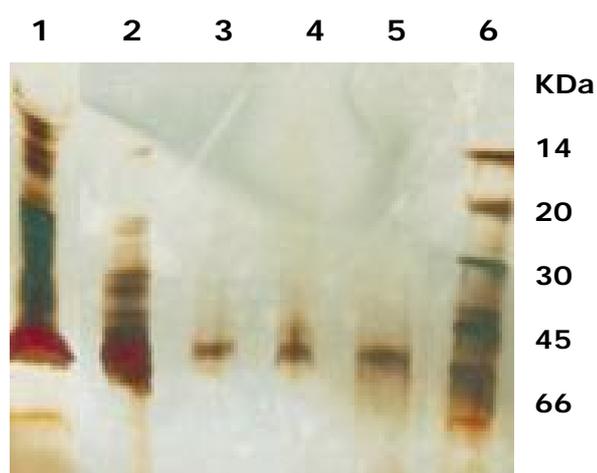


Figura 4.35. SDS-PAGE de las fracciones de la Cromatografía de Afinidad de lactoferrina (A) y fetuina (B) en PAL-Sepharose. A) Carriles a: marcador de peso molecular, b,c,d: eluidos de LF. B) Carriles a: marcador de peso molecular, b y c: eluidos de FT.

En el caso de EPO, la cromatografía de afinidad de la glicoproteína no pudo seguirse por A280nm, debido a la baja concentración de la muestra comercial (37 $\mu$ g/ml). Como forma de verificar presencia de EPO en las fracciones, se realizó una SDS-PAGE y tinción con plata (Figura 4.36). El peso molecular de la glicoproteína es de 30 KDa y se puede ver la complejidad de la muestra de partida, la cual evidentemente posee otras proteínas (es sabido que se utiliza seroalbúmina como estabilizante de EPO en la solución); sólo se observa una banda de 30 kDa en el aplicado y en el percolado; las bandas presentes en los eluidos no se corresponden con el peso molecular de EPO. Ello podría indicar que ninguna subpoblación de glicoisofomas de EPO son reconocidas por este lectina, recuperándose en el percolado de la columna, o que si bien alguna fracción es adsorbida, no se logra detectar en la electroforesis por posible degradación de la proteína durante el proceso cromatográfico. Debido a este comportamiento lábil de la glicoproteína en los posteriores estudios de interacción frente a las otras dos lectinas inmovilizadas, se decidió no incluir EPO en las cromatografías.



**Figura 4.36. SDS-PAGE de las fracciones provenientes de Cromatografía de Afinidad de EPO en PAL-Sepharose. 1:EPO aplicada, 2:percolado, 3:eluido 1, 4:eluido 2, 5:eluido 3, 6:Marcador de peso molecular**

### Reconocimiento entre PSL y glicoproteínas en solución

Se realizó de la misma forma que para PAL, mediante ensayos de inhibición de HAG. Los resultados muestran que FT, TF, LF y HRP inhiben la HAG frente a glóbulos rojos de ratón (Tabla 4.12). La desialilación de FT no afecta la interacción ya que la asialo-FT también inhibe la HAG. Esto sugiere que la lectina interacciona con FT a través de una secuencia de oligosacáridos en la que el ácido siálico terminal no sería determinante en el resultado.

Tabla 4.12. Efecto de las glicoproteínas sobre la actividad HAG de PSL

<i>Glicoproteínas</i>	<i>HAG</i>
EPO	+
PMSG	+
Fetuina	-
Transferrina	-
Tiroglobulina	+
Asialo-EPO	+
Asialo-PMSG	+
Asialo-fetuina	-
Asialo-transferrina	+
Asialo-tiroglobulina	+
Lactoferrina	-
Peroxidasa	-

HAG (+): indica que no inhibe la HAG; HAG (-): indica que inhibe la HAG

La asialo-TF no inhibe la HAG, en tanto que en el caso de TF, la lectina estaría reconociendo una secuencia oligosacáridica en la que el ácido siálico terminal es determinante en el resultado; de acuerdo a la

estructura predominante presente en la TF la PSL reconocería oligosacáridos N-linked de estructura biantenaria (Figura 4.32). Por otro lado EPO, PMSG y TG no inhiben la HAG ni en sus formas sialiladas ni desialiladas, no serían así reconocidas por PSL.

### Interacciones de afinidad entre PSL inmovilizada y glicoproteínas

Los dos adsorbentes PSL-Agarosa sintetizados se evaluaron frente a LF bovina. Se observa una adsorción del 8% y del 10%, respectivamente, demostrando la reproducibilidad de la adsorción de esta proteína (Figura 4.37). También se demuestra que en este caso, la forma de elución no afecta el comportamiento cromatográfico de lactoferrina, ya que en un caso fue con 100 mM Man (elución específica, 0.76 mg PSL/g gel) y en el otro caso, con 0.2 M ácido acético (elución inespecífica, 0.71 mg PSL/g gel).

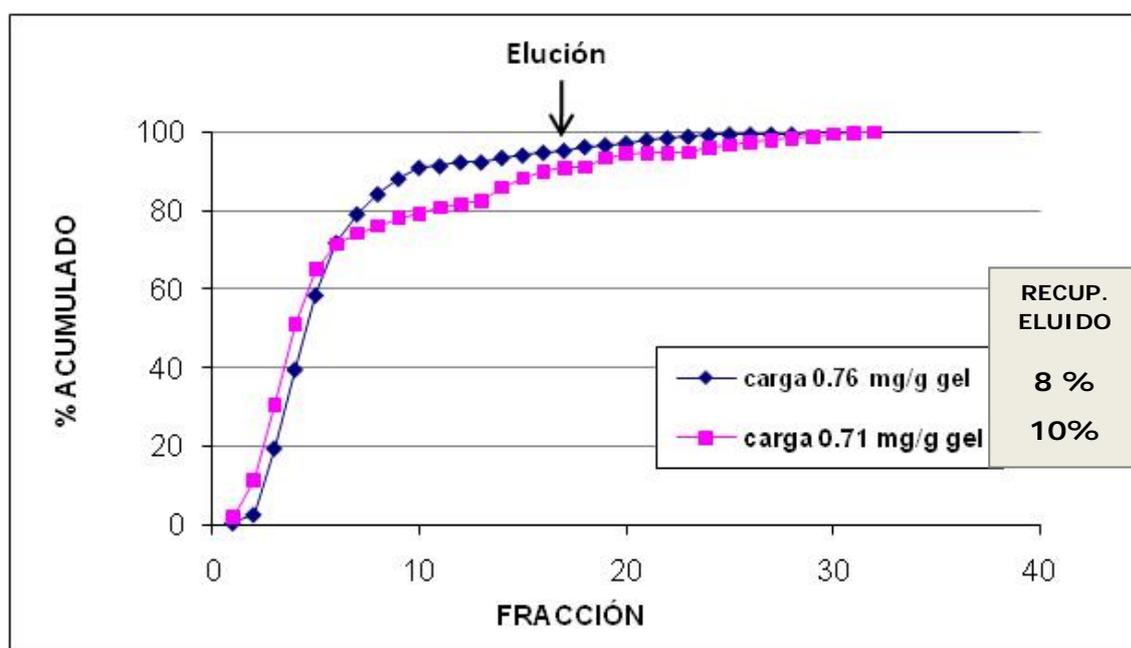


Figura 4.37. Cromatografía de afinidad de lactoferrina en PSL-Sepharose utilizando dos derivados diferentes.

Para los estudios con las glicoproteínas TF, FT y PMSG, se utilizó el derivado conteniendo 0.71 mg/g gel escurrido y la elución se realizó con 0.2 M ácido acético. Si bien en los ensayos realizados con la lectina en solución con las glicoproteínas LF, FT y TF se observa inhibición de la HAG, en este ensayo con la lectina inmovilizada se observa una interacción diferente con dichas glicoproteínas (Figura 4.38). El adsorbente es muy eficiente frente a TF ya que se logra una recuperación del 55 % de lo aplicado en la fracción eluida. Sin embargo, los porcentajes de recuperación obtenidos frente a FT y LF fueron inferiores (27 y 10 respectivamente) lo que indicaría una interacción más débil de la lectina inmovilizada con estas glicoproteínas.

Cabe destacar que la PMSG que en solución no inhibe la HAG (Tabla 4.12) muestra una débil interacción con la lectina en forma inmovilizada, recuperándose en los eluidos un 13 % de la glicoproteína aplicada.

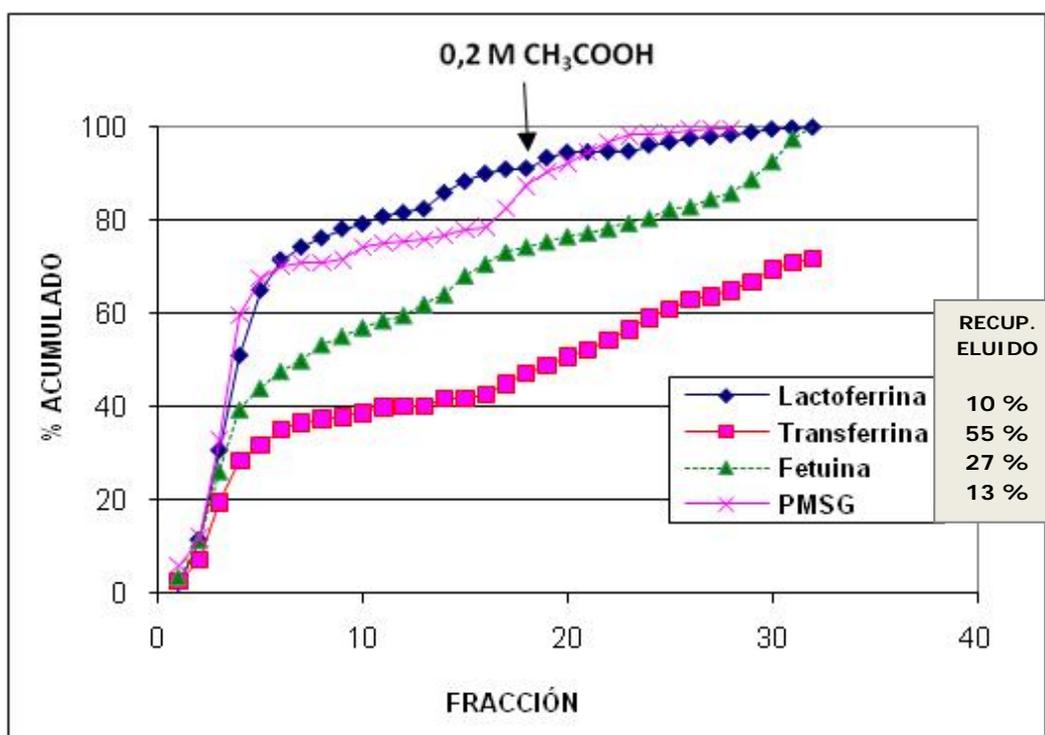


Figura 4.38. Cromatografía de afinidad de glicoproteínas en PSL-Sepharose. La flecha indica comienzo de la elución.

### Reconocimiento entre GSL y glicoproteínas en solución

La lectina de *G. spectabilis* (GSL) purificada mediante intercambio iónico se utilizó en ensayos de inhibición de HAG con glicoproteínas, usando glóbulos rojos de ratón. La HAG fue inhibida por FT, LF, PMSG y EPO (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Efecto de las glicoproteínas sobre la actividad HAG de GSL

<i>Glicoproteínas</i>	<i>HAG</i>
EPO	-
PMSG	-
Fetuina	-
Transferrina	+
Tiroglobulina	+
Lactoferrina	-
Asialo-EPO	-
Asialo-PMSG	+
Asialo-fetuina	+
Asialo-transferrina	+
Asialo-tiroglobulina	+
Asialo-lactoferrina	-
HRP	+

HAG (+): indica sin inhibición; HAG (-): indica inhibición

Las glicoproteínas asialo-PMSG y asialo-FT no inhibieron la HAG; estos resultados sugieren que GSL estaría reconociendo una secuencia oligosacáridica en la que la presencia del ácido siálico terminal es determinante en el resultado; este comportamiento estaría de acuerdo con la inhibición de la HAG producida por ácido siálico para esta lectina.

Además, se ha reportado que PMSG presenta un alto porcentaje de ácido siálico en su estructura (10%) (Moore y Ward 1980).

Sin embargo, asialo-EPO y asialo-lactoferrina inhibieron la HAG indicando que en estos casos el ácido siálico terminal no sería determinante en el reconocimiento de la secuencia oligosacáridica de las glicoproteínas.

Las glicoproteínas transferrina y tiroglobulina, tanto en su forma nativa como desialilada no inhibieron la HAG. Tampoco hubo reconocimiento entre GSL en solución y la glicoproteína peroxidasa.

La concentración de glicoproteína mínima inhibitoria de la hemaglutinación (correspondiente a 640 UL/ml) fue de 30 µg/ml para LF; resultados similares de CIM<sub>HAG</sub> fueron reportados en ensayos de inhibición de la HAG realizados con las lectinas de los hongos *Cordyceps militaris*, *Ganoderma lucidum* y *Aspergillus fumigatus* y las glicoproteínas tiroglobulina porcina (Jung *et al.* 2007), mucina y fetuina, ambas de suero fetal bovino (Kawagishi *et al.* 1997; Tronchin *et al.* 2002). Las CIM<sub>HAG</sub> fueron 125 µg/ml y 84 µg/ml para PMSG y EPO, respectivamente.

Los monosacáridos Man y ácido siálico, presentes en las estructuras de las glicoproteínas estudiadas, producen inhibición de la HAG tanto en el extracto (Tabla 4.3) como en la lectina purificada por lo cual estarían involucrados en el reconocimiento entre GSL y estas glicoproteínas.

Los oligosacáridos N-linked presentes en las glicoproteínas FT y EPO pueden presentar estructuras tipo tri- y tetra-antenarias (Figuras 4.31 y 4.33) mientras que la LF puede presentar estructura triantenaria en N-glicanos con alto contenido de Man (Figura 4.30) (uno de los monosacáridos reconocidos por GSL); sin embargo se ha reportado que TF y TG presentarían estructuras tipo biantenarias (Ueda *et al.* 2002; Yen *et al.* 2011). El reconocimiento de las estructuras tri- o tetra-antenarias podría explicar la interacción de GSL con las glicoproteínas que causaron inhibición de la HAG, mientras que dicha interacción no se daría con

glicoproteínas que presentan mayoritariamente estructuras biantenarias, como TG y TF que no produjeron inhibición de la HAG.

### **Reconocimiento entre GSL inmovilizada y glicoproteínas**

Para las cromatografías de afinidad se utilizó el adsorbente sintetizado mediante activación del soporte con CDAP; el derivado obtenido presentó una densidad de ligando de 33  $\mu\text{g}$  GSL/g gel escurrido. Esta densidad de lectina en el soporte es bastante bajo, considerando las cargas de las lectinas inmovilizadas disponibles comercialmente (las mismas pueden variar mucho dependiendo de la lectina; la Con A, por ejemplo, presenta una carga excepcionalmente alta de 10-12 mg Con A/ml gel sedimentado aunque la enorme mayoría se encuentran entre 1 y 3 mg/ml). Pero sorprendentemente, al evaluar este adsorbente con LF, la cual había producido inhibición de la HAG en los ensayos con la lectina en solución (Tabla 4.13), se observa que el mismo adsorbe un 13 % de lo aplicado; y este comportamiento cromatográfico es reproducible a lo largo de 5 experimentos sucesivos con el mismo adsorbente (Figura 4.39).

Al realizar las cromatografías con PMSG y FT, ambas reconocidas por la lectina en solución, se obtienen resultados muy interesantes: GSL-Sepharose presentó una alta adsorción de PMSG (49 %) y también fue capaz de interactuar con FT, lográndose recuperar por elución un 21 % de la glicoproteína aplicada (Figura 4.40).

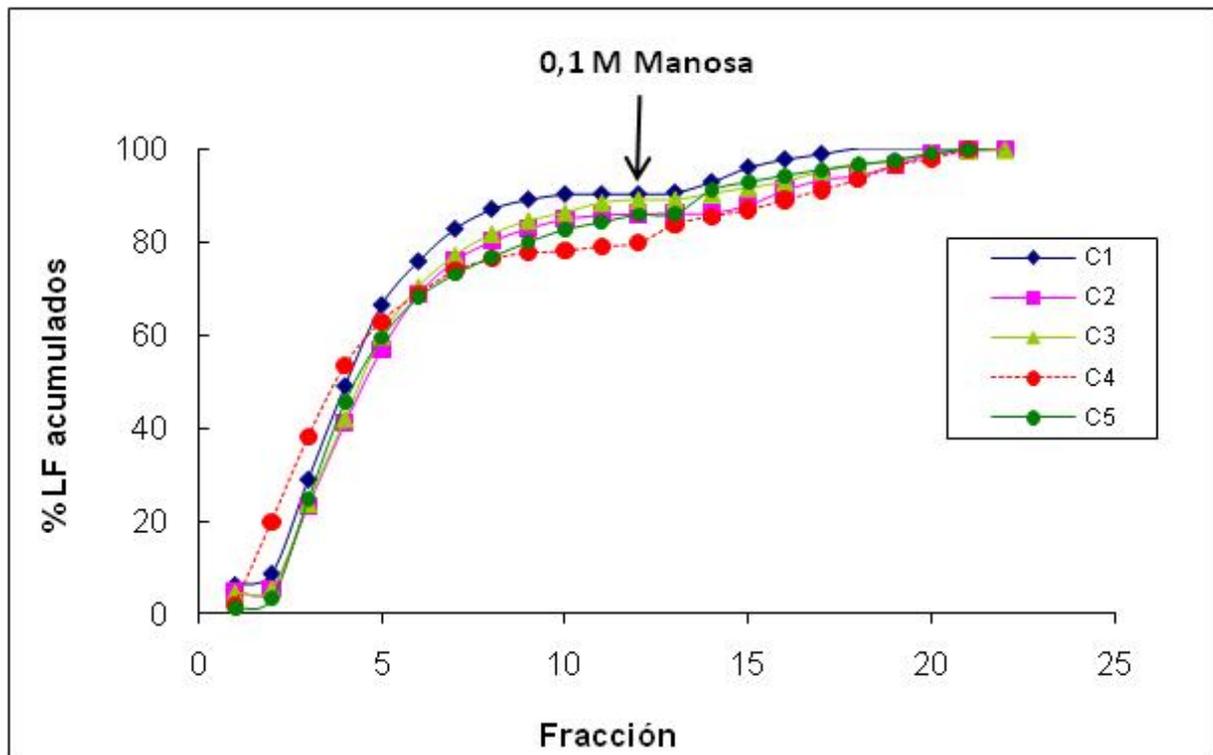


Figura 4.39. Cromatografía de afinidad de lactoferrina (LF) en GSL-Sepharose (5 corridas independientes). La flecha indica comienzo de la elución.

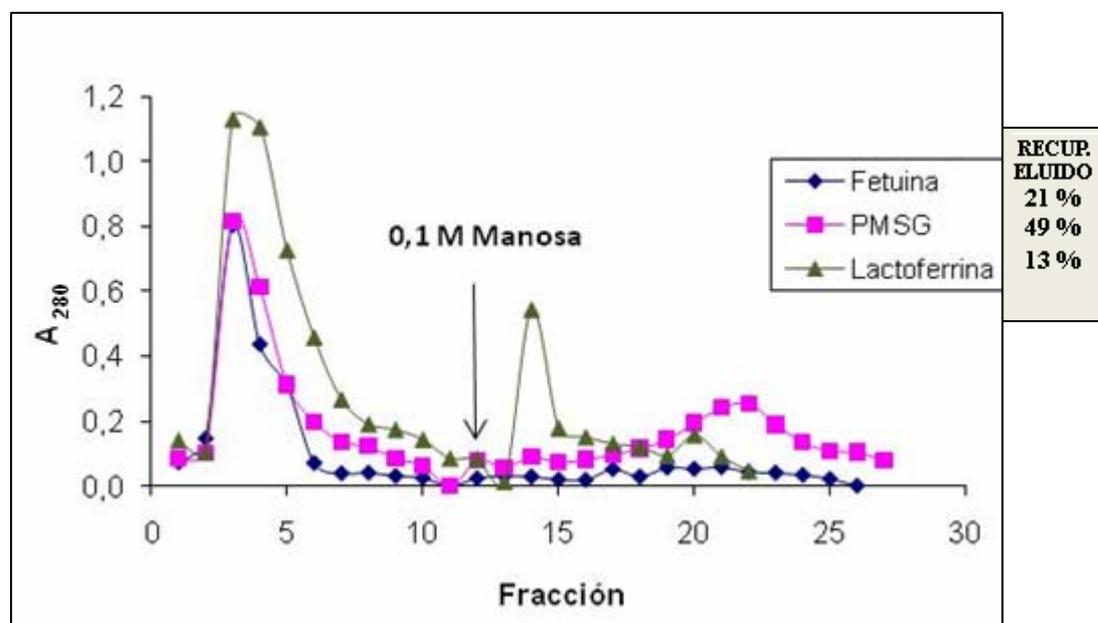


Figura 4.40. Perfil cromatográfico de glicoproteínas en GSL-Sepharose. La flecha indica comienzo de la elución.

La LF nativa (13 % de adsorción/desorción en GSL-Sepharose), pierde totalmente su afinidad por la lectina cuando es desialilada mostrando la importancia del ácido siálico terminal en la interacción con la lectina inmovilizada (Figura 4.41). Se debe mencionar que en solución tanto LF nativa como asialo-LF inhiben la HAG.

En el caso de TF, ésta no inhibe la HAG ni en forma nativa ni desialilada (Tabla 4.13). Sin embargo, analizando el proceso cromatográfico de ambas isoformas se observa una diferencia: hay una disminución del 20 % al 8 % de adsorción/desorción por la desialilación (Figura 4.42). Entonces, en la transferrina la presencia del ácido siálico terminal resulta más crítico en la interacción con GSL en la forma inmovilizada, que en la interacción con la lectina en solución.

Estos resultados ponen de manifiesto la alta afinidad de GSL inmovilizada frente a algunas de estas glicoproteínas de interés tecnológico y destaca aún más la relevancia de este adsorbente, debido a la ya mencionada baja carga del soporte. Ello le abre enormes perspectivas de aplicaciones, por ejemplo en el campo de producción de glicoproteínas, donde generalmente el costo del adsorbente representa una de las mayores dificultades para aplicar metodologías de afinidad.

En base a todos los estudios de adsorción/desorción de glicoproteínas realizados frente a los tres adsorbentes sintetizados en este trabajo y teniendo en cuenta su potencial aplicación en el campo de la purificación de las glicoproteínas estudiadas, se puede concluir que si bien hay un importante grado de reconocimiento entre las glicoproteínas y las lectinas, ninguna de las 3 lectinas, en las condiciones estudiadas, fue capaz de interactuar con el total (o al menos en porcentajes mayores al 90%) de la glicoproteína. Desde este punto de vista, estos adsorbentes no serían de elección para usar en procesos de aislamiento y purificación de estas glicoproteínas a partir de materiales biológicos complejos. Sin

embargo, sí se destaca su gran utilidad para separar isoformas de una misma glicoproteína. En ese sentido, GSL-Sepharose fue el más efectivo en el reconocimiento de PMSG, permitiendo separar al menos dos subpoblaciones, una en el percolado (51 %) y otra mediante elución competitiva (49%). El mismo análisis se puede realizar en el caso de la glicoproteína TF, que es mejor reconocida por PSL-Sepharose, donde una glico-isoforma se recupera en el percolado de la columna (45%) y otra en el eluido (55%). El adsorbente PAL-Sepharose fue el más eficiente en reconocer la LF bovina (60%), acercándose mucho a un posible uso en procesos de purificación de esta glicoproteína. En este caso se debería evaluar si mediante incremento en la densidad de ligando (lectina) inmovilizado, es posible incrementar ese porcentaje de unión.

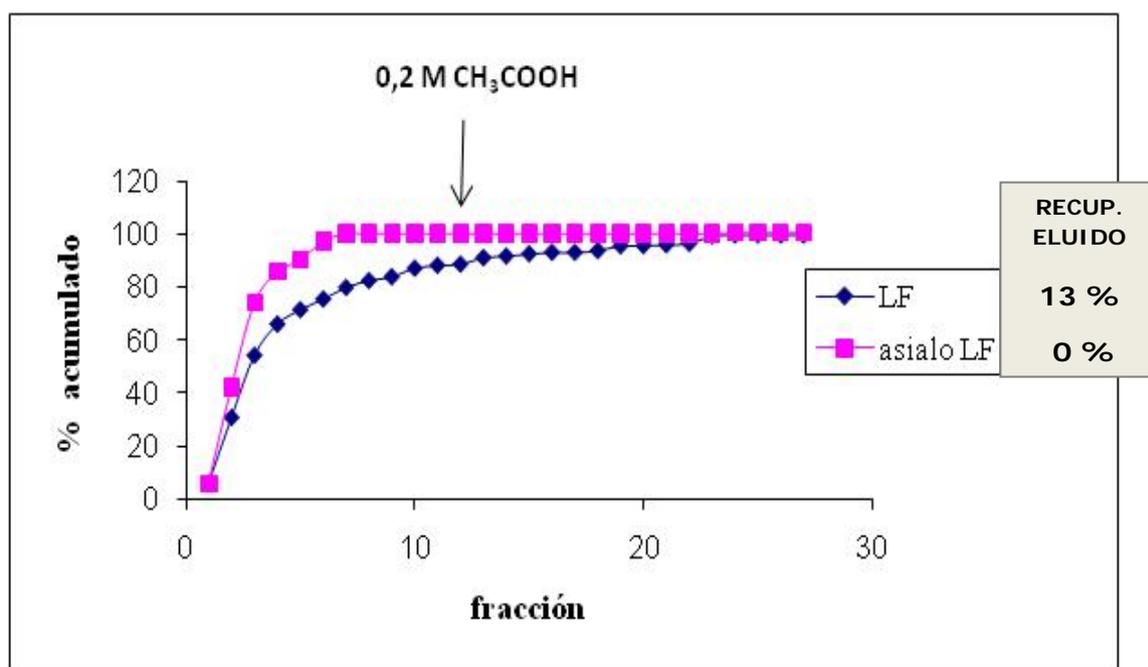


Figura 4.41. Perfiles cromatográficos obtenidos en GSL-Sepharose para lactoferrina (LF) y asialolactoferrina (asialo LF). La flecha indica comienzo de la elución.

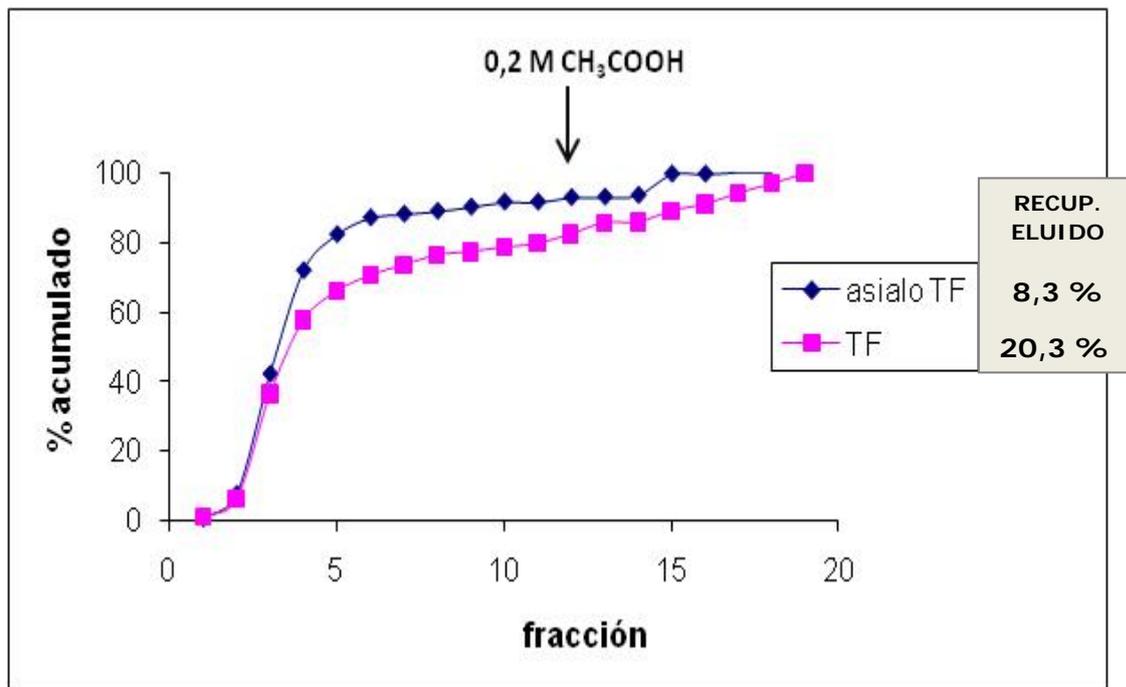


Figura 4.42. Perfiles cromatográficos obtenidos en GSL-Sepharose para transferrina(TF) y asialotransferrina (asialo TF). La flecha indica comienzo de la elución.

Finalmente la FT, otra glicoproteína de importancia biotecnológica, es adsorbida en % similares pero más bajos, por PSL-Sepharose (27%) y PAL-Sepharose (21%). Nuevamente, la aplicación de estos adsorbentes sería en el campo de la separación de glico-isoformas de FT, más que en el campo de la producción de la glicoproteína.

#### 4.6.3 Estudios de interacción glico-nanoparticula- GSL

Como se mencionó en la *Introducción*, los estudios de especificidad de lectinas realizados mediante ensayos de HAG pueden ser a veces complejos de interpretar debido a los diversos factores que afectan el ensayo. En este sentido el uso de MNPs puede resultar de mucha utilidad debido a que su tamaño nanométrico favorece por lo general a las interacciones biológicas por encontrarse en la misma escala de tamaño de

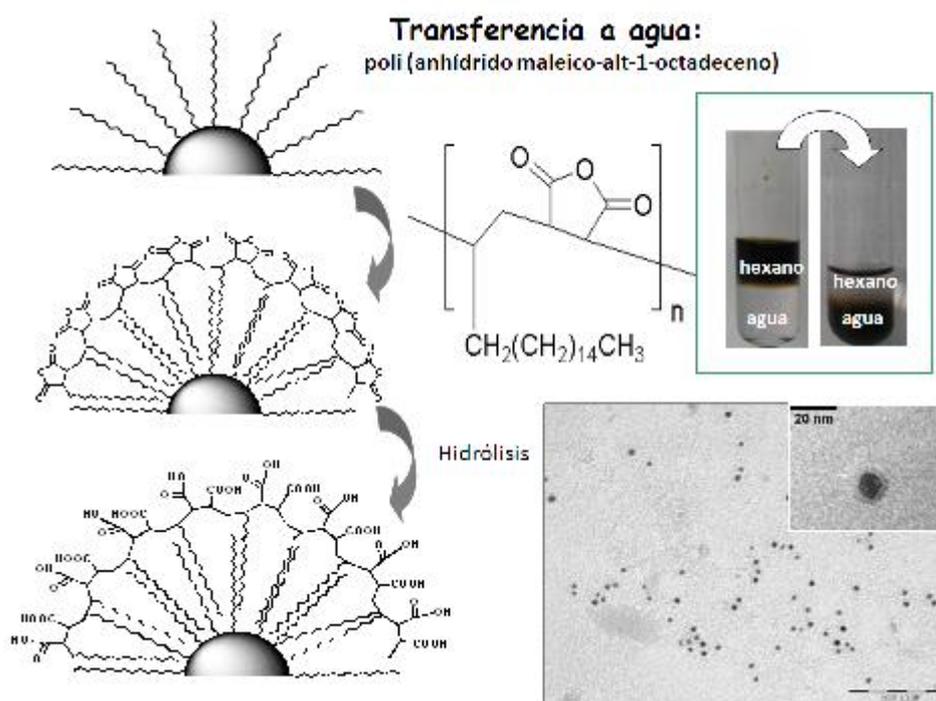
la lectina con la que puede interactuar. A su vez, debido a su reducido tamaño, su área superficial es muy grande, lo cual permite funcionalizarlas con densidades de carbohidratos muy superiores a las máximas alcanzadas con otro tipo de materiales microestructurados. Por último, al ser magnéticas, la unión específica de la lectina puede generar cambios en la capacidad de las mismas de alterar los tiempos de relajación ( $T_2$ ) de los protones del agua, y esto permitiría detectar y cuantificar la interacción de forma directa sin necesidad de marcajes secundarios.

Con el objetivo de evaluar la interacción entre la lectina del hongo *Gymnopilus spectabilis* (GSL) y partículas derivatizadas con carbohidratos se derivatizaron nanopartículas magnéticas con monosacáridos (mediante unión covalente) y se estudiaron las interacciones entre estas gliconanopartículas y GSL mediante detección de la agregación específica de las MNPs por cambios en los tiempos de relajación de los protones del agua utilizando un relaxómetro de sobremesa (Minispec).

### **Funcionalización de nanopartículas magnéticas (MNPs) con carbohidratos**

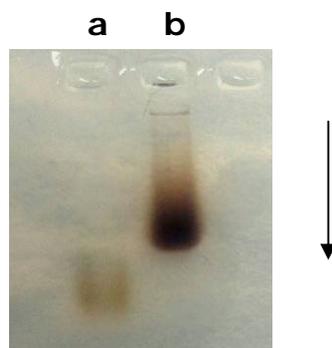
A diferencia de las MNPs utilizadas en la purificación de la lectina de *P. sanguineus*, las MNPs utilizadas para estos ensayos no fueron de origen comercial sino sintetizadas en el Instituto de Nanociencia de Aragón. Debido a que la interacción de la lectina con las MNPs se detecta por cambios en los valores de  $T_2$  causados por cambios en el estado de agregación de las MNPs, es fundamental utilizar MNPs con una alta estabilidad coloidal. De esta manera los cambios en  $T_2$  se pueden relacionar con cambios en agregación por interacción específica de las MNPs y no por desestabilización coloidal de las mismas. Las MNPs comerciales utilizadas anteriormente no tienen una buena estabilidad coloidal, y pequeños cambios de pH o fuerza iónica pueden generar su

agregación de forma inespecífica. Estas MNPs no son por lo tanto las más adecuadas para este tipo de estudios. Las MNPs seleccionadas para estos ensayos fueron sintetizadas en el grupo BioNanoSurf. Estas MNPs presentan las siguientes características: diámetro de 8 nm, estables con el tiempo y frente a un amplio intervalo de pH y fuerza iónica (Moros *et al.* 2010). Se sintetizan en medio orgánico (hexano) por descomposición térmica del precursor acetilacetonato de hierro ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ), y son estabilizadas con ácido oleico. Se utiliza un polímero anfifílico (poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno, PMAO)) para transferirlas a medio acuoso. La Figura 4.43 muestra un esquema del proceso de síntesis e imágenes de TEM de dichas MNPs donde claramente se observa una distribución homogénea de las MNPs comparado con la formación de acúmulos observado en las imágenes de TEM de las MNPs comerciales (Figura 4.16).



**Figura 4.43. Esquema de la síntesis de las MNPs recubiertas de PMAO e imagen de TEM de las mismas. Imagen cedida por M. Moros (Moros *et al.* 2010)**

Para los estudios de interacción con la GSL estas MNPs se funcionalizaron con Man y Glc aminadas. Dicha glicosilación se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa. En la Figura 4.44 se muestra la corrida electroforética donde se observa un retardo de las MNPs glicosiladas con respecto a las MNPs control. Este retardo estaría indicando que al unirse la Man a las MNPs la densidad superficial de carga negativa sería menor y por lo tanto la migración es menor.



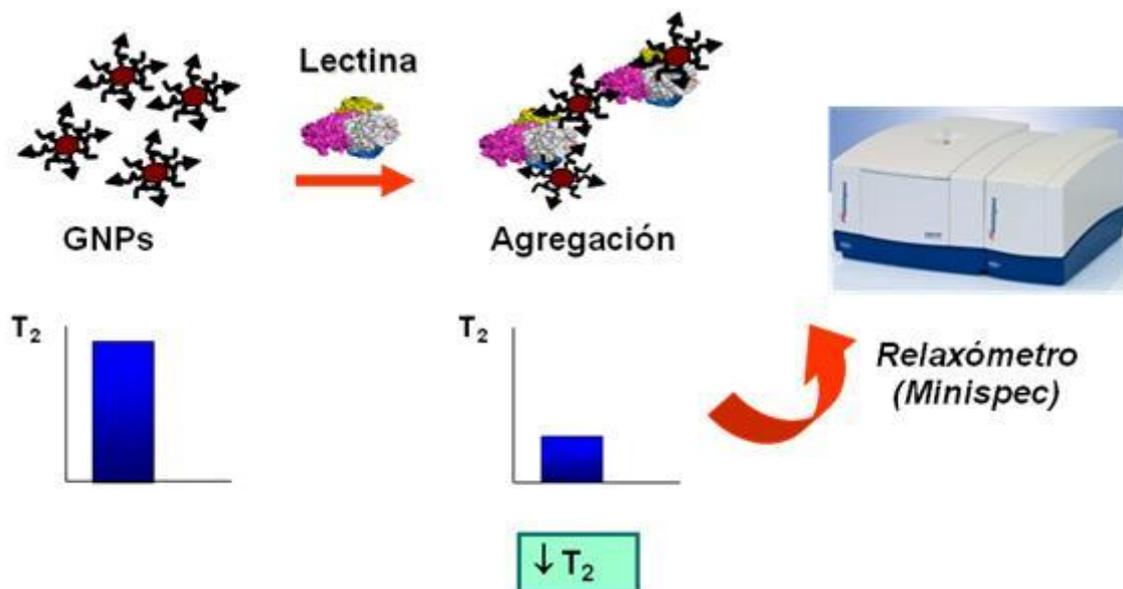
**Figura 4.44.** Electroforesis en gel agarosa 2%. a:MNPs control, b:Man-MNPS. La flecha indica la dirección del campo eléctrico de – a +.

### **Estudios de agregación entre las glico-MNPs y GSL**

La resonancia es un fenómeno físico por el cual los átomos de hidrógeno, muy abundantes en los tejidos biológicos, pueden absorber selectivamente energía de radiofrecuencia al ser colocados bajo un potente campo magnético. Sin embargo los protones del agua tienden a situarse de nuevo en su estado basal devolviendo el exceso energético mediante la liberación de ondas de radiofrecuencia en un proceso denominado relajación. Esta energía liberada se mide en tiempos de relajación variables en el tiempo y en los distintos planos ( $T_1$  relajación longitudinal,  $T_2$  relajación transversal). Es sabido que las nanopartículas superparamagnéticas son buenos agentes de contraste pues modifican los tiempos de relajación transversal del agua (Perez *et al.* 2004; Mastumoto y Jasanoff 2008). Sin embargo el grado de modificación depende del

estado coloidal de las MNPs ya que ha sido descrito que la agregación de las mismas acorta de forma drástica los valores de  $T_2$ . Este fenómeno fue utilizado por el Prof. Weissleder para desarrollar biosensores, acoplando la presencia del analito a detectar con la agregación de MNPs funcionalizadas con el elemento biológico de reconocimiento adecuado (Perez *et al.* 2002). Este tipo de biosensores presenta varias ventajas. Al usar impulso de radiofrecuencia es un método de detección directo sin necesidad de marcajes secundarios con biomoléculas etiquetadas con fluoróforos, enzimas, etc. Esto simplifica el ensayo y lo hace a su vez indiferente a las múltiples interferencias que pueden presentar los métodos de detección colorimétricos. A su vez los cambios en  $T_2$  se miden por medio de un relaxómetro de sobremesa (Minispec). Este equipo es muy fácil de utilizar por lo que no es necesario personal calificado. Por último se pueden alcanzar límites de sensibilidad muy elevados (Perez *et al.* 2002).

En el trabajo realizado en esta tesis se optimizó esta estrategia para la detección de la interacción de la lectina de *G. spectabilis* con MNPs glicosiladas. Dado que la GSL presenta más de un sitio de unión a carbohidratos se espera que la lectina, al reconocer MNPs funcionalizadas con un carbohidrato al cual reconoce de forma específica, genere la agregación de las MNPs. Esta aglutinación se puede detectar a través de la monitorización de los cambios en  $T_2$ , mediante el uso de un RMN pulsado de sobremesa (Minispec) (Figura 4.45).



**Figura 4.45.** Detección de cambios de  $T_2$  por agregación específica de MNPs glicosiladas (GNPs) por reconocimiento específico de GSL

Es así que se estudió la agregación entre las MNPs glicosiladas y la lectina mediante medidas de  $T_2$  a distintos tiempos de incubación. Tanto para Man-MNPs como para Glc-MNPs, en presencia de lectina se observa una disminución en el tiempo de relajación  $T_2$  con respecto a las MNPs control, lo que indica que la lectina está reconociendo de forma específica las MNPs glicosiladas y por lo tanto se produce agregación. Esta disminución es más rápida para Man-MNPs (Figura 4.46).

La agregación de Man-MNPs estaría confirmando el reconocimiento de Man por la lectina, como previamente había ocurrido en solución, mediante los ensayos de inhibición de HAG.

A su vez, también es interesante el resultado obtenido para Glc-MNPs ya que este reconocimiento por la GSL (aunque menor que para Man) no había sido detectado con los ensayos previos; esto podría atribuirse a una débil afinidad de la lectina por este monosacárido, la cual no es detectada por los ensayos de inhibición de HAG, pero sí a través de los ensayos con la MNPs dado que es posible unir glucosa a una elevada densidad por unidad de superficie.

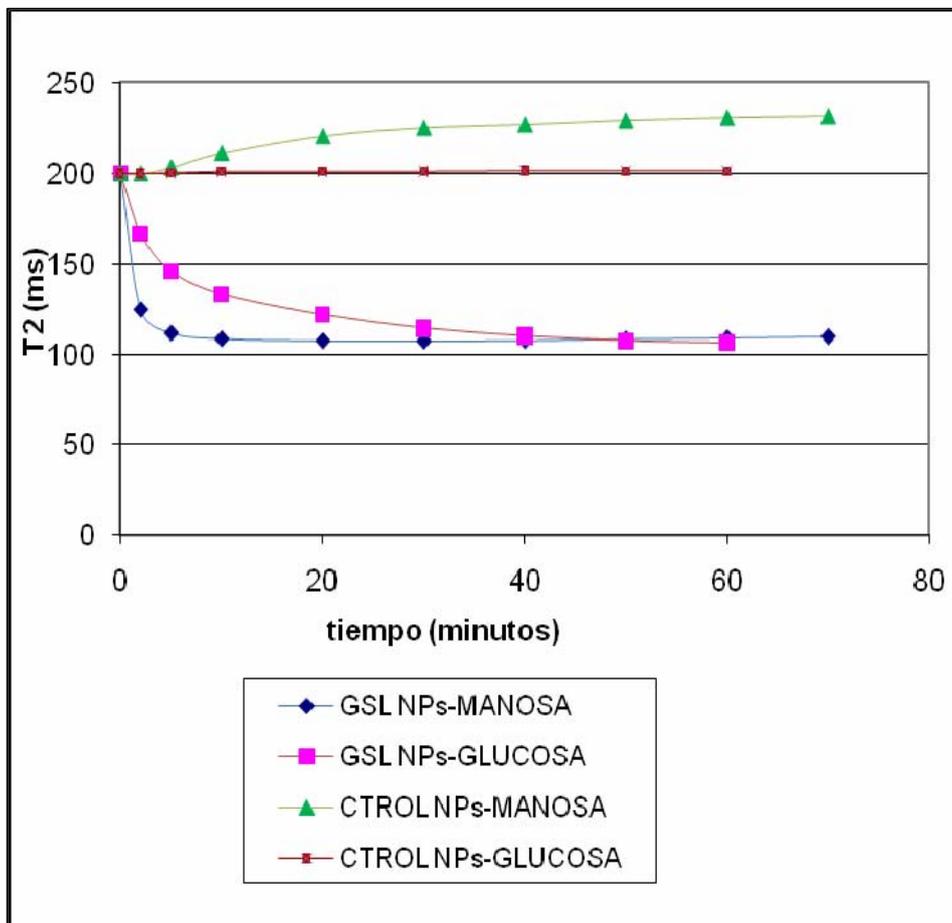


Figura 4.46. Medida de  $T_2$  en el tiempo de glico-MNPs en ausencia (CTRL) y presencia (GSL) de la lectina.

#### 4.7 Actividad antimicrobiana de las tres lectinas fúngicas

El uso de las lectinas como agentes antibacterianos o antifúngicos representa otra prometedora aplicación por lo cual se realizaron estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* con las lectinas fúngicas producidas en esta tesis. La actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas y negativas ocurre a través de la interacción de la lectina con componentes de la pared celular bacteriana incluyendo ácidos teicoicos, peptidoglicanos y lipopolisacáridos. La inhibición del crecimiento fúngico puede ocurrir a través de la unión de la lectina a las hifas resultando en una pobre absorción de nutrientes, en la interrupción de la síntesis de la pared celular, así como en la interferencia en el proceso de germinación de esporas. Probablemente las propiedades de unión a carbohidratos estén involucrados en los mecanismos antifúngicos y lectinas de distintas especificidades puedan promover distintos efectos (Paiva *et al.* 2010).

Como se mencionó, entre el gran número de lectinas de origen vegetal publicadas a la fecha se han descrito algunas con actividad antimicrobiana (Tabla 1.1). Además, dicha actividad antimicrobiana ha sido también evaluada en algunas lectinas de origen fúngico como ser las lectinas de los hongos *Schizophyllum commune* y *Pleurotus citrinopileatus*, pero en ninguno de los casos estas lectinas produjeron inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados (Han *et al.* 2005; Chumkhunthod *et al.* 2006; Li *et al.* 2008).

Para evaluar dicha actividad antimicrobiana en los extractos fúngicos de partida y en las lectinas purificadas en este trabajo se realizaron estudios *in vitro*: método de difusión en agar y determinación de concentración inhibitoria mínima (CIMm). Los microorganismos testeados fueron representativos de distintos grupos: una bacteria gram+ (*Staphylococcus aureus*), una bacteria gram- (*Escherichia coli*), una levadura (*Candida albicans*) y un hongo filamentoso (*Aspergillus niger*). Como se describió en la *Introducción*, dentro de estas especies estudiadas

se encuentran microorganismos patógenos, resistentes, oportunistas, agentes etiológicos de infecciones en sangre, piel, pulmones, etc.

#### **4.7.1 *Punctularia atropurpurascens***

Se realizó el ensayo de difusión en agar con el extracto crudo proveniente de micelio de *P. atropurpurascens*, el cual presentaba actividad HAG (Tabla 4.2) y con la lectina purificada por cromatografía de afinidad en quitosan-Sepharose.

La Figura 4.47a muestra un halo de inhibición del crecimiento de *A. niger* producida por el extracto crudo. El mismo resultado se obtuvo con la lectina purificada por cromatografía de afinidad. La CIM<sub>m</sub> determinada para PAL fue de 0.08 mg/ ml (Tabla 4.14), resultado similar al obtenido para lectinas de diferente origen frente a otros microorganismos (Nunes *et al.* 2011). De acuerdo a los resultados de inhibición de la HAG obtenidos para PAL (Tabla 4.3) esta lectina reconoce Glc-NAc, quitobiosa, quitotriosa, quitosano y quitina. Se ha demostrado que muchas lectinas de origen vegetal que reconocen Glc-NAc, sus oligómeros y quitina, poseen actividad antifúngica (Sitohy *et al.* 2007); el polisacárido quitina es constituyente de las paredes celulares de hongos y la interrupción en la síntesis y/o deposición de quitina en la pared celular podría ser la razón de la acción antifúngica (Paiva *et al.* 2010).

Estos resultados ubican a PAL como un potencial agente contra *Aspergillus niger*.

Para los otros microorganismos testeados los extractos de *P. atropupurascens* no produjeron inhibición del crecimiento en las condiciones ensayadas.

#### 4.7.2 *Pycnopus sanguineus*

El extracto crudo proveniente de micelio de *P. sanguineus* con actividad HAG (Tabla 4.2) inhibió el crecimiento de *E. coli* en el ensayo de difusión en agar (Figura 4.47b). Esta inhibición también se observó con PSL proveniente de las diferentes purificaciones ensayadas: Man-Sepharose y Gal-Sepharose y DEAE-Cellulose. La CIM<sub>m</sub> determinada para PSL (proveniente de la purificación en DEAE-Cellulose) fue de 0.5 mg/ ml (Tabla 4.14).

Las bacterias Gram - como *E. coli* presentan varios tipos de carbohidratos formando parte de los componentes de sus paredes: son así muy abundantes la Glc-NAc y N-acetil murámico en la capa de peptidoglicano y los monosacáridos Glc, Gal, ramnosa y Glc-NAc, entre otros, formando parte del lipopolisacárido (Madigan *et al.* 2004). En particular en *E. coli* se ha demostrado la presencia de Man, Gal y ramnosa en el lipopolisacárido de esta bacteria (L'Vov *et al.* 1984) así como Gal, Man y fucosa en la superficie celular de 5 serotipos de *E. coli* enteropatógenos (Mangia *et al.* 1999). De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de HAG (Tabla 4.3) la lectina de *P. sanguineus* posee una especificidad bastante amplia frente a monosacáridos, en particular frente a los mencionados, y el reconocimiento de estos carbohidratos por PSL podría ser el responsable de la inhibición del crecimiento bacteriano.

El crecimiento de *C. albicans*, *A. niger* y *S. aureus* no fue inhibido ni por los extractos provenientes de *P. sanguineus* ni por la lectina purificada.

### 4.7.3 *Gymnopilus spectabilis*

El extracto crudo proveniente de cuerpos de fructificación (Tabla 4.2), así como la lectina purificada por cromatografía de intercambio iónico del hongo *Gymnopilus spectabilis* fueron utilizadas para los estudios *in vitro* de actividad antimicrobiana.

En el ensayo de difusión en agar el extracto crudo de *G. spectabilis* sólo produjo un halo de inhibición del crecimiento cuando se evaluó contra *A. niger*. Sin embargo, al realizar el ensayo con la lectina purificada se observó inhibición tanto de *A. niger* como también de *S. aureus* (Figura 4.47c y 4.47d).

La pared de las bacterias gram + está constituida por peptidoglicanos y ácidos teicoicos. Los ácidos teicoicos incluyen todos los polímeros de la pared, de la membrana o capsulares que contienen residuos de glicerofosfato o de fosfato de ribitol. Estos polioles están conectados mediante ésteres fosfato y suelen ir unidos a otros azúcares y a la D-alanina (Madigan *et al.* 2004). Se ha reportado la presencia de galactosamina en la estructura del exopolisacárido en *Staphylococcus sp.* (Bowden 1969) así como de Man en *S. aureus* (Abraham *et al.* 2009). En los ensayos realizados en esta tesis con GSL dichos monosacáridos produjeron inhibición de la HAG lo que podría indicar un reconocimiento de estos carbohidratos en la estructura bacteriana que produjera la inhibición del crecimiento de *S. aureus*.

La concentración inhibitoria mínima determinada para esta lectina purificada fue de 1.25 mg/ ml para *A. niger* y 5.0 mg/ ml para *S. aureus* (Tabla 4.14). Aunque ya se había detectado inhibición del crecimiento de *A. niger* con PAL los valores de CIM<sub>m</sub> fueron superiores cuando se realizó el ensayo con GSL, demostrando un mayor potencial inhibidor de PAL contra esta cepa fúngica.

En el ensayo de difusión en agar realizado con el extracto crudo y con GSL contra *C. albicans* y *E.coli* no se detectó inhibición del crecimiento.

**Tabla 4.14. Actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos fúngicos con actividad lectina**

Extractos	Microorganismos evaluados			
	<i>E.coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
<i>Punctularia atropurpurascens</i>	-	-	-	+
PAL eluida quitosan-Sepharose	-	-	-	+
				CIM: 0.08 mg/ml
<i>Gymnopilus spectabilis</i>	-	-	-	+
GSL eluida DEAE-Cellulose	-	+	-	+
		CIM: 5.0 mg/ml		CIM: 1.25 mg/ml
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	+	-	-	-
PSL del percolado de Gal-Sepharose	+	-	-	-
PSL eluida Man-Sepharose	+	-	-	-
PSL eluida DEAE-Cellulose	+	-	-	-
	CIM: 0.5 mg/ml			

(+): se observa inhibición del crecimiento en ensayos de difusión en agar

(-): no se observa inhibición del crecimiento en ensayos de difusión en agar

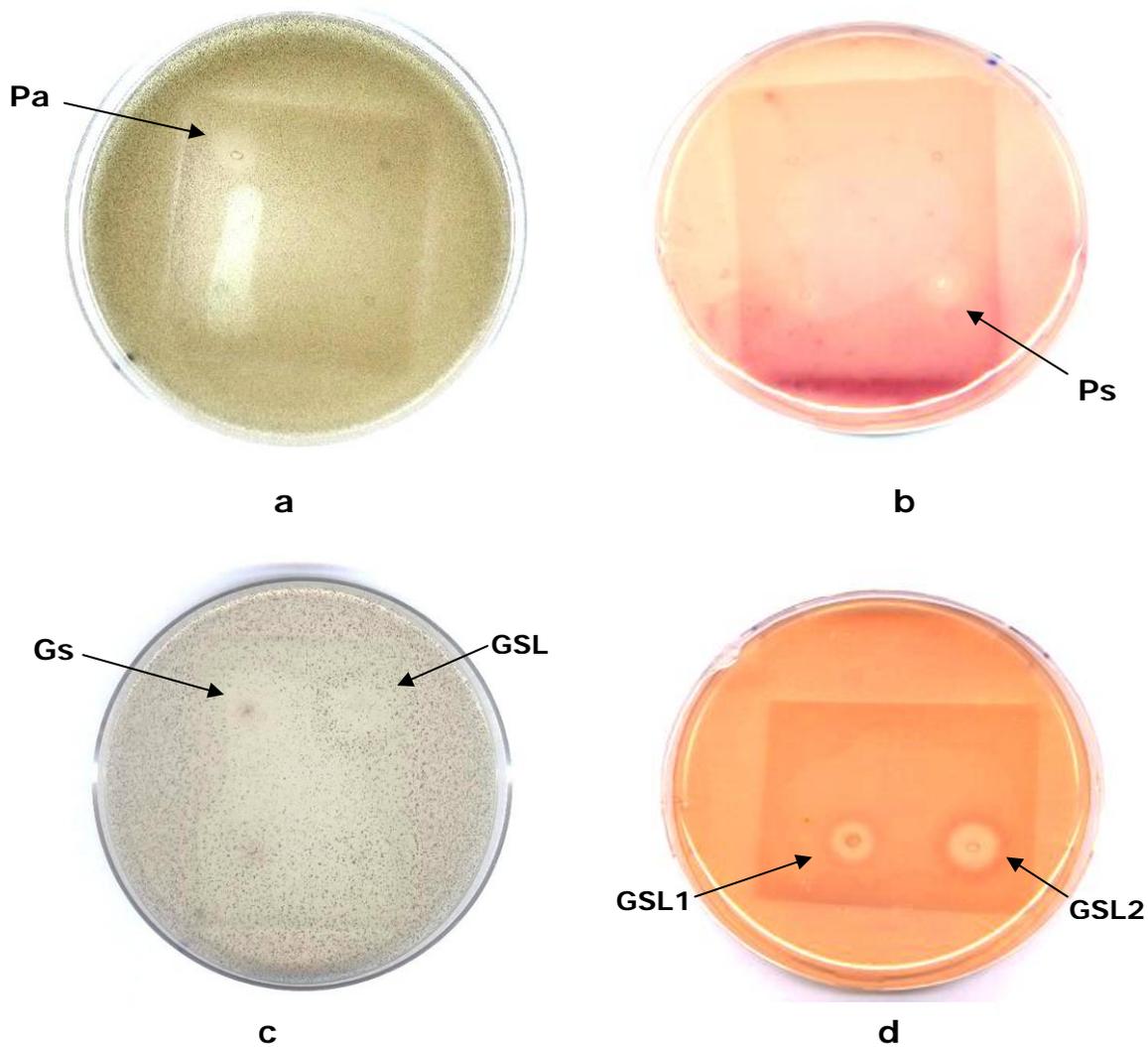


Figura 4.47. Estudio de actividad antimicrobiana de extractos fúngicos por método de difusión en agar. Placas a y c: ensayo contra *Aspergillus niger* (ATCC 16404). Pa: extracto con actividad lectina proveniente del cultivo de *P. atropurpurascens*. Gs: extracto con actividad lectina del hongo *G. spectabilis*. GSL: lectina de *G. spectabilis* purificada por cromatografía de intercambio iónico. Placa b: ensayo contra *Escherichia coli* (ATCC 11105). Ps: extracto con actividad lectina proveniente del cultivo de *P. sanguineus*. Placa d: ensayo contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). GSL1: fracción 1 eluida de la purificación por cromatografía de intercambio iónico de la lectina de *G. spectabilis*. GSL2: fracción 2 eluida de la purificación por cromatografía de intercambio iónico de la lectina de *G. spectabilis*

Merece destacarse lo novedoso de los resultados obtenidos en este trabajo ya que si bien se han publicado diversos ensayos de actividad antimicrobiana con lectinas fúngicas frente a distintos microorganismos, en ninguno de los casos reportados las lectinas fúngicas habían producido inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados (Wong *et al.* 2010).

## 5. CONCLUSIONES

Se realizó el primer relevamiento acerca de presencia de lectinas en cepas de hongos basidiomicetes provenientes de colectas realizadas en montes en nuestro país, lo que permitió detectar actividad HAG en varias de ellas, demostrando su potencialidad como fuente de nuevas lectinas. Este primer relevamiento permitió, en base a la actividad específica de los extractos preparados, seleccionar como fuentes para la purificación de lectinas a los extractos de *Gymnopilus spectabilis*, *Pycnoporus sanguineus* y *Punctularia atropurpurascens*.

Usando metodologías de afinidad y de intercambio iónico se purificaron 3 nuevas lectinas a partir de 3 especies fúngicas: una lectina a partir de micelio de *Punctularia atropurpurascens*, una a partir de cuerpos de fructificación de *Gymnopilus spectabilis* y otra lectina a partir de micelio de *Pycnoporus sanguineus*. Esta última se purificó además, usando una novedosa metodología, mediante el uso de gliconanopartículas magnéticas.

Si bien el objetivo central del trabajo fue, luego de identificarlas, producir estas lectinas con pureza adecuada para su evaluación con fines concretos como los que se mencionan más adelante, se avanzó también en el conocimiento acerca de algunas propiedades de estas proteínas, entre ellas se determinaron los pesos moleculares de las subunidades de las lectinas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y el pI de las lectinas mediante IEF. En el caso de PAL se determinó el peso molecular de la subunidad siendo de 67.6 kDa y un pI de 5.0. Se trata de una glicoproteína con un 16 % de carbohidratos. En el caso de PSL, en las fracciones provenientes de las tres estrategias de purificación utilizadas se detectó un doblete de bandas de 68.7 y 55.2 kDa y el IEF mostró dos bandas de pI 5.2 y 5.5. La GSL purificada por cromatografía de afinidad con Man-Sepharose y por intercambio iónico mostró dos bandas de 64.4 y

52.1 kDa. El IEF muestra dos bandas de pI 5.1 y 5.3. Es una glicoproteína con 16 % de contenido en carbohidratos, es estable en el rango de pH 2-8 por exposición durante 18 hs y se inactiva completamente a temperaturas mayores de 80 °C durante 30 minutos de exposición. Estos resultados abren una gran perspectiva de trabajo en cuanto a la caracterización bioquímica de las mismas, como se menciona en *Perspectivas*.

En particular, resulta muy interesante el reconocimiento alcanzado entre GSL y los ácidos glucurónico, galacturónico y siálico, hecho para nada común en lectinas tanto vegetales como fúngicas. Y más aún, el reconocimiento con alta afinidad frente al ácido siálico ya que no se dispone comercialmente de lectinas con especificidades hacia ácido siálico; al momento las más reportadas en la literatura son las lectinas vegetales de *Sambucus nigra* y de *Maackia amurensis*. Ello genera enormes posibilidades de aplicaciones a la lectina de *Gymnopilus spectabilis*, fundamentalmente en estudios frente a glicoproteínas animales.

Las 3 nuevas lectinas fúngicas aisladas y purificadas fueron utilizadas con dos finalidades diferentes. Por un lado se utilizaron como ligandos de afinidad para la síntesis de 3 nuevos adsorbentes y se evaluaron sus capacidades de interaccionar frente a diferentes glicoproteínas modelo, seleccionadas en base a sus potenciales usos a nivel biotecnológico, como se mencionó en los Antecedentes.

GSL-Sepharose fue el más efectivo en el reconocimiento de PMSG, permitiendo separar al menos dos subpoblaciones de glico-isoformas, una en el percolado (51 %) y otra mediante elución competitiva (49%). El mismo análisis se puede realizar en el caso de la glicoproteína TF, que es mejor reconocida por PSL-Sepharose, donde una glico-isoforma se recupera en el percolado de la columna (45%) y otra en el eluido (55%).

El adsorbente PAL-Sepharose fue el más eficiente en reconocer LF bovina (60%). Este alto % de recuperación de la glicoproteína en el eluido acerca mucho a este adsorbente a ser utilizado en procesos de purificación de esta glicoproteína. Entonces, dentro de las perspectivas se incluye la preparación de adsorbentes con diferentes propiedades a las producidas en este trabajo. Finalmente la FT, otra glicoproteína de importancia biotecnológica, es adsorbida en % similares pero más bajos, por PSL-Sepharose (27%) y PAL-Sepharose (21%).

Es decir, que hay un reconocimiento diferencial entre estas nuevas lectinas y ciertas subpoblaciones de glicoproteínas, por lo que presentan enormes potencialidades.

Y por otro lado, las tres lectinas fúngicas aisladas y purificadas en esta tesis exhiben actividad antimicrobiana *in vitro* frente a diferentes microorganismos: PAL inhibió el crecimiento de *A. niger* con una CIM de 0.08 mg/ml; PSL inhibió el crecimiento de *E. coli* con una CIM de 0.5 mg/ml; GSL inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *A. niger* con una CIM de 5 mg/ml para *S. aureus*. Estos resultados son de enorme relevancia, dada la importancia microbiológica de los 4 microorganismos testeados.

En resumen, a partir de una colección de hongos locales se aislaron y purificaron 3 nuevas lectinas las cuales presentan propiedades antimicrobianas *in vitro*, hecho casi inusual con lectinas fúngicas reportadas a la fecha. A su vez, estas lectinas demostraron ser buenos ligandos de afinidad para el desarrollo de bioadsorbentes con potenciales aplicaciones en la separación de glicoisofomas de glicoproteínas de interés tanto en diagnóstico clínico como en purificación de las mismas.

## 6. PERSPECTIVAS

Esta tesis se centró principalmente en la detección de potenciales nuevas lectinas de origen fúngico y en su uso como herramientas bioquímicas con diferentes aplicaciones. Entre los reportes sobre algunas lectinas fúngicas, resultó de enorme importancia el antecedente descrito acerca de las particulares especificidades que algunas de ellas mostraron hacia glicoproteínas animales. Esto, unido a la gran demanda de desarrollo de nuevas herramientas que puedan contribuir a mejorar los procesos de producción de muchas de estas glicoproteínas llevó a encarar en esta tesis la búsqueda de nuevas lectinas en materiales disponibles en nuestro país. La estrategia de trabajo se enfocó directamente en la evaluación de la presencia de lectinas mediante un amplio relevamiento sobre distintas especies de hongos y una vez identificadas, se procedió a su purificación y evaluación con los fines propuestos en los objetivos de la tesis.

Los resultados obtenidos muestran 3 nuevas lectinas fúngicas aisladas y purificadas y con enormes potencialidades de aplicaciones.

Por un lado, ello permite ahora retomar los estudios bioquímicos que conduzcan a un mejor conocimiento estructural acerca de estas proteínas. Todos los estudios que se realicen en ese sentido para su caracterización contribuirán no sólo a incrementar el conocimiento acerca de estas proteínas, sino que contribuirá además a diseños más racionales de herramientas biotecnológicas.

En cuanto a los procesos de producción a partir de micelio de los hongos estudiados, éstos provienen de fermentaciones realizadas durante 14 días y en diferentes medios de cultivo. En estudios previos con otras lectinas se ha observado que la producción de lectina acompaña el

crecimiento fúngico (Tsvileva *et al.* 2005). Curvas de crecimiento realizadas para *Punctularia atropurpurascens* en el medio agua de malta indicaron que al día 14 el hongo se encuentra en fase de crecimiento exponencial por lo que la actividad lectina se detectaría en esta fase (Alborés 2002). Sin embargo no hay antecedentes para los otros hongos estudiados. Sería interesante entonces en el futuro determinar la producción de lectina a los distintos días del crecimiento fúngico.

A nivel de la posible producción de estas lectinas fúngicas en forma controlada y a mayor escala, sería muy interesante evaluar la expresión de lectinas recombinantes, basado en el aislamiento de cDNA o DNA genómico de la lectina, su inserción en un vector adecuado y expresión en una célula huésped apropiada (Sharon y Lis 2007). Las lectinas de los hongos *Aleuria aurantia* (Olausson *et al.* 2008), *Xerocomus chrysenteron* (Trigueros *et al.* 2003) y *Agrocybe aegerita* (Yang *et al.* 2005) han sido producidas con esta tecnología y evaluadas con promisorios resultados.

Los resultados obtenidos con los adsorbentes de afinidad abren enormes posibilidades de estudios en este campo. Por un lado, los adsorbentes sintetizados podrían seguir evaluándose frente a otras glicoproteínas de interés biotecnológico. Y por otro lado, la posibilidad de contar con mayores cantidades de las lectinas purificadas permitiría encarar la síntesis de adsorbentes con mayor densidad de ligando inmovilizado. Ello permitiría evaluar si se modifica el comportamiento observado entre cada lectina fúngica inmovilizada y la glicoproteína en estudio.

El empleo de nanopartículas glicosiladas para la purificación de una lectina representa una novedosa metodología la cual dio muy buenos resultados en la purificación de la lectina de *Pycnoporus sanguineus* por lo que su uso puede extenderse a la purificación de otras lectinas. Los

resultados obtenidos en los estudios de agregación de gliconanopartículas con la lectina de *Gymnopilus spectabilis* son muy prometedores para el desarrollo de un biosensor que permita el estudio de interacciones lectina-carbohidrato mediante la detección de la agregación específica de MNPs funcionalizadas con distintos carbohidratos. Es así que la realización de este trabajo permitirá continuar con estudios en el área de la nanociencia, un área de investigación pionera para el avance de la Glicómica.

Así como muchos productos naturales han encontrado aplicaciones terapéuticas en humanos, es posible que en el futuro nuevas proteínas antimicrobianas como las lectinas puedan ser exitosamente explotadas no sólo en agricultura sino también en medicina. En vista del desarrollo de resistencia microbiana y las reacciones colaterales producidas por algunas de las drogas ahora disponibles, en el futuro estas proteínas naturales pueden ser desarrolladas para su uso como terapias alternativas. Cuanto más se descubra y se investigue acerca de estos agentes antimicrobianos, el hombre hará mejor uso de ellos en la prevención de enfermedades. En este contexto la actividad antimicrobiana detectada en los ensayos son muy interesantes y en ensayos posteriores debería evaluarse dicha actividad frente a un espectro más amplio de microorganismos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham M, Venter P, Lues J, Ivanon I y de Smidt O (2009) The exopolysaccharide (EPS) ultra structure of *Staphylococcus aureus*: changes occurring in EPS resulting from exposure to physical and chemical food preservation practises in South Africa. *Annals of Microbiology* 59:499-503
- Aguila A y Brock J (2001) Lactoferrin: Antimicrobial and Diagnostic Properties *Biotecnología Aplicada* 28:76-83
- Alborés S (2002) Sistema ligninolítico de *Punctularia atropurpurascens*. Tesina de final de Carrera de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de la República. Uruguay.
- Barrientos A, de la Fuente J, Rojas T, Fernandez A y Penades S (2003) Gold glyconanoparticles: Synthetic polyvalent ligands mimicking glycoalyx-like surfaces as tools for glycobiological studies. *Chem-Eur J* 9:1909-1921
- Bourne Y, Ayoub A, Rouge P y Cambillau C (1994) Interaction of a legume lectin with two components of the bacterial cell wall. *The Journal of Biological Chemistry* 269:9429-9435
- Bowden GH (1969) The components of the cell walls and extracellular slime of four strains of *Staphylococcus salivarius* isolated from human dental plaque. *Archives of Oral Biology* 14:685-697
- Bryan MC, Plettenburg O, Sears P, Rabuka D, Wacowich-Sgarbi S y Wong CH (2002) Saccharide display on microtiter plates. *Chemistry and Biology* 9:713-720
- Butschi A, Titz A, Walti MA, Olieric V, Paschinger K, Nabauer K, Guo X, Seeberger PH, Wilson IBH, Aebi M, Hengartner MO y Kanzler M (2010) Caenorhabditis elegans N-glycan Core b-galactoside confers sensitivity towards nematotoxic fungal galectin CGL2. *PLoS Pathogens* 6
- Cartellieri S, Hamer O, Helmholz H y Niemeyer B (2002) One-step affinity purification of fetuin from fetal bovine serum. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 35:83-89
- Conrad F y Rudiger H (1994) The lectin from *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization and interaction with a phosphatase. *Phytochemistry* 36:277-283
- Conrad F y Rüdiger H (1994) The lectin from *Pleurotus ostreatus*: Purification, characterization and interaction with a phosphatase. *Phytochemistry* 36:277-283
- Chen Z, Kai G, Liu X, Lin J, Sun X y Tang K (2005) cDNA cloning and characterization of a mannose-binding lectin from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. *Journal of biosciences* 30:213-220
- Chumkhunthod P, Rodtong S, Lambert SJ, Fordham-Skelton AP, Rizkallah PJ, Wilkinson MC y Reynolds CD (2006) Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1760:326-332
- Dawson R, Elliot D, Elliot W y Jones K (eds) (1969) *Data for Biochemical Research*, Second Edition., Oxford.
- de la Fuente JM y Penadés S (2004) Understanding carbohydrate-carbohydrate interactions by means of glyconanotechnology. *Glycoconjugate J.* 21:149-163
- de la Fuente JM y Penadés S (2005) Glyco-quantum dots: a new luminescent system with multivalent carbohydrate display. *Tetrahedron: Asymmetry* 16:387-391
- de la Fuente JM y Penadés S (2006) Glyconanoparticles: Types, synthesis and applications in glycoscience, biomedicine and material science. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1760:636-651
- Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G y Montreuil J (1981) Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry* 117:41-55
- Drickamer K y Dodd RB (1999) C-type lectin-like domains in *Caenorhabditis elegans*: Predictions from the complete genome sequence. *Glycobiology* 9:1357-1369

- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA y Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugar relates substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356
- Durand G y Seta N (2000) Protein glycosylation and diseases: Blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clinical Chemistry* 46:795-805
- Faber J, Moritz N, Henninger N, Zepp F y Knuf M (2009) Rapid detection of common pathogenic *Aspergillus* species by a novel real-time PCR approach. *Mycoses* 52:228-233
- Franco Fraguas L, Batista-Viera F y Carlsson J (2003a) Isolation of a  $\beta$ -galactoside-binding lectin from cat liver. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36:447-457
- Franco Fraguas L, Bolón V y Batista-Viera F (2001) Affinity immobilization of b-galactosidase from *Aspergillus oryzae* on lectin-based adsorbents. *Electronic Lectin Journal* 13:1-19
- Franco Fraguas L, Carlsson J y Lönnberg M (2008) Lectin affinity chromatography as a tool to differentiate endogenous and recombinant erythropoietins. *Journal of Chromatography A* 1212:82-88
- Franco Fraguas L, Pla A, Ferreira F, Massaldi H, Suarez N y Batista-Viera F (2003b) 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* 790:365-372
- Franco Fraguas L, Plá A, Ferreira F, Massaldi H, Suárez N y Batista-Viera F (2003c) 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* 790:365-372
- Gabius HJ (1994) Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins. *International Journal of Biochemistry* 26:469-477
- Gallego del Sol F, Nagano CS, Benildo SC, Sampaio AH, Sanz L y Calvete JJ (2006) Lectinas. *Investigación y Ciencia* 361:57-67
- Ganiko L, Puccia R, Mariano VS, Santanna OA, Freymaller E, Roque-Barreira MC y Travassos LR (2007) Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis* is involved in fungal growth. *Microbes and Infection* 9:695-703
- Giacomini C, Villarino A, Franco-Fraguas L y Batista-Viera F (1998) Immobilization of [beta]-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4:313-327
- Giollant M, Guillot J, Damez M, Dusser M, Didier P y Didier E (1993) Characterization of a lectin from *Lactarius deterrimus*: Research on the possible involvement of the fungal lectin in recognition between mushroom and spruce during the early stages of mycorrhizae formation. *Plant Physiology* 101:513-522
- Guillot J y Kanska G (1997) Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology* 25:203-230
- Han CH, Liu QH, Ng TB y Wang HX (2005) A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336:252-257
- Hernandez Cruz P, Perez Campos E, Martinez Martinez L, Ortiz B y Martinez G (2005) Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteina-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica* 1:21-27
- Hierholzer JC, Suggs MT y Hall EC (1969) Standardized Viral Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition Tests. II. Description and Statistical Evaluation. *Applied Microbiology* 5:824-823
- Ho JCK, Sze SCW, Shen WZ y Liu WK (2004) Mitogenic activity of edible mushroom lectins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1671:9-17
- Ilyina AV, Tikhonov VE, Albulov AI y Varlamov VP (2000) Enzymic preparation of acid-free-water-soluble chitosan. *Process Biochemistry* 35:563-568

- Jung EC, Kim KD, Bae CH, Kim JC, Kim DK y Kim HH (2007) A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1770:833-838
- Kawagishi H, Mitsunaga S-I, Yamawaki M, Ido M, Shimada A, Kinoshita T, Murata T, Usui T, Kimura A y Chiba S (1997) A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry* 44:7-10
- Kawagishi H, Suzuki H, Watanabe H, Nakamura H, Sekiguchi T, Murata T, Usui T, Sugiyama K, Suganuma H, Inakuma T, Ito K, Hashimoto Y, Ohnishi-Kameyama M y Nagata T (2000) A lectin from an edible mushroom *Pleurotus ostreatus* as a food intake-suppressing substance. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1474:299-308
- Kawagishi H, Takagi JI, Taira T, Murata T y Usui T (2001) Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. *Phytochemistry* 56:53-58
- Kawsar SMA, Mamun SMA, Rahman MS, Yasumitsu H y Ozeki Y (2010) Biological effects of a carbohydrate-binding protein from an annelid, *Perinereis nuntia* against human and phytopathogenic microorganisms. *International Journal of Biological and Life Sciences* 6:44-50
- Khan F, Ahmad A y Khan MI (2007) Interaction of *Fusarium solani* Lectin with Monosaccharides and Oligosaccharides: A Fluorometric Study. *Photochemistry and Photobiology* 83:966-970
- Khan F y Khan MI (2011) Fungal Lectins: Current molecular and biochemical perspectives. *International Journal of Biological Chemistry* 5:1-20
- Kilpatrick DC (2000) Mannan-binding lectin concentration during normal human pregnancy. *Human Reproduction* 15:941-943
- Koyama Y, Katsuno Y, Miyoshi N, Hayakawa S, Mita T, Muto H, Isemura S, Aoyagi Y y Isemura M (2002) Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas* in U937 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 66:784-789
- L'Vov VL, Shashkov AS, Dmitriev BA, Kochetkov NK, Jann B y Jann K (1984) Structural studies of the O-specific side chain of the lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O:7. *Carbohydrate Research* 126:249-259
- Lasne F, Martin L, Crepin N y De Ceaurriz J (2002) Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: Differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Analytical Biochemistry* 311:119-126
- Lehninger A, Nelson D y Cox M (eds) (1995) *Principios de Bioquímica*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, España.
- Leonidas DD, Swamy BM, Hatzopoulos GN, Gonchigar SJ, Chachadi VB, Inamdar SR, Zographos SE y Oikonomakos NG (2007) Structural Basis for the Carbohydrate Recognition of the *Sclerotium rolfsii* Lectin. *Journal of Molecular Biology* 368:1145-1161
- Li YR, Liu QH, Wang HX y Ng TB (2008) A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1780:51-57
- Liua WK, Ho JCK y Ng TB (2001) Suppression of cell cycle progression by a fungal lectin: Activation of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Biochemical Pharmacology* 61:33-37
- Lönnerberg M (2002) Membrane-assisted isoform immuno assay. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Sciences and Technology* 691:1-65
- Luzzaro F, Ortisi G, Larosa M, Drago M, Brigante G y Gesu G (2011) Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 69:363-369

- Madigan MT, Martinko JM y Parker J (eds) (2004) Brock: Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall
- Mangia A, Barreto A, Martins L y Costa F (1999) A Preliminary Investigation on the Chemical Composition of the Cell Surface of Five Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotypes. *Meorias do Instituto Oswaldo Cruz* 4:513-518
- Marty-Detraves C, Francis F, Baricault L, Fournier D y Paquereau L (2004) Inhibitory action of a new lectin from *Xerochomus chrysenteron* on cell-substrate adhesion. *Molecular and Cellular Biochemistry* 258:49-55
- Mastumoto Y y Jasanoff A (2008) T2 relaxation by clusters of superparamagnetic nanoparticles: Monte Carlo simulations. *Magnetic. Reson. Imaging* 26:994-998
- Mathews C, van Holde K y Ahern K (eds) (2002) Bioquímica. 3era edición. PEARSON EDUCACIÓN, S.A. Madrid, España.
- Matsumura K, Higashida K, Hata Y, Kominami J, Nakamura-Tsuruta S y Hirabayashi J (2009) Comparative analysis of oligosaccharide specificities of fucose-specific lectins from *Aspergillus oryzae* and *Aleuria aurantia* using frontal affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 386:217-221
- Medeiros DS, Medeiros TL, Ribeiro JKC, Monteiro NKV, Migliolo L, Uchoa AF, Vasconcelos IM, Oliveira AS, de Sales MP y Santos EA (2009) A lactose specific lectin from the sponge *Cinachyrella apion*: Purification, characterization, N-terminal sequences alignment and agglutinating activity on *Leishmania promastigotes*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology* 155:211-216
- Mo H, Winter HC y Goldstein IJ (2000) Purification and characterization of a Neu5Ac2-6Gal1-4Glc/GlcNAc- specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. *Journal of Biological Chemistry* 275:10623-10629
- Moore W y Ward D (1980) Pregnant mare serum gonadotropin. Rapid chromatographic procedures for the purification of intact hormone and isolation of subunits. *Journal of Biological Chemistry* 14:6923-6929
- Moros M, Pelaz B, López-Larrubia P, García-Martin ML, Grazú V y De La Fuente JM (2010) Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale* 2:1746-1755
- Nagata Y, Yamashita M, Honda H, Akabane J, Uehara K, Saito A, Sumisa F, Nishibori K y Oodaira Y (2005) Characterization, Occurrence, and Molecular Cloning of a Lectin from *Grifola frondosa*: Jacalin-Related Lectin of Fungal Origin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69:2374-2380
- NAID (2011) Antimicrobial resistance. National Institute of Allergy and Infectious Diseases.  
[http://www.wrongdiagnosis.com/artic/antimicrobial\\_resistance\\_niaid\\_fact\\_sheet\\_niaid.htm](http://www.wrongdiagnosis.com/artic/antimicrobial_resistance_niaid_fact_sheet_niaid.htm)
- Nakamura-Tsuruta S, Kominami J, Kamei M, Koyama Y, Suzuki T, Isemura M y Hirabayashi J (2006) Comparative analysis by frontal affinity chromatography of oligosaccharide specificity of GlcNAc-binding lectins, *Griffonia simplicifolia* lectin-II (GSL-II) and *Boletopsis leucomelas* lectin (BLL). *Journal of Biochemistry* 140:285-291
- Nikitina VE, Tsivileva OM, Pankratov AN y Bychkov NA (2007) *Lentinula edodes* biotechnology - From lentinan to lectins. *Food Technology and Biotechnology* 45:230-237
- Nunes E, de Souza MA, Vaz AF, Santana GM, Gomes F, Coelho LC, Paiva PM, da Silva RM, Silva-Lucca R, Oliva ML, Guarnieri M y Correia MT (2011) Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 159:57-63
- Oguri S, Ando A y Nagata Y (1996) A novel developmental stage-specific lectin of the basidiomycete *Pleurotus cornucopiae*. *Journal of Bacteriology* 178:5692-5698

- Olausson J, Tibell L, Jonsson BH y Pahlsson P (2008) Detection of a high affinity binding site in recombinant *Aleuria aurantia* lectin. *Glycoconjugate Journal* 8:753-762
- ONS (2010) Deaths involving MRSA: England and Wales, 2009. Office for National Statistics. <http://www.statistics.gov.uk/pdffdir/mrsa0810.pdf>
- Paaventhnan P, Joseph JS, Seow SV, Vaday S, Robinson H, Chua KY y Kolatkar PR (2003) A structure of Fve, a member of the new fungal immunomodulatory protein family. *Journal of Molecular Biology* 332:461-470
- Paiva PMG, Gomes FS, Napoleão TH, Sá RA, Correia MTS y Coelho LCB (2010) Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*:396-406
- Perez J, Josephson L, O'Loughlin T, Hogemann D y Weissleder R (2002) Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions. *Nature Biotechnology*:816-820
- Perez J, Josephson L y Weissleder R (2004) Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions. *ChemBioChem* 5:261-264
- Pfaller MA y Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*. 20:133-163
- Plá A, Alonso E, Batista-Viera F y Franco Fraguas L (2003) Screening for carbohydrate-binding proteins in extracts of Uruguayan plants. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36:851-860
- Pohleven J, Obermajer N, Sabotia J, Analovar S, Sepaia K, Kos J, Kralj B, Atrukelj B y Brzin J (2009) Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1790:173-181
- Presant CA y Kornfeld S (1972) Characterization of the Cell Surface Receptor for the *Agaricus bisporus* Hemagglutinin. *Journal of Biological Chemistry* 247:6937-6945
- Puertas S, Batala P, Moros M, Polo E, Del Pino P, Guisán J, Grazú V y de la Fuente JM (2011) Taking advantage of unspecific interactions to produce highly active magnetic nanoparticle antibody conjugates. *ACS Nano* 5:4521-4528
- Rahalison L, Hamburger M, Hostettman K, Monod M y Frenck E (1991) A bioautographic agar overlay method for the detection of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* 2:199-203
- Rini JM y Lobsanov YD (1999) New animal lectin structures. *Current Opinion in Structural Biology* 9:578-584
- Robinson A, Fang JM, Chou PT, Liao KW, Chu RM y Lee SJ (2005) Probing lectin and sperm with carbohydrate-modified quantum dots. *ChemBioChem* 6:1899-1905
- Rüdiger H y Gabius HJ (2002) Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal* 18:589-613
- Sanchez Riera A, Daud A, Gallo A, Genta S, Aybar M y Sanchez S (2003) Antibacterial activity of lactose-binding lectins from *Bufo arenarum* skin. *BIOCELL* 1:37-46
- Segal BH y Walsh TJ (2006) Current approaches to diagnosis and treatment of invasive aspergillosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 173:707-717
- Selitrennikoff C (2001) Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* 67:2883-2894
- Sharon N (2008) Lectins: Past, present and future. *Biochemical Society Transactions* 36:1457-1460
- Sharon N y Lis H (1997) Glycoproteins: structure and function *Glycosciences: status and perspectives*. (Gabius, H.J. & Gabius S. Eds.). Chapman & Hill, Weinheim.:133-162
- Sharon N y Lis H (eds) (2007) *Lectins*, second ed., 2 edn, Springer, The Netherlands
- She QB, Ng TB y Liu WK (1998) A novel lectin with potent immunomodulatory activity isolated from both fruiting bodies and cultured mycelia of the edible mushroom

- Volvariella volvacea. Biochemical and Biophysical Research Communications 247:106-111
- Sitohy M, Doheim M y Badr H (2007) Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian Pisum sativum seeds. Food Chemistry 104:971-979
- Skibeli V, Nissen-Lie G y Torjesen P (2001) Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. Blood 98:3626-3634
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ y Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analytical Biochemistry 150:76-85
- Stepanova LE, Nikitina VE y Boiko AS (2007) Isolation and characterization of lectin from the surface of Grifola frondosa (FR.) S.F. Gray mycelium. Mikrobiologija 4:488-493
- Stibler H, Borg S y Joustra M (1986) Micro anion exchange chromatography of carbohydrate-deficient transferrin in serum in relation to alcohol consumption (Swedish patent 8400587-5). Alcoholism: Clinical and Experimental Research 10:535-544
- Stibler H, Holzbach U y Kristiansson B (1998) Isoforms and levels of transferrin, antithrombin, antitrypsin and thyroxine-binding globulin in 48 patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation 58:55-62
- Sun EY, Weissleder R y Josephson L (2006) Continuous analyte sensing with magnetic nanoswitches. Small 2:1144-1147
- Swamy BM, Bhat AG, Hegde GV, Naik RS, Kulkarni S y Inamdar SR (2004) Immunolocalization and functional role of Sclerotium rolfsii lectin in development of fungus by interaction with its endogenous receptor. Glycobiology 14:951-957
- Thakur A, Rana M, Lakhanpal TN, Ahmad A y Khan MI (2007) Purification and characterization of lectin from fruiting body of Ganoderma lucidum: Lectin from Ganoderma lucidum. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1770:1404-1412
- Trigueros V, Lougarre A, Ali-Ahmed D, Rahbei Y, Guillot J, Chavant L, Fournier D y Paquereau L (2003) Xerocomus chrysenteron lectin: Identification of a new pesticidal protein. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 1621:292-298
- Tronchin G, Esnault K, Sanchez M, Larcher G, Marot-Leblond A y Bouchara J-P (2002) Purification and Partial Characterization of a 32-Kilodalton Sialic Acid-Specific Lectin from Aspergillus fumigatus. Infection and Immunity 70:6891-6895
- Tsivileva OM, Nikitina VE y Loshchinina EA (2008) Isolation and characterization of Lentinus edodes (Berk.) singer extracellular lectins. Biochemistry (Moscow) 73:1154-1161
- Tsivileva OM, Pankratov AN, Nikitina VE y Garibova LV (2005) Effect of media components on the mycelial film formation in submerged culture of Lentinus edodes (shiitake). Food Technology and Biotechnology 43:227-234
- Tsuda E, Goto M, Murakami A, Akai K, Ueda M y Kawanishi G (1988) Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins. Biochemistry 27:5646-5654
- Turner GA (1992) N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. Clinica Chimica Acta 208:149-171
- Ueda H, Matsumoto H, Takahashi N y Ogawa H (2002) Psathyrella velutina Mushroom Lectin Exhibits High Affinity toward Sialoglycoproteins Possessing Terminal N-Acetylneuraminic Acid2,3-Linked to Penultimate Galactose Residues of Trisialyl N-Glycans. Journal of Biological Chemistry 277:24916-24925
- Van Damme E, Peumans W, Pusztai A y Bardocz S (1998) Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

- Varki A (1993) Biological roles of oligosaccharides: All of the theories are correct. *Glycobiology* 3:97-130
- Varki A, Cummings R, Esko J, Freeze H, Hart G y Marth J (eds) (1999) *Essentials of Glycobiology*, California
- Vetchinkina EP, Nikitina VE, Tsivileva OM y Garibova LV (2008) Activity of *Lentinus edodes* intracellular lectins at various developmental stages of the fungus. *Applied Biochemistry and Microbiology* 44:66-72
- Wang H y Ng TB (2003) Isolation of a novel N-acetylglucosamine-specific lectin from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Protein Expression and Purification* 29:156-160
- Wang H, Ng TB y Liu Q (2002) Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Life Sciences* 70:877-885
- Wang HX, Ng TB y Ooi VEC (1998) Lectin activity in fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44:135-141
- Wang W, Cole AM, Hong T, Waring AJ y Lehrer RI (2003) Retrocyclin, an antiretroviral defensin, is a lectin. *Journal of Immunology* 170:4708-4716
- Wong JH, Ng TB, Cheung RCF, Ye XJ, Wang HX, Lam SK, Lin P, Chan YS, Fang EF, Ngai PHK, Xia LX, Ye XY, Jiang Y y Liu F (2010) Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 87:1221-1235
- Yang N, Tong X, Xiang Y, Zhang Y, Liang Y, Sun H y Wang DC (2005) Molecular character of the recombinant antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *Journal of Biochemistry* 138:145-150
- Yen M, Wu AM, Yang Z, Gong Y y Chang E (2011) Recognition roles of the carbohydrate glycotopes of human and bovine lactoferrins in lectin-N-glycan interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1810:139-149
- Zhao JK, Wang HX y Ng TB (2009) Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. *Toxicon* 53:360-366