



Herramientas basadas en Lectinas y su contribución al diagnóstico de enfermedades congénitas de glicosilación en neonatos

**Tesina correspondiente a la Licenciatura en
Bioquímica**

Luciana Ottonello

Tutoras: Dras. Cecilia Porciúncula González y Laura Franco Fraguas

Cátedra de Bioquímica

Facultad de Química

Setiembre 2025

RESUMEN

Las alteraciones congénitas de la glicosilación (CDG) son enfermedades genéticas raras causadas por defectos en la síntesis o procesamiento de glicanos lo que genera glicoproteínas anómalas y afecta múltiples funciones celulares. Su diagnóstico suele ser complejo por la variabilidad clínica y la superposición de síntomas con otras patologías. En este contexto, las lectinas, proteínas que interaccionan en forma específica y reversible con carbohidratos, surgen como herramientas prometedoras para detectar alteraciones en la glicosilación.

Esta tesina tuvo como objetivo desarrollar un ensayo bioquímico tipo ELLA basado en el uso de lectinas vegetales para detectar patrones anómalos de glicosilación en transferrina humana, una glicoproteína utilizada como biomarcador diagnóstico en CDG.

Se seleccionaron 6 lectinas vegetales de origen comercial y una lectina purificada en el laboratorio a partir de semillas de *Erythrina crista-galli* var. *hasskarlii* (ceibo rojo) y se usaron en forma biotinilizada.

Se generaron diferentes glicoisofomas de transferrina humana recombinante mediante desialilación química y posterior degalactosilación enzimática. Estas isoformas sirvieron luego como modelos para evaluar la capacidad de reconocimiento diferencial por parte de las lectinas seleccionadas.

Se diseñó y optimizó un ELLA utilizando las lectinas biotiniladas, con detección mediante estreptavidina-peroxidasa y revelado con reactivo TMB. Se ensayaron distintas condiciones experimentales y se observó un reconocimiento diferencial de las lectinas frente a las distintas isoformas de transferrina generadas.

Los resultados obtenidos demostraron que el ensayo ELLA optimizado permite distinguir entre isoformas con distintos grados de glicosilación, en función de la especificidad de cada lectina. Este enfoque representa una alternativa accesible y sensible para complementar el diagnóstico de CDG, y aporta una herramienta potencial para su implementación en contextos clínicos.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras, Ceci y Laura, por recibirme con entusiasmo y confianza en el laboratorio, por su amabilidad, buena onda y dedicación. Muy especialmente a Ceci, por acompañarme, entenderme y alentarme todos los días en este camino que transitamos juntas.

A Andrea y Gustavo quienes aceptaron evaluar este trabajo, gracias por su tiempo y generosidad.

A todo el equipo del laboratorio de Bioquímica, por hacerme sentir parte desde el primer día, siempre con una sonrisa y dispuestos a ayudar.

A las amigas que me dio esta carrera, por estar siempre para acompañar y dar para adelante.

A mis grandes amigas que me dio la vida, que sin ellas nada sería lo mismo. Gracias por compartir la vida conmigo desde hace tantos años, por bancarme y por hacer del mundo un lugar más lindo.

A mi familia, a mis abuelos por estar pendientes de cada paso y por darme tanto amor.

Por último, gracias a mis padres, por ser los pilares de mi vida. Por estar siempre presentes, por su amor constante, por enseñarme con el ejemplo que todo esfuerzo vale la pena, por caminar a mi lado sin apurar mis pasos y acompañarme en cada decisión. Gracias por hacerme la persona que soy.

Y gracias a Caio y Milo, por ser mis compañeros de ruta, mi refugio. Gracias por su contención de todos los días, por aguantarme en las malas y por celebrar juntos las buenas. Su amor y compañía hicieron que este camino se sintiera mucho más liviano.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Glicanos y Glicoproteínas	6
1.2. Alteraciones congénitas de glicosilación (CDG).....	8
1.2.1. Clasificación y nomenclatura de las CDG	9
1.2.2. Manifestaciones clínicas	10
1.2.3. Diagnóstico: técnicas y biomarcadores	11
1.3. La transferrina como biomarcador diagnóstico en CDG.....	13
1.4. Lectinas	17
1.4.1. Clasificación de lectinas vegetales.....	17
1.4.2. Propiedades estructurales y fisicoquímicas de las lectinas	19
1.4.3. Naturaleza y evaluación de la interacción lectina-carbohidrato	20
1.4.4. Aplicaciones de las lectinas	22
1.4.5. Lectinas como herramientas de diagnóstico en CDG.....	23
1.4.6. Lectinas utilizadas en este trabajo	23
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. Aislamiento y purificación de la lectina de <i>Erythrina cristagalli</i> var. <i>hasskarlii</i> Backer (ECA) por cromatografía de afinidad	28
3.1.1. Preparación del extracto	28
3.1.2. Síntesis del adsorbente galactosil-agarosa para la purificación de ECA	28
3.1.3. Purificación de ECA por cromatografía de afinidad	29
3.2. Generación de glicoisofomas de transferrina mediante deglicosilación	30
3.2.1. Desialilación química de hTrf	30
3.2.2. Degalactosilación enzimática de Asialo-Transferrina	31
3.3. Optimización del ensayo de reconocimiento en placa mediante ELLA	31
3.3.1. Biotinilación de las lectinas	31
3.3.2. Ensayos de tipo ELLA.....	32
3.4. Análisis	33
3.4.1. Concentración de proteínas.	33

ÍNDICE

3.4.2.	Cuantificación de la biotinilación	33
3.4.3.	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS – PAGE).....	34
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1.	Extracción y purificación de la lectina de <i>Erythrina crista-galli</i> (ECA).....	35
4.1.1.	Variantes en el proceso de purificación de ECA	36
4.2.	Optimización del ensayo ELLA.....	40
4.2.1.	Optimización de la concentración de lectina a aplicar	41
4.2.2.	Optimización de la concentración de glicoproteína y de lectina en el ensayo.....	42
4.2.3.	Optimización de las condiciones de bloqueo en el ensayo de ELLA	44
4.3.	Biotinilación de las lectinas	47
4.3.1.	Verificación funcional de la biotinilación en el ensayo ELLA	48
4.3.2.	Evaluación de la biotinilación en comparación con una lectina biotinilada comercial	49
4.3.3.	Cuantificación de la biotinilación de las lectinas.....	51
4.4.	Deglicosilación de Transferrina humana recombinante (hTrf)	55
5.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	60
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	62

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Glicanos y Glicoproteínas

Los glicanos se caracterizan por estar constituidos por uno o más azúcares, formando oligo/polisacáridos que pueden encontrarse libres o como glicoconjugados: moléculas mixtas en donde el glicano se encuentra unido covalentemente a proteínas (glicoproteínas y proteoglicanos) o lípidos (glicolípidos y lipopolisacáridos). Son esenciales en una diversidad de procesos como señalización y reconocimiento celular, respuesta inmune, inflamación y patogénesis, entre muchos otros.

Su gran complejidad estructural, sumada a la gran dificultad de predecir su síntesis a partir del ADN ha dificultado su estudio, pero los avances tecnológicos recientes han impulsado fuertemente su estudio. La glicobiología, la rama de la biología que estudia en el sentido más amplio los procesos en que se hallan involucrados los glicanos (estructura, biosíntesis y aspectos funcionales) se reconoce hoy como una disciplina fundamental que complementa el paradigma clásico de la biología molecular, revelando cómo un número limitado de genes puede generar gran diversidad funcional mediante modificaciones como la glicosilación (Varki & Kornfeld, 2022).

En relación a las glicoproteínas: durante el procesamiento intracelular de las proteínas, ciertos oligosacáridos (OGS) son incorporados de manera específica mediante unión covalente a residuos de asparragina (Asn), generando así unión de tipo *N*-glicanos, o en residuos de serina (Ser) o treonina (Thr), generando uniones de tipo *O*-glicanos. En el caso de los *N*-glicanos y en vertebrados, estos se organizan en 3 tipos de estructuras diferentes: los de alto contenido en manosa, los OGS híbridos y los de tipo complejo. Asimismo, estos OGS se pueden organizar como estructuras de tipo mono, di, tri y tetraantenarias. En el caso de los *O*-glicanos, aunque generalmente son más pequeños que las estructuras tipo *N*-glicanos, pueden estar en alto número y exhibir enorme heterogeneidad en su estructura (Figura 1).

INTRODUCCIÓN

Todas estas modificaciones tienen lugar principalmente en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi, donde glicosidasas y glicosiltransferasas actúan secuencialmente para construir y remodelar las cadenas glucídicas durante y después de la síntesis proteica (Spiro, 2002; Varki & Kornfeld, 2022).

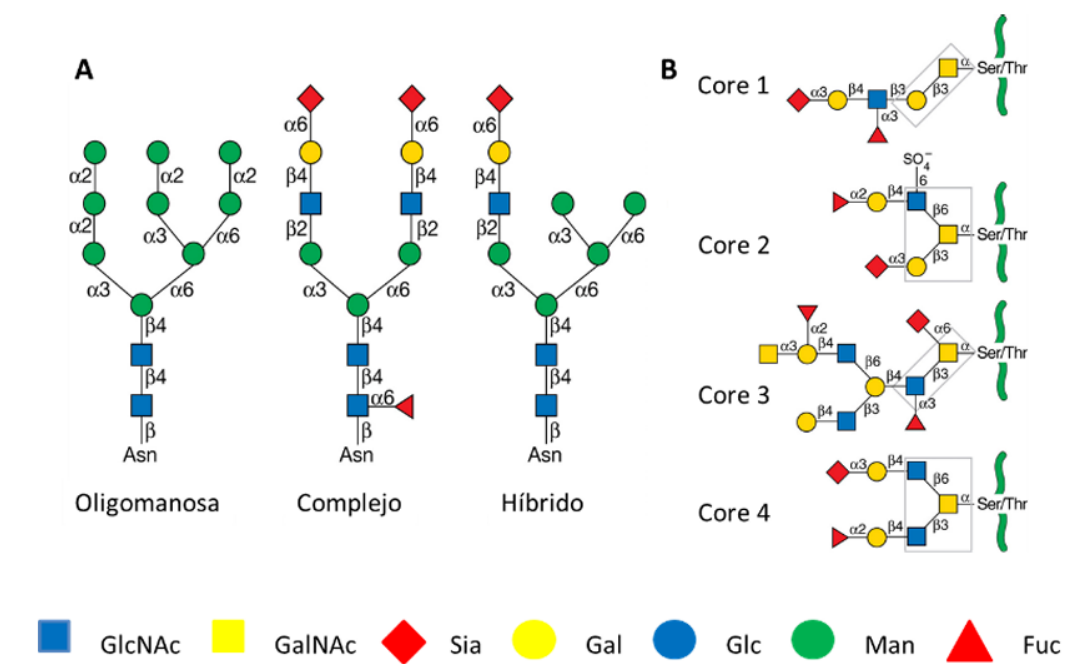


Figura 1. A: N-glicanos B: O-glicanos (Adaptado de *Essentials of glycobiology 3rd. Ed.*)

Es de mencionar que variaciones en la glicosilación de una misma glicoproteína generan lo que se denominan isoformas (también definidas como glicoisofomas).

La complejidad estructural de los glicanos de las glicoproteínas determina una amplia variedad de funciones biológicas fundamentales. Estas estructuras participan en procesos clave como el desarrollo embrionario, proliferación y diferenciación celular, señalización y reconocimiento célula-célula, adhesión celular, tráfico y localización de proteínas, interacciones huésped-patógeno y en la regulación de la respuesta inmune. Por tanto, cualquier alteración en su expresión, estructura o procesamiento puede comprometer funciones celulares esenciales y contribuir al desarrollo de múltiples enfermedades (Gorelik *et al.*, 2001; Spiro, 2002; Varki & Kornfeld, 2022).

INTRODUCCIÓN

1.2. Alteraciones congénitas de glicosilación (CDG)

Las Alteraciones Congénitas de Glicosilación (CDG de “*Congenital Disorders of Glycosilation*”) constituyen un grupo creciente de enfermedades genéticas raras, caracterizadas por defectos en la síntesis o el procesamiento de los glicanos unidos a proteínas y a lípidos, lo cual afecta la correcta función proteica; por lo que alteraciones de éstos generan glicoconjugados anómalos, que interfieren con múltiples funciones celulares. Como consecuencia, las CDG suelen presentar manifestaciones clínicas multisistémicas, afectando principalmente el sistema nervioso central y el hígado, aunque también pueden comprometer otros órganos y sistemas (Freeze & Schachter, 2009).

Estas alteraciones fueron descritas por primera vez en la década del 80 por Jaeken y colaboradores (Jaeken *et al.*, 1980), quien ha contribuido ampliamente a su caracterización clínica y bioquímica. Desde entonces, se han identificado más de 170 tipos distintos de CDG (Blăniță *et al.*, 2021) (Figura 2).

INTRODUCCIÓN

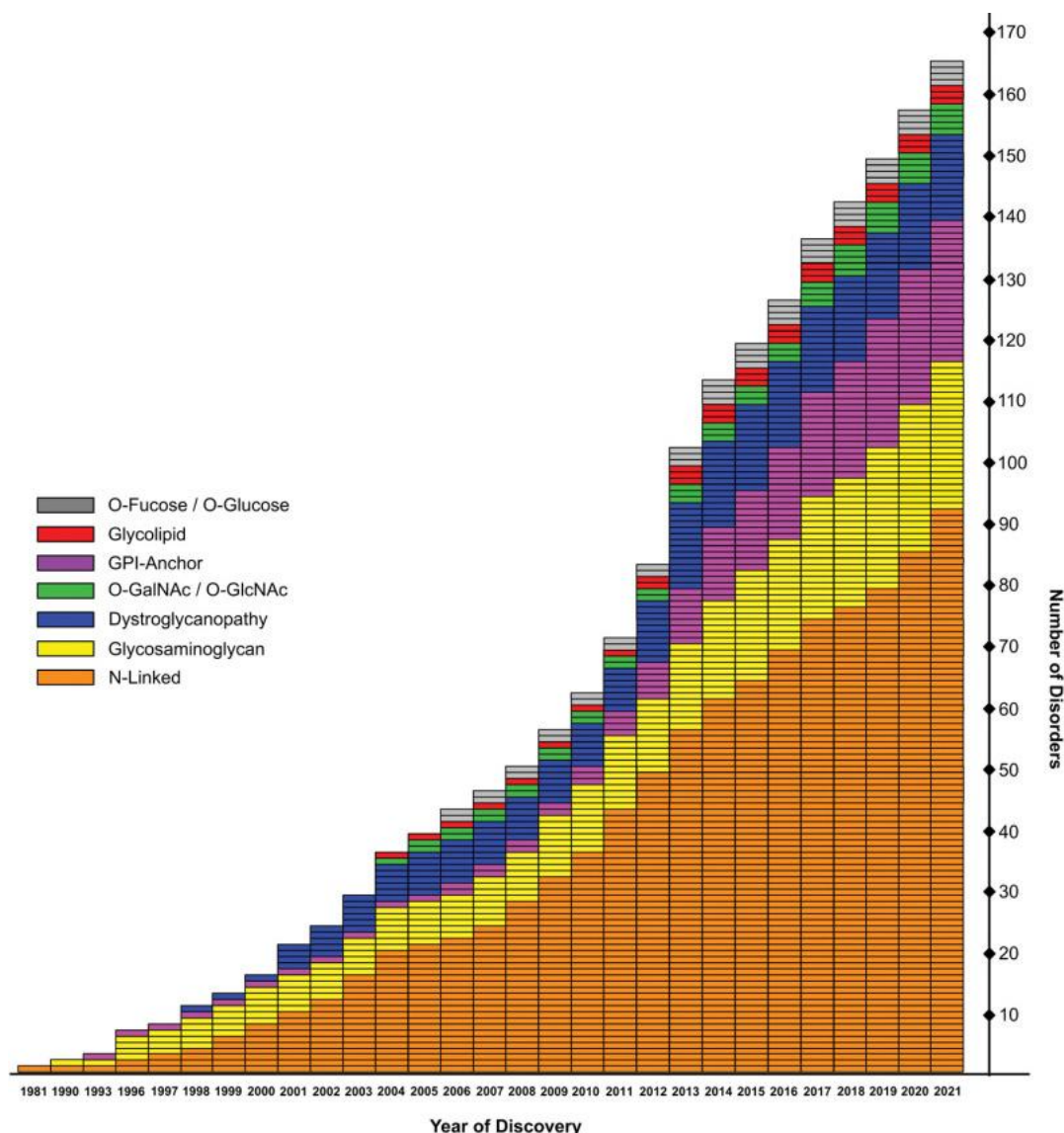


Figura 2. Crecimiento de las alteraciones congénitas de glicosilación a lo largo de los años. (Extraído de *Essentials of glycobiology*, 4th. Ed)

1.2.1. Clasificación y nomenclatura de las CDG

Tradicionalmente, las CDG se clasificaban en dos grandes grupos: tipo I, que incluye defectos en la síntesis y ensamblaje inicial de los glicanos (lo que produce una disminución de la glicosilación) y tipo II, que comprende defectos en el procesamiento de los glicanos ya unidos a las proteínas (lo que genera alteraciones en los patrones de glicosilación). Cada tipo se subdividía utilizando letras (a, b, c, etc.) según la enzima o

INTRODUCCIÓN

gen afectado. Por ejemplo, el subtipo CDG-Ia, el más frecuente, es causado por deficiencia de la enzima fosfomanomutasa 2 (PMM2), mientras que CDG-IIa se debe a la deficiencia de *N*-acetilglucosaminiltransferasa II (Freeze & Schachter, 2009).

Sin embargo, esta clasificación ha sido objeto de revisión, ya que no logra abarcar la complejidad y diversidad creciente de estos trastornos. En este contexto, Jaeken *et al.* (Jaeken *et al.*, 2009) propusieron una nomenclatura basada en el gen afectado, como PMM2-CDG, que actualmente es ampliamente aceptada. Esta nomenclatura refleja con mayor precisión la base molecular de cada enfermedad, y se ha sugerido abandonar la clasificación tipo I/II por considerarse limitada. No obstante, esta clasificación aún se utiliza en ciertos contextos para ayudar a interpretar ciertos perfiles bioquímicos.

Además, las CDG pueden clasificarse según el tipo de glicano afectado. En este sentido, se reconocen cuatro grupos: aquellos con alteraciones en *N*-glicanos (los más frecuentes), en *O*-glicanos, alteraciones mixtas que involucran tanto *N*- como *O*-glicanos, y defectos en glicolípidos. A su vez, cada subtipo puede diferenciarse según la enzima alterada, la vía metabólica implicada y el patrón de glicosilación observado (Jaeken, 2013).

1.2.2. Manifestaciones clínicas

Clínicamente, las CDG son altamente heterogéneas, con manifestaciones fenotípicas muy variables que dependen del tipo y la severidad del defecto. Afectan múltiples sistemas orgánicos, incluyendo el sistema neurológico, gastrointestinal, cardíaco, hepático, renal, endocrino, inmunológico, hematológico y musculoesquelético. Entre las manifestaciones neurológicas más frecuentes se encuentran la hipotonía, la ataxia, el retraso en el desarrollo psicomotor, la hipoplasia y la microcefalia, así como diversos grados de discapacidad intelectual que reflejan el impacto del defecto en el desarrollo cerebral (Wolfe & Krasnewich, 2013). También se han reportado malformaciones congénitas y afectaciones oftalmológicas (Freeze & Schachter, 2009; Jaeken, 2013).

INTRODUCCIÓN

Algunos tipos específicos de CDG presentan signos clínicos distintivos. Por ejemplo, PGM1-CDG, un trastorno de la *N*-glicosilación, puede manifestarse con hipoglucemia, alteraciones hormonales, labio/paladar hendido y miopatía. En muchos casos también se observan niveles elevados de transaminasas y hepatomegalia, que en ocasiones graves pueden requerir un trasplante hepático. Además, se estima que aproximadamente una quinta parte de estos trastornos también se asocia con diversas complicaciones cardíacas, incluyendo cardiomiopatías, arritmias o malformaciones del corazón (Jaeken, 2013).

En general, los tratamientos disponibles para las CDG son limitados y dependen del tipo específico de alteración. La mayoría de las terapias actuales se basan en la suplementación nutricional con monosacáridos y otros precursores metabólicos, como manosa en MPI-CDG, fucosa en SLC35C1-CDG o galactosa en PGM1-CDG (Sosicka et al., 2022; Verheijen et al., 2020). Además, existen otras estrategias terapéuticas como el uso de chaperonas farmacológicas, trasplante de órganos, entre otros, como alternativas a estos tratamientos (Verheijen *et al.*, 2020).

1.2.3. Diagnóstico: técnicas y biomarcadores

El diagnóstico precoz de los CDG es fundamental para mejorar la calidad de vida de los pacientes, ya que permite prevenir la aparición o el agravamiento de algunos síntomas. Sin embargo, el diagnóstico suele ser complejo debido a la amplia variedad de manifestaciones clínicas, la inespecificidad de muchos síntomas y su superposición con otras enfermedades genéticas. Por tanto, no solo es importante confirmar que se trata de un CDG, sino también identificar con precisión el tipo específico implicado (Jaeken, 2013; Sosicka *et al.*, 2022; Varki & Kornfeld, 2022).

Dado este desafío diagnóstico, es esencial contar con marcadores bioquímicos confiables y herramientas analíticas sensibles, ya que muchos CDG pueden presentar fenotipos solapados o atípicos que complican la sospecha clínica (Raynor *et al.*, 2024).

INTRODUCCIÓN

Debido a que los CDG se caracterizan por patrones anormales de glicosilación, el análisis de glicoproteínas séricas se ha convertido en una estrategia útil para su diagnóstico. En este contexto las lectinas, proteínas que reconocen secuencias específicas de carbohidratos, constituyen herramientas valiosas para detectar modificaciones en la glicosilación (Gorelik *et al.*, 2001). Su aplicación en ensayos bioquímicos permite identificar alteraciones en la estructura de los glicanos con alta sensibilidad y especificidad, complementando otros métodos diagnósticos tradicionales como el isoelectroenfoque, aplicados particularmente a la transferrina sérica (Brooks, 2012). Esta glicoproteína presenta alteraciones características en presencia de ciertas anomalías en la glicosilación, lo que la convierte en uno de los biomarcadores más ampliamente utilizados (Hall *et al.*, 2025; Sosicka *et al.*, 2022). El análisis de su perfil de glicosilación permite diferenciar entre CDG tipo I y tipo II, mientras que la confirmación diagnóstica definitiva se obtiene mediante estudios de secuenciación genética de los genes implicados en las rutas de glicosilación (Hall *et al.*, 2025).

Entre las técnicas disponibles para evaluar la glicosilación de la transferrina, el isoelectroenfoque (IEF) es una de las más utilizadas. Esta metodología fue fundamental en la identificación de las primeras formas clínicas de CDG, como lo evidenció Jaeken *et al.* (Jaeken *et al.*, 1980), donde se detectó una isoforma anormal de transferrina en pacientes con sintomatología neurológica. El IEF permite detectar isoformas con deficiencia de carbohidratos (CDT, por sus siglas en inglés), asociadas a alteraciones en la N-glicosilación por variación en la carga neta de la glicoproteína. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones importantes: solo permite detectar alteraciones con deficiencias del ácido N-acetilneuramínico, un tipo particular de ácido siálico, lo que restringe su especificidad; además, posee baja resolución para ciertos subtipos de CDG y su interpretación puede verse afectada por variantes fisiológicas de la transferrina o interferencias analíticas. En este contexto, se han desarrollado técnicas complementarias como la espectrometría de masas, que presentan mayor sensibilidad y especificidad (Guillard *et al.*, 2011; Lacey *et al.*, 2001; Morelle & Michalski, 2007; Wada, 2016; Xia *et al.*, 2013). Estas metodologías, además de su valor diagnóstico, también han demostrado utilidad en el monitoreo de la respuesta terapéutica en pacientes con

INTRODUCCIÓN

CDG, permitiendo evaluar cambios en el perfil de glicosilación en respuesta al tratamiento aplicado (Scherpenzeel *et al.*, 2016).

En Uruguay, el Laboratorio de Pesquisa Neonatal (LPN) del Banco de Previsión Social ha implementado recientemente un ensayo de IEF para la detección de glicoisofomas de transferrina. En casos de perfiles alterados, se realiza un estudio genético para confirmar si se trata de PMM2-CDG (el tipo más frecuente de las CDGs). Estos estudios solo se aplican a individuos con sospecha clínica, generalmente cuando ya han comenzado a manifestarse los síntomas (Audicio *et al.*, 2021). La situación en otros países de la región es similar.

El diagnóstico durante el período neonatal cobra especial relevancia, ya que permite iniciar intervenciones tempranas que pueden modificar favorablemente el curso de la enfermedad. Dado que en Uruguay la pesquisa neonatal incluye la recolección de una muestra de sangre por punción del talón, incorporar el análisis de glicosilación a partir de esta misma muestra permitiría ampliar la capacidad de detección temprana de CDG, optimizando así el uso de recursos ya disponibles.

Frente a estas limitaciones, el desarrollo de herramientas diagnósticas que permitan discriminar entre diferentes patrones de glicosilación resulta de gran valor para mejorar la precisión diagnóstica de los CDG. Las **lectinas** representan una alternativa prometedora para la detección de alteraciones en la glicosilación. Diversos estudios recientes han explorado su uso como herramientas, especialmente en combinación con técnicas de alto rendimiento, para caracterizar con mayor especificidad los perfiles de glicosilación anómala (Raynor *et al.*, 2024). Estos enfoques respaldan el desarrollo de ensayos más específicos, como el propuesto en el presente trabajo.

1.3. La transferrina como biomarcador diagnóstico en CDG

La transferrina es una glicoproteína plasmática mayormente sintetizada en el hígado, cuya principal función es el transporte de hierro en el torrente sanguíneo hacia los tejidos,

INTRODUCCIÓN

donde será utilizado o almacenado. Se encuentra en altas concentraciones en el suero y su perfil glicosídico puede alterarse en distintas patologías, por lo que su análisis puede aportar información clínica relevante (Gomme *et al.*, 2005).

Estructuralmente, la transferrina está compuesta por una sola cadena polipeptídica de 679 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 79 kDa. Presenta dos sitios de *N*-glicosilación altamente conservados (Asn432 y Asn630) y, en algunas ocasiones, un sitio de *O*-glicosilación en Ser32 (Gomme *et al.*, 2005; Penezić *et al.*, 2019). Estas glicosilaciones son principalmente de tipo complejo, con ramificaciones biantenarias que usualmente terminan en residuos de ácido siálico. Esto determina su carga eléctrica y permite que las distintas glicoformas sean analizadas mediante técnicas como el isoelectroenfoque o la espectrometría de masas (Penezić *et al.*, 2019; Wada *et al.*, 1992).

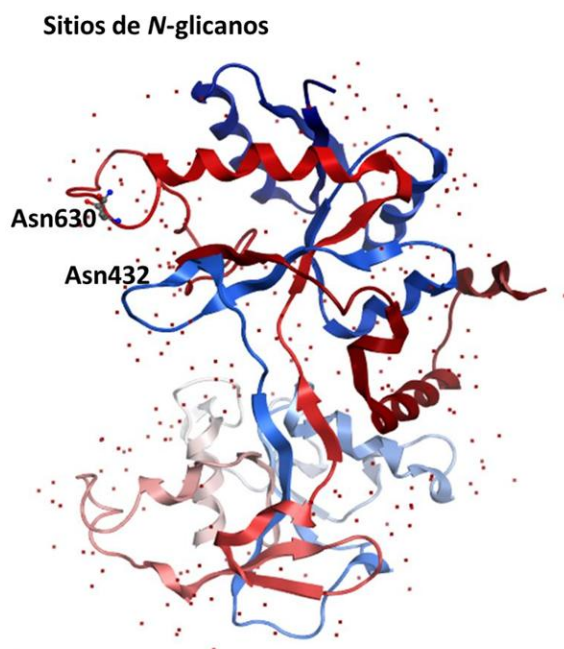


Figura 3. Estructura de la transferrina (pdbID: 3SKP)

Una de las razones por las que la transferrina es utilizada como biomarcador en enfermedades congénitas de la glicosilación es por esta presencia constante y bien caracterizada de glicanos, que se ve alterada cuando hay defectos en la síntesis o el procesamiento de los mismos. En individuos sanos, la forma predominante de

INTRODUCCIÓN

transferrina en suero es la tetrasialotransferrina, con cuatro residuos de ácido siálico terminales. Sin embargo, en pacientes con CDG, se observa un aumento de las isoformas hiposialiladas, como la disialo- o asialotransferrina, debido a fallas en la adición de glicanos completos (Jaeken & Carchon, 1993; Wada *et al.*, 1992). Esto genera un patrón electroforético alterado que desde hace tiempo se utiliza como una de las primeras pruebas de detección para CDG.

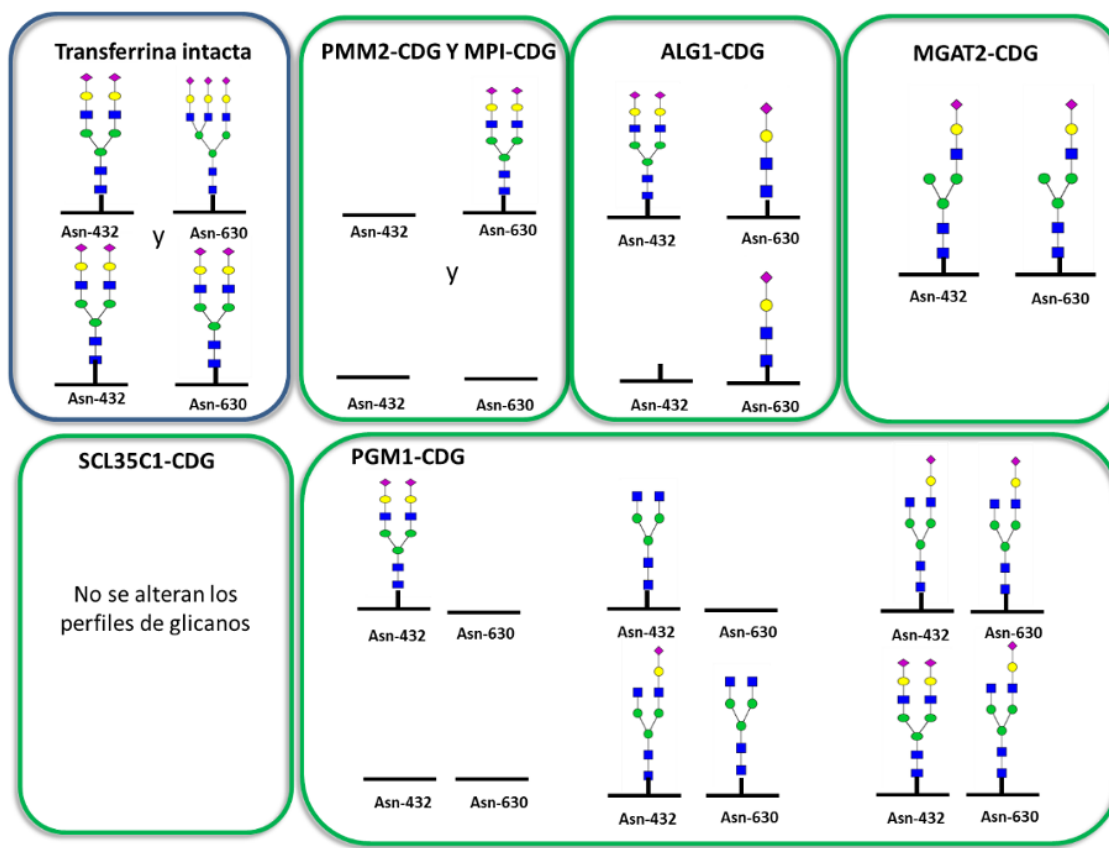


Figura 4. Alteraciones en los N-glicanos de la transferrina observadas en algunas de las principales CDGs.

Para detectar estas anomalías en las glicoformas de transferrina, se han utilizado distintas técnicas, entre ellas el isoelectroenfoco, que separa las isoformas de transferrina según su grado de sialilación y, por ende, la variación en la carga neta de la glicoproteína. Sin embargo, esta técnica puede tener limitaciones en cuanto a sensibilidad y resolución, y presentar problemas en presencia de variantes genéticas de transferrina que alteran la carga sin ser patológicas, lo que puede llevar a resultados de

INTRODUCCIÓN

difícil interpretación (Guillard *et al.*, 2011). Por eso, métodos más modernos como la espectrometría de masas (MS) han ganado terreno, ya que permiten un análisis sitio-específico de las glicosilaciones y brindan información más detallada sobre las estructuras presentes, aunque también pueden tener algunas dificultades en cuanto a interpretación y requerir equipamiento más costoso (Wada, 2016).

Otra técnica emergente que ha demostrado ser prometedora es el uso de microarreglos de proteínas basados en **lectinas**. Esta metodología, utilizada por Penezić *et al.* (Penezić *et al.*, 2019), permite detectar patrones anómalos de glicosilación mediante la interacción específica de lectinas con determinados motivos glicanos. En su estudio, lograron identificar diferencias claras en los perfiles de glicoformas de transferrina entre individuos sanos y pacientes con CDG. Esta estrategia ofrece además la posibilidad de detectar alteraciones en la ramificación, fucosilación y otros detalles estructurales de los glicanos, más allá de la simple pérdida de ácido siálico, lo que amplía su utilidad diagnóstica.

Esto da pie a la siguiente sección de este trabajo, donde se explorará en más detalle el papel de las lectinas como herramientas analíticas y su potencial en el diagnóstico de defectos congénitos de la glicosilación.

En resumen, la transferrina no sólo es una proteína abundante y estable en el suero, sino que también resulta útil para evaluar cómo funciona la maquinaria de glicosilación en el organismo. Su glicosilación cambia cuando hay problemas en la síntesis de glicanos, por eso se la usa como un indicador indirecto de cómo están funcionando esos procesos. Además, como tiene sitios de *N*-glicosilación bien definidos, puede ser fácilmente reconocida por lectinas específicas, lo que permite usar estas herramientas en el diagnóstico de enfermedades como los CDG.

Dado que cada tipo de CDG puede generar un perfil distinto de glicoisoformas, contar con una herramienta capaz de diferenciar entre estos patrones sería especialmente útil para precisar el tipo de defecto. En este sentido, las lectinas representan una alternativa valiosa para la detección específica de alteraciones en la glicosilación y, por lo tanto, una mejora potencial en la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

1.4. Lectinas

Las lectinas son proteínas que poseen en su estructura al menos un dominio de unión a carbohidratos (en inglés carbohydrate recognition domain, CRD) a través del cual interaccionan específica y reversiblemente con carbohidratos presentes en glicanos, glicoproteínas, polisacáridos, glicolípidos. Esta propiedad las convierte en herramientas fundamentales para estudiar glicanos y sus alteraciones en diversas enfermedades, incluidas las CDG (Lis & Sharon, 1998; Sharon & Lis, 1989).

Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza: han sido aisladas de plantas, bacterias, hongos, virus y animales. En particular, las lectinas vegetales han sido las más estudiadas y utilizadas debido a su facilidad de obtención y su alta especificidad hacia estructuras glicosídicas particulares (Hernandez Cruz *et al.*, 2005; Lis & Sharon, 1998). En las plantas, estas lectinas se localizan principalmente en órganos de almacenamiento, como semillas, tubérculos y bulbos, donde pueden representar una fracción importante del contenido proteico, aunque también se pueden encontrar en tallos, hojas, raíces, rizomas y otras estructuras, en concentraciones variables (Rüdiger, 2002).

Algunas lectinas reconocen residuos terminales de manosa, galactosa o ácido siálico, mientras que otras se unen a estructuras más complejas de glicanos ramificados, por lo que poseen una amplia diversidad en sus afinidades, lo que permite aprovecharlas para el reconocimiento de perfiles glicosilados específicos (Katrlik *et al.*, 2010).

1.4.1. Clasificación de lectinas vegetales

Las lectinas vegetales pueden clasificarse utilizando distintos criterios estructurales y funcionales. En general, estas clasificaciones permiten comprender mejor su diversidad, especificidad de unión y aplicaciones. Según (Mishra *et al.*, 2019), las lectinas pueden organizarse en tres grandes categorías:

INTRODUCCIÓN

- **Según el número y tipo de sitios de unión a carbohidratos:**

Incluye a las **merolectinas**, que poseen un único dominio de unión (CDR) y un único sitio de reconocimiento de carbohidratos; **hololectinas**, poseen al menos dos dominios de unión a carbohidratos siendo estos idénticos u homólogos y pueden unir el mismo carbohidrato ó similares. Son di- ó multivalentes y aglutinan células y/o precipitan glicoconjugados. La mayoría de las lectinas de plantas pertenecen a este subgrupo; **chimerolectinas**, que constituyen una fusión de uno o más CRD unidos en tandem a otro dominio no relacionado, el cual puede tener una actividad catalítica definida u otra actividad biológica independiente del CDR y **superlectinas**, grupo especial de quimerolectinas, compuestas por un arreglo en tandem de dos CRD estructural y funcionalmente diferentes.

- **Según su estructura cristalográfica y evolución:**

Esta clasificación agrupa a las lectinas en familias estructurales como la de leguminosas (legume lectin), lectinas del tipo jacalina, lectinas de unión a quitina, entre otras. Cada familia presenta un pliegue característico y patrones conservados que reflejan su origen evolutivo y funciones específicas en la planta.

- **Según su afinidad de unión a carbohidratos simples:**

Se basa en la especificidad preferencial por ciertos monosacáridos, como glucosa, galactosa y *N*-acetilgalactosamina, *L*-fucosa o ácido *N*-acetilneuramínico (un tipo de ácido siálico). En este sentido, las lectinas pueden agruparse según el tipo de carbohidrato que reconocen. Algunas como ConA (*Concanavalin A*) y PSA (*Pisum sativum* agglutinin), reconocen con mayor afinidad residuos de manosa, otras como SBA (*Soybean agglutinin*), ECA (*Erythrina cristagalli* agglutinin) y RCA (*Ricinus communis* agglutinin) se unen preferentemente a galactosa o *N*-acetilgalactosamina. Lectinas como WGA (*Wheat germ* agglutinin) y PHA-E (*Phaseolus vulgaris* erythroagglutinin) tienen afinidad por *N*-acetilglucosamina, mientras que SNA (*Sambucus nigra* agglutinin) reconoce residuos de ácido siálico en uniones específicas. Por su parte, la AAL (*Aleuria aurantia* lectin) reconoce residuos de fucosa y la PHA-L (*Phaseolus vulgaris* leukoagglutinin) reconoce estructuras ramificadas complejas con residuos de *N*-acetilglucosamina (Bojar *et*

INTRODUCCIÓN

al., 2022; Hernandez Cruz *et al.*, 2005; Penezić *et al.*, 2019; Sharon & Lis, 1989).

La descripción detallada de las especificidades de las lectinas utilizadas en esta tesina se presenta en la sección 1.4.6. Ver Tabla 1 en página 22.

1.4.2. Propiedades estructurales y fisicoquímicas de las lectinas

Las lectinas presentan una gran diversidad estructural, pero comparten ciertas características comunes. Una de las propiedades más importantes es la presencia como se indicó antes, de uno o más dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD). Estos dominios son estructuras muy conservadas que les permiten interactuar de manera específica con glicanos sin necesidad de modificar sus estructuras (Lis & Sharon, 1998; Rüdiger, 2002).

Estructuralmente, muchas lectinas vegetales presentan pliegues conservados como el “legume lectin fold”, formado por hojas β antiparalelas que estabilizan la estructura y delimitan el sitio de unión a carbohidratos. Esta conformación está presente en una gran variedad de lectinas aisladas de plantas leguminosas (Chandra *et al.*, 2001). Estos sitios de unión a carbohidratos suelen estar acompañados de sitios de unión a iones metálicos, como Ca^{2+} y Mn^{2+} , que son necesarios para la conformación activa del sitio de unión. De hecho, muchas lectinas tipo leguminosa requieren estos iones para mantener su estructura terciaria y para unirse eficazmente a sus ligandos (Hernandez Cruz *et al.*, 2005).

A nivel fisicoquímico, la mayoría de las lectinas son proteínas relativamente estables, tanto térmica como químicamente. Esta estabilidad las hace aptas para su uso en diferentes condiciones experimentales, como en técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos tipo ELISA (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ó microarreglos de lectinas (Rüdiger, 2002).

En cuanto a su estructura cuaternaria, muchas lectinas existen como dímeros o tetrámeros funcionales. Esta multivalencia permite aumentar la avidez por sus ligandos glicosilados y potenciar su capacidad de aglutinación o de detección en sistemas de

INTRODUCCIÓN

diagnóstico. Por ejemplo, ConA es un tetrámero en condiciones fisiológicas, lo que le permite interactuar simultáneamente con residuos de manosa presentes en diferentes moléculas de una glicoproteína (Manoj & Suguna, 2001; Peumans & Van Damme, 1995).

1.4.3. Naturaleza y evaluación de la interacción lectina-carbohidrato

La interacción entre lectinas y carbohidratos se basa en un conjunto de fuerzas no covalentes, como puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas. Estas interacciones son específicas pero reversibles, lo que les permite unirse a sus ligandos sin modificarlos químicamente y luego, pueden liberarlos en condiciones adecuadas (Lis & Sharon, 1998; Rüdiger, 2002).

Un aspecto clave de la unión lectina-carbohidrato es su **especificidad**, que se refiere a la capacidad de la lectina de reconocer un azúcar o epítipo glicosídico determinado, y su **afinidad**, que es la fuerza con la que se da esta unión. A pesar de que la afinidad individual entre un único sitio de la lectina y su carbohidrato puede ser relativamente baja, muchas lectinas presentan multivalencia, como se mencionó anteriormente, donde múltiples sitios de unión interactúan simultáneamente con varios ligandos. Esta multivalencia puede deberse a la formación de dímeros, trímeros o tetrámeros por parte de las lectinas, o bien por presentar múltiples dominios de unión dentro de una misma cadena. Esta característica permite la unión de manera cooperativa a glicanos, incrementando así la fuerza global de la interacción (Chandra *et al.*, 2001; Lis & Sharon, 1998; Peumans & Van Damme, 1995; Rüdiger, 2002). Esta propiedad puede potenciar la señal en ensayos bioquímicos como ELISA o microarreglos, ya que la multivalencia favorece la estabilización de la unión lectina-carbohidrato. Sin embargo, también puede dar lugar a interacciones inespecíficas si los motivos reconocidos están presentes, pero no son terminales, o si se encuentran en estructuras ramificadas que permiten múltiples contactos al mismo tiempo. Por ejemplo, lectinas como ConA, WGA, SBA y PHA-L forman oligómeros con varios sitios de unión, lo que las vuelve especialmente sensibles a la densidad y presentación espacial de los glicanos (Bojar *et al.*, 2022; Van Damme *et al.*, 1998).

INTRODUCCIÓN

Por otro lado, la especificidad de cada lectina está determinada no solo por el azúcar central reconocido, sino también por su contexto estructural, como el tipo de enlace, la presencia de ramificaciones o residuos adyacentes, y la posición terminal o interna dentro de la cadena. Algunas lectinas presentan alta especificidad y solo se unen a estructuras bien definidas, mientras que otras reconocen un conjunto más amplio de glicanos relacionados (Abu Bakar *et al.*, 2018; Bojar *et al.*, 2022).

Además, hay otros factores que pueden influir en esta interacción, como el pH, la temperatura y la presencia de iones metálicos. También la densidad y presentación de los carbohidratos en una superficie pueden afectar la eficiencia de la unión lectina-ligando (Manoj & Suguna, 2001; Mathews *et al.*, 2002). Estos parámetros deben ser cuidadosamente controlados al diseñar experimentos basados en lectinas.

Para estudiar y aprovechar estas interacciones, se han desarrollado distintas metodologías. El ensayo ELLA con lectinas (Enzyme-Linked Lectin Assay) es una de las técnicas más comunes y accesibles que permite detectar glicanos mediante el uso de lectinas marcadas, ya sea con enzimas, biotina o fluoróforos. Estas proteínas se aplican sobre glicoconjugados inmovilizados en placas, y su unión específica se revela a través de distintos sistemas de detección; por ejemplo, mediante lectinas biotiniladas, tratadas seguidamente con estreptavidina conjugada a peroxidasa y utilizando luego sustratos como TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina, un compuesto incoloro que en presencia de peróxido de hidrógeno es oxidado por la peroxidasa formando un producto de color azul), cuya reacción enzimática permite medir la señal por absorbancia a 450nm (Rapoport *et al.*, 2010). También se ha avanzado mucho con el uso de microarreglos de lectinas, que permiten analizar perfiles de glicanos complejos de forma paralela y con alta sensibilidad (Bruneel *et al.*, 2020; Katrlík *et al.*, 2010).

En conjunto, la combinación de la base fisicoquímica de estas interacciones con herramientas modernas de detección y análisis ha consolidado a las lectinas como herramientas indispensables en estudios de glicobiología, incluyendo el diagnóstico de trastornos como los CDG, donde los perfiles glicosilados están alterados de forma característica (Bruneel *et al.*, 2020).

INTRODUCCIÓN

1.4.4. Aplicaciones de las lectinas

Sus especiales propiedades específicas de reconocimiento de azúcares, hacen que muchas lectinas sean empleadas como sondas para analizar patrones de glicosilación; así se las puede utilizar para detectar diferencias estructurales en los glicanos presentes en glicoproteínas, lo cual resulta particularmente útil cuando se analizan cambios asociados a procesos patológicos (Hashim *et al.*, 2017; Lis & Sharon, 1998). Se han usado también, para evaluar la glicosilación diferencial de la hormona eritropoyetina (EPO) endógena frente a la recombinante mediante técnicas cromatográficas (Franco Fraguas *et al.*, 2008). En este trabajo los autores demostraron, además, la utilidad de la cromatografía de afinidad con lectinas inmovilizadas para diferenciar isoformas de EPO (endógena y recombinantes), basándose en las variaciones de sus perfiles de glicosilación. Este abordaje, evidencia la capacidad de estas proteínas para identificar sutiles modificaciones en patrones de glicosilación de una glicoproteína con alta precisión.

En el campo biomédico, las lectinas se han utilizado como marcadores diferenciales para identificar células tumorales o células infectadas, ya que estos estados muchas veces se asocian con alteraciones características en los glicanos. En particular, algunas lectinas han demostrado utilidad para distinguir patrones glicosídicos asociados a ciertos tipos de cáncer, como el de mama o colon, mediante técnicas de microarreglos de lectinas (Abu Bakar *et al.*, 2018; Bruneel *et al.*, 2020; Gorelik *et al.*, 2001; Katrík *et al.*, 2010).

Algunas lectinas de leguminosas han mostrado potencial como agente terapéutico debido a su capacidad para inducir apoptosis en células tumorales, modular respuesta inmune o interferir con la proliferación celular, así como también actividad antimicrobiana e insecticida.

Una aplicación muy relevante en el contexto de este trabajo es el uso de lectinas como herramientas de diagnóstico en enfermedades poco frecuentes como las alteraciones congénitas de la glicosilación (CDG). Estas enfermedades, caracterizadas por perfiles de glicosilación anómalos, pueden ser detectados con lectinas específicas. La posibilidad de elegir un panel de lectinas que reconozcan los glicanos afectados permite construir

INTRODUCCIÓN

un perfil glicosídico de una muestra, lo que puede orientar hacia el tipo de alteración presente (Abu Bakar *et al.*, 2018; Bojar *et al.*, 2022).

1.4.5. Lectinas como herramientas de diagnóstico en CDG

Las especificidades de unión de las lectinas son fundamentales en el estudio de las CDG, ya que cada tipo de esta enfermedad genera alteraciones características en los glicanos tales como disminución de ramificaciones, cadenas de glicanos incompletas o falta de residuos terminales (Abu Bakar *et al.*, 2018). Por ejemplo, en los CDG tipo I, donde hay defectos en la síntesis o transferencia inicial de oligosacáridos, pueden faltar glicanos completos. En cambio, en los CDG tipo II, los glicanos están presentes pero mal procesados, mostrando alteraciones en su estructura final. Estos cambios pueden ser detectados mediante lectinas que reconozcan los residuos ausentes o modificados, según el defecto en la vía de glicosilación (Abu Bakar *et al.*, 2018; Penezić *et al.*, 2019). Entre las ventajas del uso de lectinas en el diagnóstico de CDG se destacan su bajo costo, fácil implementación, compatibilidad con técnicas como ELISA y la posibilidad de analizar múltiples muestras en paralelo. Sin embargo, también presentan limitaciones, como la posibilidad de interacciones inespecíficas, la dependencia con condiciones de ensayo, y la necesidad de controles adecuados para interpretar los resultados con precisión (Katrlik *et al.*, 2010; Rüdiger & Gabius, 2001).

1.4.6. Lectinas utilizadas en este trabajo

En esta tesina se utilizaron distintas lectinas de origen vegetal con el objetivo de reconocer patrones específicos de glicosilación en glicoproteínas (Tabla 1). Cada una de estas lectinas presenta afinidad por estructuras particulares de glicanos, lo cual permite obtener un perfil diferencial según la composición de los azúcares presentes. Se emplearon tanto lectinas comerciales, ampliamente utilizadas en estudios de glicosilación por su especificidad conocida y su disponibilidad, como también una lectina purificada en nuestro laboratorio. Esta última corresponde a la lectina de ceibo rojo (*Erythrina crista-galli*), cuyo aislamiento y purificación fue desarrollado previamente en el marco de la tesina de W. Bautista (Bautista, 2013). El sistema implementado permitió entonces, obtener la lectina con un adecuado grado de pureza y un rendimiento

INTRODUCCIÓN

suficiente, en términos de miligramos de proteína, para ser aplicada en trabajos experimentales como el propuesto en esta tesina.

En un estudio realizado recientemente por *Bojar et al.*, quienes utilizaron una combinación de algoritmos de aprendizaje automático y posterior evaluación por especialistas, se caracterizó la especificidad de 57 lectinas diferentes. El estudio permitió generar un esquema de especificidades altamente detallado, muy útil para la elección de lectinas en aplicaciones biomédicas (*Bojar et al.*, 2022). A continuación, se detallan algunos datos relevantes sobre las lectinas utilizadas en este trabajo, aportados por éste y otros autores.

Concanavalina A (ConA)

La ConA es una lectina presente en semillas de *Canavalia ensiformis* y es probablemente una de las lectinas más utilizadas en estudios de glicobiología. Presenta especificidad por residuos de manosa y glucosa α , especialmente en estructuras oligosacáridicas con alto contenido de manosa y por una amplia gama de glicanos biantenarios del tipo *N*. Es una proteína tetramérica que requiere iones metálicos (Ca^{2+} y Mn^{2+}) para su actividad de unión a carbohidratos (Sharon & Lis, 1989; Van Damme *et al.*, 1998). Estudios recientes han demostrado que su especificidad varía según la fuente y las condiciones experimentales (*Bojar et al.*, 2022).

Sambucus nigra agglutinin (SNA)

La SNA se obtiene del saúco negro (*Sambucus nigra*) y reconoce específicamente residuos de ácido siálico (en particular el ácido *N*-acetil neuramínico) unidos a galactosa por enlaces α -2,6. Esto la hace útil para detectar terminales sialiladas típicas de glicoproteínas humanas (*Bojar et al.*, 2022).

Soybean agglutinin (SBA)

La SBA se extrae de *Glycine max* (soja) y presenta alta afinidad por residuos de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), tanto terminales como internos. Esta especificidad la convierte en una herramienta útil para el estudio y caracterización de glicanos que contienen GalNAc (*Bojar et al.*, 2022; Lis & Sharon, 1998).

INTRODUCCIÓN

Wheat germ agglutinin (WGA)

La WGA, proveniente de *Triticum vulgaris* (gérmen de trigo), es una lectina con afinidad por N-acetilglucosamina (GlcNAc) y en menor medida, por ácido siálico. Junto con la ConA es una de las lectinas más estudiadas y utilizadas. Está formada por un dímero de aproximadamente 36 kDa, resistente a altas temperaturas y a ambientes ácidos. Posee gran utilidad en estudios que analizan glicosilación tipo N y tipo O, incluyendo estructuras ramificadas de glicanos complejos (Bojar *et al.*, 2022; Rüdiger, 2002).

Pisum sativum agglutinin (PSA)

La PSA se obtiene de *Pisum sativum* (guisante) y aunque tradicionalmente se consideraba con especificidad similar a ConA hacia residuos de manosa (Van Damme *et al.*, 1998), estudios recientes demostraron que su afinidad se dirige principalmente hacia glicanos tipo N core-fucosilados y sin ramificaciones adicionales (Bojar *et al.*, 2022).

Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L)

La PHA-L es una isolectina aislada de *Phaseolus vulgaris* (poroto), con afinidad por estructuras complejas de glicanos N β 1,6 ramificados, especialmente aquéllas que contienen residuos de galactosa y GlcNAc, y estructuras tri y tetraantenarias. Esta lectina es útil para distinguir entre glicanos complejos y de tipo híbrido (Bojar *et al.*, 2022; Lis & Sharon, 1998).

Erythrina crista-galli agglutinin (ECA) var. Hasskarlii Backer (ceibo rojo)

Esta lectina reconoce con alta afinidad residuos terminales de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Gal β (1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc), particularmente cuando están presentes en múltiples repeticiones en N- y O-glicanos (Bojar *et al.*, 2022). Su uso permite evaluar la exposición de LacNAc en proteínas parcialmente desialiladas o con alteraciones en la ramificación. En particular en este trabajo, se purificó ECA a partir de semillas de ceibo rojo. La purificación implicó la extracción y precipitación salina con sulfato de amonio y posterior cromatografía de afinidad, como se detalla en la *sección de Materiales y Métodos*.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Especificidades de las lectinas utilizadas en este trabajo

Lectina	Origen Vegetal	Especificidad principal
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	α Manosa y glucosa N glicanos biantenarios, alto contenido de manosa
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Ácido siálico (enlace $\alpha 2,6$ a galactosa)
SBA	<i>Glycine max</i>	N-acetilgalactosamina (GalNAc α GalNAc β)
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	N-acetilglucosamina (GlcNAc), ácido siálico
PSA	<i>Pisum sativum</i>	N glicanos con core fucosilado (fucosa $\alpha 1,6$), Manosa
PHA-L	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Galactosa y GlcNAc $\beta 1,6$ ramificados. N-glicanos tri y tetraantenarios
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	LacNAc terminal multiantenarios, (Gal $\beta 1 \rightarrow 4$ GlcNAc)

En esta tesina se propone el desarrollo de un ensayo en microplaca basado en lectinas, destinado a la detección de CDG a partir del reconocimiento de patrones aberrantes de glicosilación en glicoproteínas biomarcadoras, en particular de transferrina humana. Se usará una forma recombinante comercial de la misma (hTrf), durante la fase de optimización del ensayo. Esta herramienta, basada en la interacción lectina-carbohidrato, tiene el potencial de complementar las técnicas diagnósticas actualmente disponibles en el país, mejorar la especificidad en la detección temprana de los CDG e incrementar la capacidad de testeo en muestras de neonatos.

2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Explorar herramientas alternativas para la detección de alteraciones congénitas de la glicosilación (CDG, del inglés Congenital Disorders of Glycosylation), mediante el uso de lectinas como sensores de alteraciones en la glicosilación de glicoproteínas plasmáticas de plasma de neonatos.

Objetivos específicos:

1. Aislamiento y purificación de la lectina de *Erythrina crista-galli* var. *Hasskarlii* Backer (ECA) a partir de semillas colectadas.
2. Biotinilación de la ECA purificada y de las lectinas de origen comercial ConA, SNA, SBA, WGA, PSA y PHA-L y cuantificación del grado de biotinilación alcanzado.
3. Puesta a punto de un ensayo ELLA en placa basado en la interacción de las lectinas vegetales seleccionadas en el objetivo 2, con las glicoproteínas comerciales lactoferrina bovina, fetuina (y asialo-fetuina) de suero fetal bovino, transferrina humana recombinante (hTrf), transferrina bovina recombinante (bTrf) y RNAsa B bovina usadas como modelo.
4. Generación de glicoisofomas de hTrf y bTrf a partir de deglicosilación química y enzimática y evaluación del reconocimiento frente a las lectinas usadas en el trabajo, mediante el ensayo de ELLA optimizado previamente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento y purificación de la lectina de *Erythrina cristagalli* var. *hasskarlii* Backer (ECA) por cromatografía de afinidad

3.1.1. Preparación del extracto

Se colectaron semillas de ceibo rojo, se secaron a temperatura ambiente y se procesaron en molino, obteniéndose una harina fina. A partir de 25 g de esta harina, se realizó una extracción con solvente orgánico (usando n-hexano) para su deslipidización; la harina se colocó en un matraz y se añadió el solvente de forma gradual, con agitación continua durante 1.5 horas a temperatura ambiente. La mezcla fue filtrada rápidamente con gasa, descartando el líquido, y la torta obtenida se dejó secar al aire durante 12 horas.

Se tomaron 15 g de harina deslipidizada y se colocaron en un Erlenmeyer. Se añadieron 100 ml de buffer fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, suplementado con NaCl 0.15 M (buffer PBS) de forma gradual, y con posterior agitación continua durante 2,5 horas. La mezcla fue filtrada con gasa y papel de filtro, descartando el sólido y la solución resultante fue centrifugada a 9000 rpm durante 30 minutos a 8°C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante clarificado se trató con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 30 % de saturación. Se dejó durante 12 horas a 8°C y se centrifugó a 9000 rpm durante 30 minutos a 8°C. A la solución sobrenadante se le agregó $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en polvo hasta alcanzar el 60 % de saturación, y el procedimiento se repitió como anteriormente, en este caso se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se resuspendió en el mínimo volumen de buffer PBS, se centrifugó nuevamente a 9000 rpm durante 15 minutos a 8°C, y el sobrenadante clarificado se utilizó para la purificación de la lectina.

3.1.2. Síntesis del adsorbente galactosil-agarosa para la purificación de ECA

Para la síntesis se siguió el procedimiento descrito por *Franco Fraguas et al*, (Franco-

MATERIALES Y MÉTODOS

Fraguas *et al.*, 2003).

En el día 1 se realizó la epoxi-activación de agarosa con epiclorhidrina. Para esto se pesaron 22 g de agarosa 4B (gel escurrido), se lavó en placa filtrante con 300 mL de agua destilada y se removió el exceso de líquido intersticial por succión con vacío.

Se colocó el gel escurrido en un Erlenmeyer de 125 mL y se suspendió en 20 mL de NaOH 4M. Luego se agregó una punta de espátula de NaBH₄ y 12 mL de epiclorhidrina. Se controló el pH (entre 13-14). La suspensión obtenida se agitó durante 1.5 horas a temperatura ambiente, se lavó en placa filtrante con 200 mL de NaOH 2M y luego con agua destilada hasta neutralidad (aproximadamente 500 mL).

Posteriormente se realizó la etapa de inmovilización de galactosa a la agarosa epoxi-activada. Se lavaron 6 g (peso escurrido) de agarosa epoxi-activada con 200 mL de agua destilada y luego con 200 mL de NaOH 0.5M (pH controlado: 13-14). Se resuspendió el gel en 10 mL de solución 20% de galactosa en NaOH 0.5M en tubo Falcon de 50 mL y se agitó mediante rotación suave, a temperatura ambiente, hasta el día siguiente.

En el día 2 se realizó el bloqueo de grupos epóxido remanentes en el gel galactosil-agarosa. Para esto se escurrió el gel en placa filtrante y se lavó con 200 mL de NaOH 0.5 M. El resto de los grupos epóxidos activos se bloquearon incubando el gel escurrido con β-mercaptoetanol (100 µL en 10 mL de NaOH 0.5 M) a temperatura ambiente durante 1-2 horas en tubo de fondo cónico de 50 mL, en equipo rototorque. Se lavó el gel con 160 mL de NaOH 0.5 M, luego con 300 mL de agua destilada y finalmente con 160 mL de N₃Na 0.1%. El derivado obtenido se guardó en presencia de azida de sodio 0.1 M a 4°C hasta su uso.

3.1.3. Purificación de ECA por cromatografía de afinidad

3.1.3.1 Cromatografía de afinidad en columna

Se empaquetó una columna con el adsorbente de afinidad galactosil-agarosa sintetizado en el laboratorio, y se equilibró con PBS. A continuación, se aplicó a la columna el extracto obtenido en 3.1.1. Se lavó con PBS recolectando fracciones de 2 ml hasta

MATERIALES Y MÉTODOS

alcanzar una absorbancia a 280nm (A_{280}) menor o igual a 0.05 unidades. Posteriormente, se realizó la elución utilizando una solución de galactosa 0.2 M en PBS, recolectando fracciones de 2 ml a una velocidad de flujo de 60 ml/h. Las fracciones colectadas fueron sembradas en electroforesis de acuerdo al protocolo descrito más adelante en la sección 3.4.3.

3.1.3.2 Cromatografía de afinidad en batch

Se utilizó el mismo adsorbente de afinidad galactosil-agarosa descrito previamente, sintetizado en el laboratorio. Se mezcló el extracto inicial con el adsorbente y la mezcla fue incubada bajo homogenización suave durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se retiró el percolado por succión y para la elución se empaquetó el gel en una columna. Se realizaron sucesivos lavados con PBS hasta A_{280} menor a 0.1. La elución se realizó mediante un gradiente por saltos usando Galactosa (0.2 M y 0.5 M) en PBS monitoreando la A_{280} durante la misma.

3.2. Generación de glicoisofomas de transferrina mediante deglicosilación

Con el objetivo de generar distintas glicoisofomas de transferrina humana recombinante, se realizó un proceso de deglicosilación en etapas secuenciales. El protocolo incluyó 2 etapas: una desialilación química seguida de una degalactosilación enzimática, lo que permitió generar diferentes perfiles de glicosilación de la transferrina que fueron utilizados en estudios posteriores.

3.2.1. Desialilación química de hTrf

La glicoproteína fue desialilada químicamente mediante incubación con ácido acético 2N a 80°C durante 2 horas (Porciúncula González, 2019). Luego, se sometió a filtración en gel y se llevó a sequedad.

3.2.2. Degalactosilación enzimática de Asialo-Transferrina

Posteriormente, la proteína desialilada fue incubada durante 24 horas a temperatura ambiente con la enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* previamente inmovilizada en soporte glutaraldehído-agarosa de acuerdo a (Rodríguez et al., 2018) para eliminar los residuos de galactosa expuestos tras la desialilación. Luego de la incubación, la muestra fue separada del derivado enzimático mediante filtración en placa, a continuación se le realizó una gel filtración en columna NAP5.

3.3. Optimización del ensayo de reconocimiento en placa mediante ELLA

3.3.1. Biotinilación de las lectinas

Se incubó 1 ml de la solución (2 mg/ml) de cada lectina indicada en la Tabla 1, en buffer PBS con el agente biotinilante NHS-LC-LC-Biotin (biotin amidocaproato *N* hidroxisuccinimida) en DMSO, preparado inmediatamente previo a su uso (2mg de NHS-LC-LC en 350 μ L de DMSO), de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Thermo Scientific Pierce, USA). Se utilizó una relación molar de 1:20 (proteína:biotina) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se separó el exceso de biotina mediante gel filtración en columnas de Sephadex G25 (NAP-5).

3.3.1.1. Cálculo de la cantidad de biotina a utilizar

La cantidad de biotina a utilizar depende de la cantidad y concentración de la proteína. Para 2 mg/ml de proteína se recomienda usar ≥ 20 veces la concentración molar (Thermo Scientific Pierce, USA).

$$mmol \text{ Biotina} = mL \text{ proteína} \times \left(\frac{mg \text{ proteína}}{mL \text{ proteína}} \right) \times \left(\frac{mmol \text{ proteína}}{mg \text{ proteína}} \right) \times \left(\frac{20mmol \text{ biotina}}{mmol \text{ proteína}} \right)$$

Los microlitros de solución 10mM de biotina en DMSO se calculan como,

MATERIALES Y MÉTODOS

$$\mu L \text{ de biotina en DMSO} = \text{mmol biotina} \times \left(\frac{1.000.000 \mu L}{L} \right) \times \left(\frac{L}{10 \text{ mmol}} \right)$$

3.3.2. Ensayos de tipo ELLA

El ensayo de fase sólida se realizó de acuerdo con la técnica reportada por *Rapoport et al.* 2010, con modificaciones.

Se utilizaron placas de 96 pocillos de fondo plano sensibilizadas con 100 μ L/pocillo de la glicoproteína de interés en buffer carbonato de sodio 0.1 M, pH 9.6 e incubadas a 4°C en cámara húmeda durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con una solución de PBS-Tween 0.05% (solución de lavado, 100 μ L/pocillo). Las interacciones inespecíficas fueron bloqueadas con seroalbúmina bovina (BSA) al 2% en PBS (100 μ L/pocillo) mediante incubación a 37°C durante 2 horas. Se realizaron tres lavados como se describió y luego se agregaron 50 μ L/pocillo de la lectina correspondiente conjugada a biotina en concentraciones variables, disuelta en PBS-BSA al 1% con Tween 0.05%, seguido de incubación a 37°C durante 2 horas. Luego de tres lavados adicionales, se añadieron 50 μ L/pocillo de estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano picante (HRP del inglés horseradish peroxidase) en PBS-BSA 0.3% y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Finalmente, para el revelado se utilizó una solución de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina); se agregaron 50 μ L de esta solución en cada pocillo y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 minutos hasta desarrollar el complejo coloreado. La reacción se detuvo y estabilizó añadiendo 25 μ L de H₂SO₄ 2N, y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de placas.

3.3.2.1. Evaluación de diferentes condiciones de bloqueo.

Para minimizar las interacciones inespecíficas y mejorar la sensibilidad del ensayo ELLA, se evaluaron distintas condiciones de bloqueo, variando los agentes bloqueantes, los tiempos de incubación y los volúmenes empleados. Se probaron tres soluciones de bloqueo: PBS con leche al 3%, PBS con seroalbúmina bovina (BSA) al 2% y PBS con

MATERIALES Y MÉTODOS

Tween 20 al 0.05%. Las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente o a 37°C, durante 1 a 2 horas, utilizando volúmenes de 100 a 200µL por pocillo.

3.4. Análisis

3.4.1. Concentración de proteínas.

Se estimó midiendo la absorbancia a 280nm en espectrofotómetro UV-visible.

3.4.2. Cuantificación de la biotinilación

Se realizó la cuantificación en microplaca utilizando el kit de cuantificación de biotina de Thermo Scientific Pierce, que incluye una premezcla de HABA (4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) y avidina, junto con un control positivo de HRP biotinilada. El HABA es un colorante que presenta propiedades de absorbancia cuando se une a la avidina, formando un complejo que absorbe a 500nm. Los microtubos con HABA/avidina se dejaron a temperatura ambiente y se les añadió 100 µL de agua ultrapura. En la microplaca se colocaron 160 µL de PBS en cada pocillo a utilizar, seguidos de 20 µL de la solución HABA/avidina preparada anteriormente, se agitó y se midió absorbancia a 500nm. Luego se añadió la lectina biotinilada y se volvió a medir absorbancia a 500nm, registrando el valor una vez que este permaneció constante durante 15 segundos. Con los valores de absorbancia obtenidos se realizaron los cálculos de moles de biotina por mol de proteína.

1. Cálculo de la concentración de la proteína biotinilada expresada en mmol/mL, antes de cualquier dilución realizada para la cuantificación

$$\text{mmol proteína/mL} = \frac{[\text{proteína}](\text{mg/mL})}{\text{PM de la proteína (mg/mmol)}} ; \quad \text{PM: peso molecular de la proteína}$$

2. Cálculo del cambio en la absorbancia a 500nm

$$\Delta A_{500} = (A_{500} H/A) - (A_{500} H/A/B)$$

MATERIALES Y MÉTODOS

A₅₀₀H/A: Absorbancia a 500nm para la mezcla de reacción HABA/Avidina

A₅₀₀H/A/B: Absorbancia a 500nm para la mezcla de reacción HABA/Avidina/Biotina

3. Cálculo de la concentración de biotina, expresada en mmol/mL de mezcla de reacción

$$\frac{\text{mmol biotina}}{\text{ml mezcla de reacción}} = \frac{\Delta A_{500}}{(34000 \times 0.5)}$$

4. Cálculo de mmol de biotina por mmol de proteína en la muestra original

$$\frac{\text{mmol biotina}}{\text{mmol proteína}} = \frac{(\text{mmol/ml de biotina en mezcla de reacción})(10)(\text{factor de dilución})}{\text{mmol/ml de proteína en la muestra original}}$$

3.4.3. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS – PAGE)

Volúmenes de 10µL de las distintas muestras proteicas se sembraron en un gel homogéneo de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Las muestras fueron tratadas previamente mezclando 2 volúmenes de muestra y un volumen de buffer de muestra (0.92 g de dodecilsulfato de sodio (SDS), 4 g de glicerol, 0.3 g de TRIS, β-mercaptoetanol 5% (v/v) y 2 mL de una solución 0.1 % de azul de bromofenol en 20 mL de agua, ajustado a pH 6.8) y se calentó a 100°C durante 5 minutos.

La SDS-PAGE se realizó de acuerdo a los procedimientos estándar en un equipo BIORAD Modelo Mini-Protean II. Una vez finalizada la corrida, realizó el revelado utilizando el método de tinción con Coomassie Brilliant Blue.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Extracción y purificación de la lectina de *Erythrina crista-galli* (ECA)

El alto contenido lipídico en las semillas de *Erythrina cristagalli* genera inconvenientes al utilizar soluciones acuosas derivadas de ellas en columnas cromatográficas, ya que estas soluciones tienden a volverse rápidamente opalescentes, lo cual es inadecuado para su uso en el proceso de purificación (Bautista, 2013). Por este motivo, se realizó una deslipidización previa utilizando un solvente orgánico, *n*-hexano, con el objetivo de evitar la opalescencia y su impacto negativo en la purificación de la lectina.

Para la purificación de ECA se realizó una cromatografía de afinidad con el adsorbente galactosil-agarosa, basado en la especificidad de esta lectina por residuos de galactosa. Se ensayaron dos variantes de purificación, que se describen y analizan a continuación. La presencia de lectina en cada etapa del proceso fue monitoreada mediante análisis electroforético, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos.

A partir de 25.2 g de harina de semillas, se obtuvieron 15.5 g de harina deslipidizada.

A continuación, se presenta un esquema general que resume los pasos principales llevados a cabo para la extracción y purificación de ECA a partir de semillas de *Erythrina crista-galli*. El diagrama ilustra las etapas clave del procedimiento y las fracciones obtenidas tras cada proceso (Figura 5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

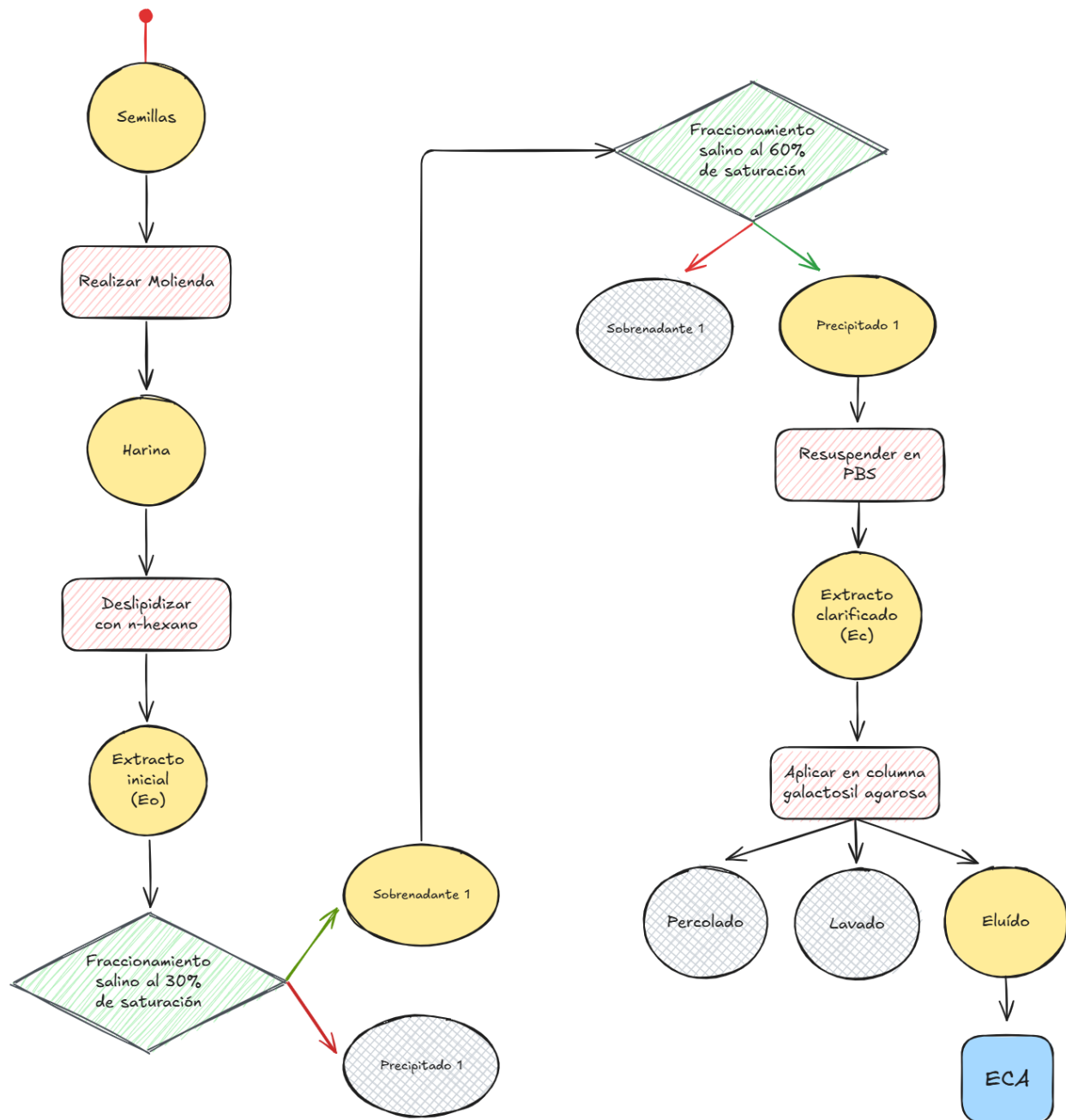


Figura 5. Esquema general del proceso de extracción y purificación de ECA a partir de semillas.

4.1.1. Variantes en el proceso de purificación de ECA

Para la purificación de la lectina se emplearon dos estrategias: cromatografía de afinidad en batch y en columna.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1.1. Cromatografía de afinidad en columna

A partir de 12 g de harina deslipidizada se realizó una extracción acuosa utilizando buffer PBS, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. El extracto clarificado fue sometido a un fraccionamiento salino con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, precipitando proteínas a niveles de saturación salina del 30% y 60%. Partiendo de 60 ml del extracto deslipidizado clarificado, luego del fraccionamiento salino se obtuvieron 6,5 ml de extracto, el cual se aplicó a la columna de afinidad (Ec).

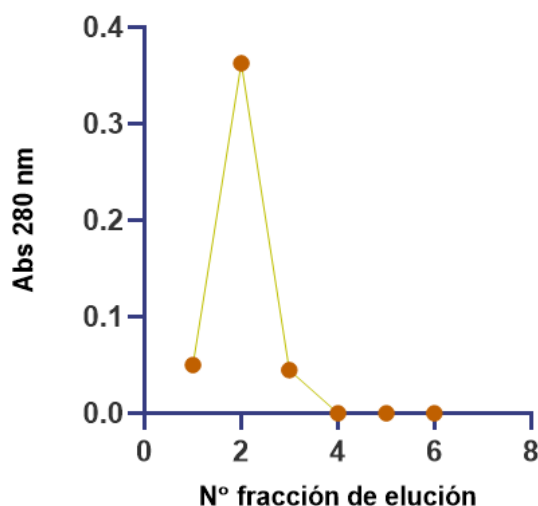


Figura 6. Perfil de la elución de la purificación de ECA en columna de galactosil-agarosa.

Luego de realizar lavados con PBS para eliminar componentes no específicamente unidos al adsorbente se procedió con la elución, obteniéndose el perfil mostrado en la Figura 6, donde se observa que la fracción del eluido con mayor contenido proteico es la 2 (E2). Se detectó presencia de proteínas en las primeras tres fracciones eluidas, mientras que en las fracciones siguientes ya no se observó contenido proteico detectable.

Para analizar la pureza alcanzada durante la cromatografía se realizó una corrida electroforética en gel de poliacrilamida 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de las diferentes fracciones cromatográficas (Figura 7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

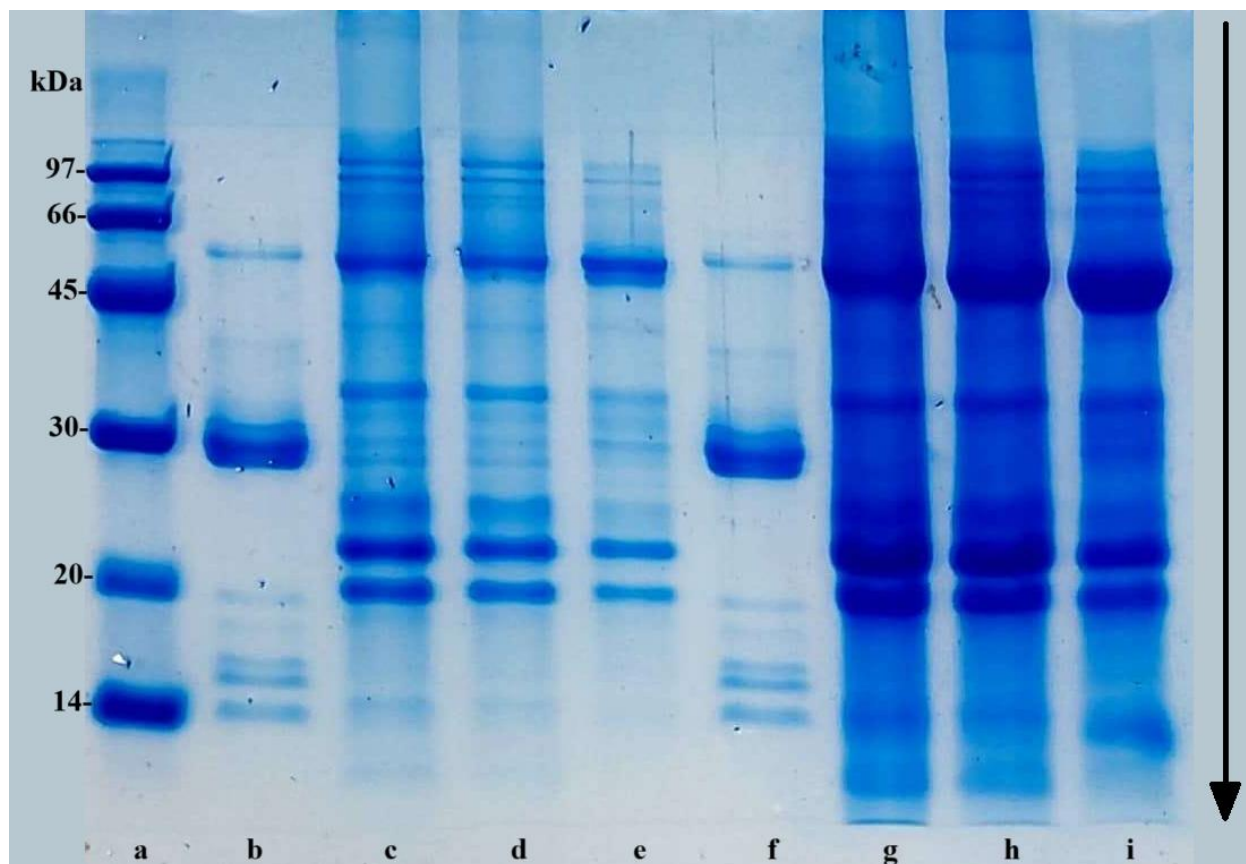


Figura 7. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad en columna del extracto de ceibo en galactosil-agarosa. Gel homogéneo de 12%, revelador: Coomassie Brilliant Blue (CBB). Carril a: Estándares de peso molecular; b: eluido 2 dilución 1/10; c: fracción de lavados (L) dilución 1/10; d: percolado (P) dilución 1/10; e: extracto clarificado dilución 1/10; f: E2; g: L; h: P; i: Ec. kDa: kilodaltons

En el carril b del gel de electroforesis se observa la fracción 2, correspondiente al eluido con mayor concentración de proteínas. Esta muestra presenta una banda mayoritaria con un peso molecular aproximado de 28 kDa, valor que coincide con el reportado para las subunidades de ECA (26 y 28 kDa, según Iglesias *et al.*, 1982). Esta misma banda también se detecta en el extracto inicial (carril c), en el lavado (carril d) y en el percolado (carril e), aunque con mucha menor intensidad.

El análisis de los carriles f, g, h e i, correspondientes a las mismas fracciones, pero en su concentración original (sin diluir), refuerza estas observaciones: la banda característica de ECA es más intensa en el eluido y en el extracto inicial, y menos notoria en el lavado y el percolado. La presencia de la banda en estas últimas fracciones podría

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

explicarse por una pérdida muy menor de lectina durante el proceso de aplicación y lavado, probablemente debida a una capacidad insuficiente del gel de afinidad utilizado en la cromatografía de afinidad, para retener completamente la cantidad de lectina presente en el extracto.

Claramente, el perfil de la fracción 2 muestra una disminución notable en la cantidad e intensidad de bandas respecto al extracto inicial, mostrando la purificación alcanzada. Sin embargo, se siguen observando algunas bandas tenues de bajo peso molecular y al menos 2 banditas de peso molecular superiores al de ECA, lo que evidencia la presencia de algunas impurezas proteicas, por lo que podrían ser necesarias etapas adicionales de purificación, en caso de necesitarse una muestra más homogénea.

La fracción 2 eluida se almacenó a 4°C en PBS-galactosa 0.2 M hasta su biotilación. Luego de la reacción de biotilación se realizó una gel filtración en columna NAP-5 (Sephadex G-25) contra buffer PBS, eliminando la galactosa y la biotina remanente.

4.1.1.2. Cromatografía de afinidad en batch

Se realizó una variante de purificación mediante una cromatografía en proceso batch. Para ello se partió de las mismas condiciones que la cromatografía anterior, mezclando en batch el extracto inicial obtenido (6.5 mL) con el soporte galactosil-agarosa agitando suavemente durante una hora. Al cabo de este tiempo se filtró por placa retirándose el líquido percolado, y se realizaron sucesivos lavados del gel con PBS. A continuación, se eluyó con solución de Gal 0.2 M en PBS, obteniéndose lecturas de absorbancia a 280 muy bajas, por lo que se probó eluir con una solución de Gal 0.5 M en PBS, sin observar cambios en el resultado. Claramente el proceso en batch no resulta eficiente para la purificación de la lectina. En base a esta observación, se decidió re-cromatografiar en columna de afinidad, el percolado obtenido en el proceso en batch. Como resultado, se logró obtener la lectina con mayor pureza, sin embargo este procedimiento no mejoró la purificación alcanzada en el proceso en columna descrito en la sección 4.1.1.1, por lo que se continuó el trabajo con la fracción 2 eluida y gel filtrada.

4.2. Optimización del ensayo ELLA

Con el objetivo de desarrollar un ensayo accesible y sensible que permita detectar diferencias en el perfil de glicosilación de transferrina humana, se diseñó un ensayo ELLA basado en el reconocimiento específico de glicanos por lectinas. Para esto, se optimizaron distintas condiciones experimentales incluyendo la concentración de lectina, la concentración de glicoproteína, las condiciones de bloqueo, los tiempos y temperaturas de incubación y los volúmenes de reacción, entre otros.

Este ensayo consiste en un ELLA de tipo sandwich, en el cual se forma un complejo entre una glicoproteína adsorbida en la superficie de la placa y la lectina-biotinilada específica. La biotina es luego reconocida por estreptavidina conjugada a HRP (peroxidasa de rábano picante) y mediante la adición de TMB como sustrato, se desencadena una reacción de oxidación que genera un cambio de color. Este color se cuantifica midiendo la absorbancia a 450nm (Figura 8).

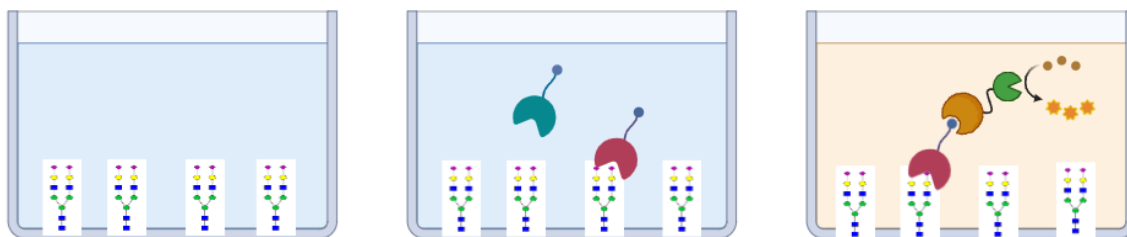


Figura 8. Esquema del ensayo ELLA tipo sandwich.

Para la optimización del ensayo se usaron varias glicoproteínas modelo con diferentes perfiles de glicanos, en un rango de concentración entre 0.1 y 20 $\mu\text{g/mL}$. Se evaluaron: lactoferrina bovina, fetuina (y asialo-fetuina) de suero fetal bovino, BSA y lisozima de clara de huevo (ambas como control negativo), hTrf, bTrf y RNAsa B bovina.

Se usaron las lectinas seleccionadas: ConA, SNA, SBA, WGA, PSA y PHA-L y se analizaron en concentraciones entre 0.1 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Además, se probaron diversas condiciones de bloqueo, utilizando PBS-leche al 3%, PBS-BSA al 2% y PBS-Tween 0.05%, con tiempos de 1 a 2 horas, temperaturas de incubación ambiente ó a 37 °C, y

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

volúmenes muestra de 100 a 200 μL . La absorbancia a 450nm observada para cada muestra denota el grado de formación del complejo lectina-glicoproteína en cada una de las condiciones de ensayo.

4.2.1. Optimización de la concentración de lectina a aplicar

Se evaluó el reconocimiento de las 6 lectinas seleccionadas, frente a hTrf y evaluadas en tres concentraciones (10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$) (Fig.9).

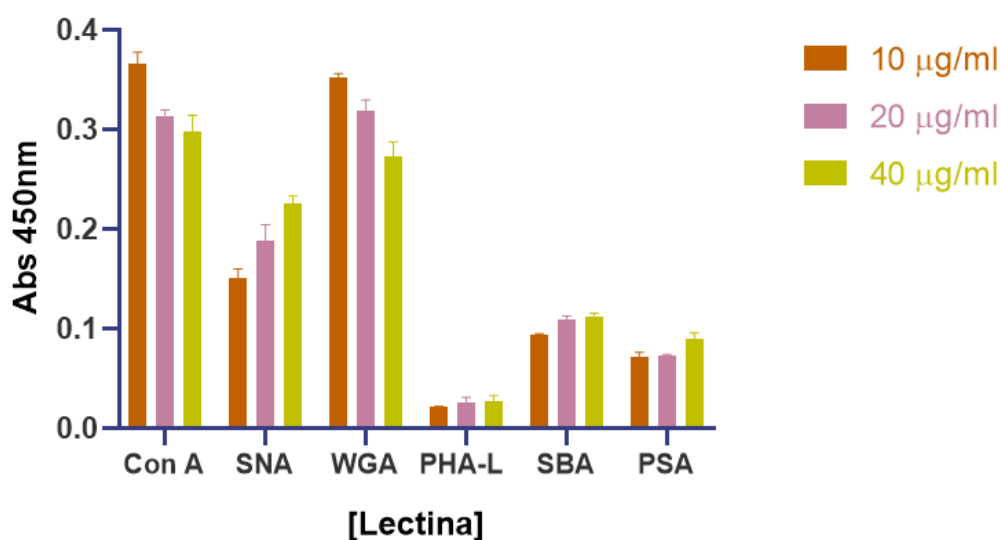


Figura 9. Evaluación del reconocimiento de lectinas biotiniladas frente a transferrina humana recombinante (hTrf). Lectinas (ConA, SNA, WGA, PHA-L, SBA, y PSA) en concentraciones 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$; hTrf en concentración 10 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados obtenidos muestran un reconocimiento diferencial frente a hTrf que es consistente con las especificidades detalladas para dichas lectinas en la Tabla 1. WGA y ConA representan las señales más altas de reconocimiento. En el caso de ConA, este comportamiento podría explicarse por su capacidad de reconocer N-glicanos biantenarios complejos, incluso con extensiones como ácido siálico o GlcNAc, según estudios recientes de Bojar et al., 2022. SNA presentó un reconocimiento moderado, compatible con su especificidad por residuos sialilados, mientras que PHA-L, SBA y PSA mostraron señales bajas, lo que resulta coherente debido a la ausencia o escasez de sus

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

epítomos específicos expuestos en la estructura de los glicanos de la transferrina. Si bien algunas señales podrían no corresponderse completamente con lo esperado según la especificidad teórica de cada lectina, estos resultados deben interpretarse como parte de una etapa inicial de optimización, en la cual múltiples variables del ensayo aún están siendo ajustadas.

Por su parte, la evaluación en tres concentraciones de las lectinas (10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$) mostró que la señal no siempre se incrementa proporcionalmente, lo que podría deberse a una saturación y refuerza la necesidad de seguir optimizando el sistema.

4.2.2. Optimización de la concentración de glicoproteína y de lectina en el ensayo

Para continuar con la optimización del ensayo, se evaluó el reconocimiento de dos lectinas, Con A y SNA, frente a distintas glicoproteínas (Figuras 10 y 11). La lectina WGA fue excluida de estos ensayos, ya que en reiteradas oportunidades mostró resultados inconsistentes con respecto a su especificidad de unión.

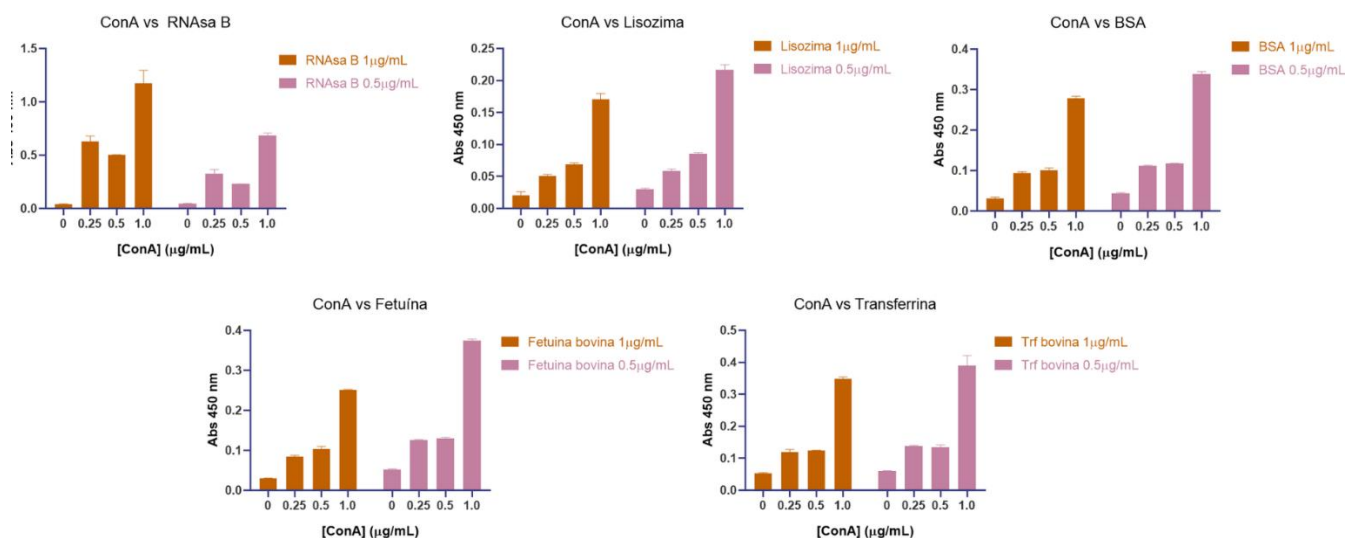


Figura 10. Evaluación del reconocimiento de ConA frente a distintas glicoproteínas modelo. Glicoproteínas en concentración fija de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y 1.0 $\mu\text{g/mL}$; ConA en concentraciones crecientes (0 $\mu\text{g/mL}$ [sin lectina], 0.1, 0.25 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

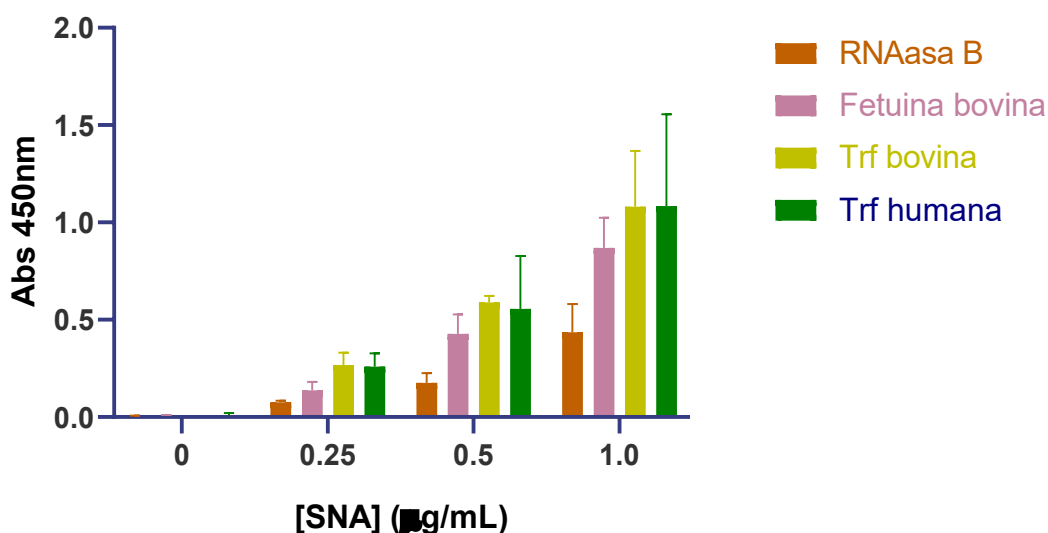


Figura 11. Evaluación del reconocimiento de SNA frente a distintas glicoproteínas modelo. Glicoproteínas en concentración fija de 1,0 µg/mL; SNA en concentraciones crecientes (0 µg/mL [sin lectina], 0.1, 0.25 y 0.5 µg/mL).

Frente a ConA (Figura 10), se evaluaron dos concentraciones de glicoproteína (0.5 y 1.0 µg/mL), mientras que frente a SNA (Figura 11) se utilizó una única concentración (1.0 µg/mL).

Se observa que ConA y SNA se unen diferencialmente a las distintas glicoproteínas testeadas. En el caso de ConA, el reconocimiento es claramente mayor frente a RNAasa B, una glicoproteína que posee un único glicano de alto contenido de manosa, en comparación con fetuina y bTrf, que presentan glicanos de tipo complejo. Como era esperable, no se detecta señal significativa en los controles negativos (lisozima y BSA), ambas proteínas no glicosiladas. Respecto a la concentración de ConA, se observa que la señal aumenta proporcionalmente con la cantidad de lectina utilizada, lo que indica que, en el rango ensayado, la concentración de lectina influye directamente en la eficiencia del reconocimiento lectina-carbohidrato.

Este perfil concuerda con la especificidad de ConA, que reconoce estructuras de manosa terminal o ramificada. Sin embargo, estudios recientes (*Bojar et al. 2022*) han demostrado que también puede unirse a *N*-glicanos complejos biantenarios con diversas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

extensiones, lo que podría explicar cierta respuesta frente a fetuina y transferrina. A pesar de su capacidad de reconocimiento, este amplio espectro limita su utilidad como herramienta diagnóstica específica, por lo que sería recomendable considerar otras lectinas con mayor selectividad por manosa terminal.

En el caso de SNA (Figura 11), se observa una baja señal de reconocimiento frente a RNAsa B, lo cual es esperable dada la ausencia de residuos de ácido siálico en dicha glicoproteína. Por el contrario, se detecta una respuesta moderada y de intensidad similar frente a fetuina, bTrf y hTrf, todas ellas con presencia de glicanos con ácido siálico terminal. Este comportamiento es coherente con la especificidad de SNA y podría respaldar su potencial aplicación como lectina indicadora de niveles de sialilación en muestras con alteraciones en la glicosilación. Asimismo, se observa una clara relación proporcional entre la concentración de SNA y la señal de interacción, lo que sugiere una respuesta dependiente de la cantidad de lectina disponible. En función de estos resultados, se podría continuar trabajando con la concentración más alta utilizada (1.0 µg/mL).

4.2.3. Optimización de las condiciones de bloqueo en el ensayo de ELLA

Un paso siguiente en la optimización fue evaluar distintos métodos de bloqueo para minimizar la unión inespecífica durante el ensayo ELLA. El bloqueo es crucial para evitar que las lectinas se unan a sitios inespecíficos en la placa, lo que podría generar señales falsas y afectar la precisión del análisis. Se probaron diferentes agentes bloqueantes, como albúmina sérica bovina (BSA) de distintos proveedores (en PBS), PBS-leche 3% y PBS-Tween 0.05% con el objetivo de identificar cuál proporcionaba la mayor reducción de señales inespecíficas sin interferir con la unión específica de las lectinas a las glicoproteínas.

Los resultados obtenidos (Figuras 12 y 13) permitieron determinar el agente bloqueante más eficaz, lo que incrementó la sensibilidad y especificidad del ensayo, y optimizó la detección de diferencias en las interacciones lectina-glicoproteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

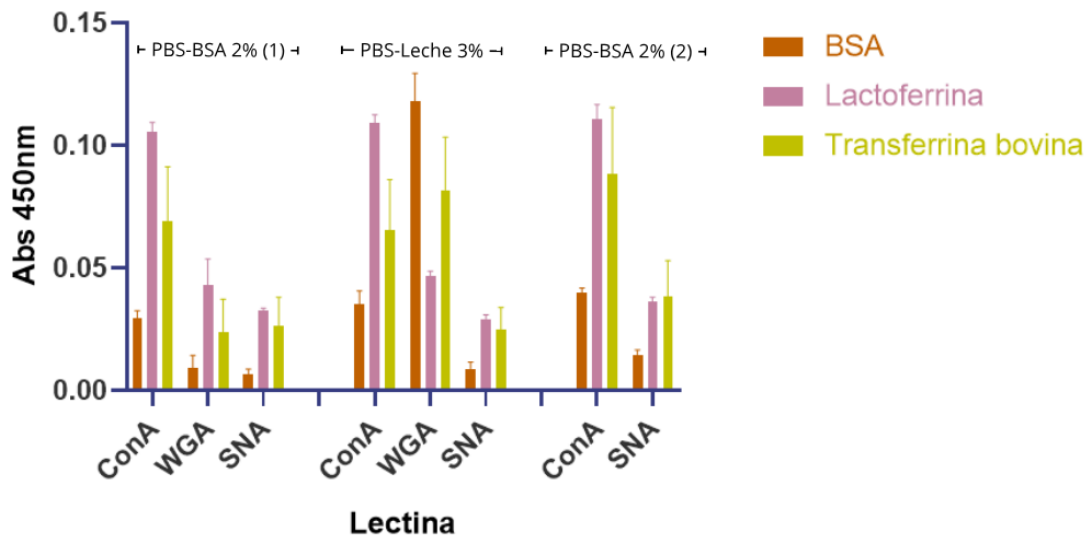


Figura 12. Evaluación de distintas condiciones de bloqueo para la optimización del ensayo ELLA. 3 métodos de bloqueo: dos bloqueos con BSA proveniente de 2 proveedores diferentes (2% en PBS) y PBS-Leche 3%. ConA, WGA y SNA en concentración 25 $\mu\text{g/ml}$ y glicoproteínas (BSA, lactoferrina (LF) y transferrina bovina (bTrf)) en concentración 10 $\mu\text{g/ml}$.

Los resultados muestran que frente a BSA (proteína no glicosilada) las señales son bajas en todas las condiciones, mientras que en el bloqueo con PBS-Leche 3% se obtiene una señal más alta de interacción, especialmente frente a WGA. Esto sugiere que esta condición de bloqueo es menos eficiente para prevenir uniones inespecíficas, ya que por las especificidades y características de BSA y WGA la interacción entre ambas debería ser muy baja o nula. Por otra parte, tanto lactoferrina como transferrina bovina muestran mayores señales de Absorbancia a 450nm frente a las tres lectinas, lo que es coherente con sus glicosilaciones y con la especificidad de estas lectinas. Frente a estas glicoproteínas también se observa una mayor señal de interacción con WGA bajo la condición de bloqueo con PBS-Leche 3%, sin embargo, como la señal está también aumentada frente a BSA, se podría decir que existe un aumento de uniones inespecíficas con este agente bloqueante.

El bloqueo con PBS-BSA al 2% usando BSA de 2 fuentes comerciales diferentes muestran perfiles similares, con baja señal para BSA y notorias diferencias entre BSA y las glicoproteínas glicosiladas, lo que sugiere que ambas muestras de BSA comerciales pueden usarse indistintamente, generando condiciones de bloqueo adecuadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por lo tanto, las preparaciones de PBS-BSA 2% parecen ser más efectivas como agentes bloqueantes, ya que minimizan la señal inespecífica con BSA y no comprometen la interacción lectina-glicoproteína específica. Los resultados obtenidos bajo las condiciones de bloqueo con PBS-Leche 3% sugieren un mayor riesgo de unión inespecífica.

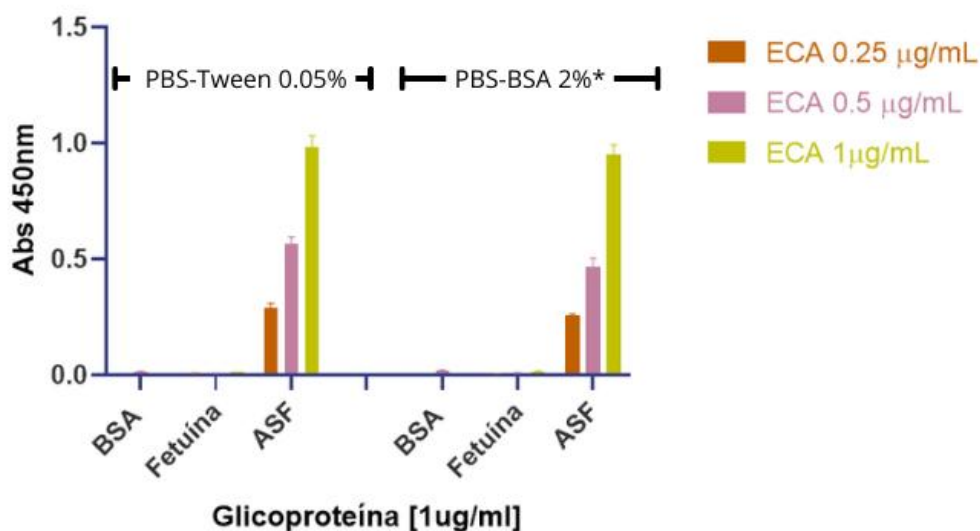


Figura 13. Evaluación de dos condiciones de bloqueo frente a ECA. Bloqueo con PBS-BSA 2%* (preparada inmediatamente antes de utilizarla) y PBS-Tween 0.05%. Glicoproteínas en concentración 1 µg/mL; ECA en concentraciones 0.25, 0.5 y 1.0 µg/mL.

En la Figura 13 se muestra los resultados de la comparación de dos condiciones de bloqueo (PBS-BSA al 2% preparado inmediatamente previo a su uso y PBS-Tween al 0.05%), evaluando su efecto sobre la interacción entre las glicoproteínas (BSA, fetuina y asialofetuina) y la lectina ECA ensayada en tres concentraciones. Tal como se esperaba, no se observó señal de interacción con BSA. Tampoco se registró señal con fetuina, cuyas cadenas de *N*-glicanos están terminalmente sialiladas. En cambio, en la asialofetuina obtenida por remoción de ácido siálico, los residuos de galactosa quedan expuestos, lo que permite una interacción eficiente con ECA, reflejada en una señal elevada. Esta respuesta es consistente con la especificidad de ECA por estructuras tipo Gal β 1-4GlcNAc terminales. Además, se observa una clara correspondencia con la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concentración de lectina, donde a mayor concentración de la misma se observa mayor señal de interacción.

No se observaron diferencias significativas entre las condiciones de bloqueo con PBS-Tween 0.05% y con PBS-BSA al 2% preparado inmediatamente antes de su uso, obteniéndose resultados prácticamente equivalentes en ambos casos.

A partir de los resultados obtenidos y del análisis comparativo con estudios previos, se concluye que la solución de bloqueo más efectiva fue PBS-BSA al 2%, preparada inmediatamente antes de cada ensayo. Esta condición permitió una mayor reducción de las interacciones inespecíficas y favoreció una señal específica más clara en la unión entre lectinas y glicoproteínas, mejorando así la sensibilidad del sistema. Si bien los resultados fueron similares a los obtenidos con PBS-Tween 0.05%, se optó por utilizar PBS-BSA al 2%, ya que se trata de un método ampliamente aceptado y respaldado en la bibliografía para ensayos tipo ELLA.

4.3. Biotinilación de las lectinas

La biotinilación de las lectinas constituyó un paso crucial para facilitar su detección en los ensayos posteriores. Este proceso se llevó a cabo mediante la incubación de las proteínas con el NHS-LC-LC-Biotin, un agente biotinilante que permitió una modificación eficiente sin comprometer su actividad biológica. Este reactivo contiene un espaciador largo que mejora la accesibilidad de la biotina una vez incorporada. Su mecanismo de acción se basa en la formación de enlaces covalentes tipo amida entre el grupo ϵ -amino de los residuos de lisina expuestos en la superficie de la proteína y el grupo N-hidroxisuccinimida (NHS) activado del reactivo (Thermo Scientific, User Guide: EZ-Link® NHS-Biotin Reagents). La eficiencia del proceso depende de múltiples factores, como el número y la accesibilidad de lisinas disponibles, el pH del medio y la relación molar biotina/proteína utilizada durante la incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Verificación funcional de la biotinylación en el ensayo ELLA

Para evaluar la efectividad del proceso, se comparó la detección de ConA nativa y biotinilada y PHA-L nativa y biotinilada, frente a la hTrf, utilizando la formación de un complejo con estreptavidina-HRP. La actividad de HRP se reveló a través de la oxidación del TMB, generando un cambio de color medible a 450nm. Los resultados se ilustran en la Figura 14.

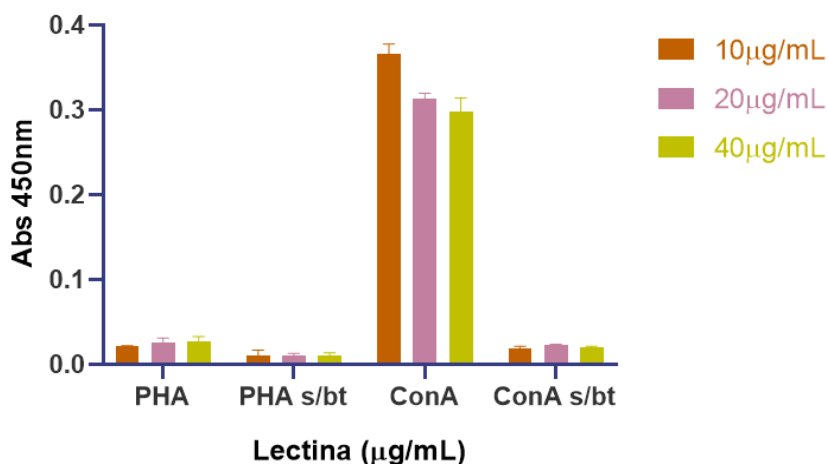


Figura 14. Evaluación del proceso de biotinylación de ConA y PHA-L. Las lectinas fueron evaluadas en concentraciones 10, 20 y 40 µg/mL; hTrf en concentración 10 µg/mL.

Para cada lectina se usaron 3 concentraciones crecientes. Se observan valores notablemente bajos de A_{450nm} con las lectinas no biotiniladas en comparación con las lectinas biotiniladas, destacándose particularmente la diferencia en el caso de ConA. La PHA-L, que presenta especificidad por estructuras triantenarias, muestra una interacción débil con la transferrina, lo cual puede atribuirse a que su unión se ve inhibida por la presencia de ácido siálico con enlace $\alpha 2,6$, característica en los *N*-glicanos de esta glicoproteína. Por su parte, ConA presenta una alta señal de interacción, lo que podría explicarse por su capacidad de reconocer *N*-glicanos biantenarios y tolerar múltiples terminaciones, incluidas las sialiladas que posee la transferrina. Respecto a las concentraciones de las lectinas, no se observan diferencias significativas en la señal entre los tres niveles evaluados, por lo que se podría continuar trabajando con la menor concentración utilizada (10 µg/mL), optimizando así el uso del reactivo sin comprometer

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la sensibilidad del ensayo. Estos resultados indican que el proceso de biotinilación fue adecuado y destacan la importancia de este paso para la correcta detección de la formación del complejo lectina-glicoproteína.

4.3.2. Evaluación de la biotinilación en comparación con una lectina biotinilada comercial

El proceso de biotinilación también fue evaluado mediante la comparación de la SNA biotinilada en nuestro laboratorio con una estándar comercial (SNA-biot Vector), como se muestra en la Figura 15.

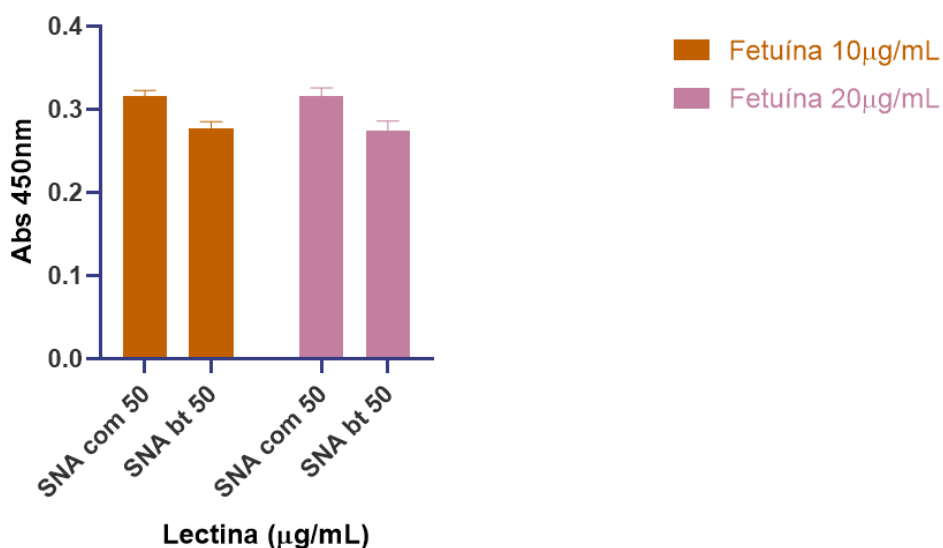


Figura 15. Comparación entre lectina SNA biotinilada (SNA bt) en el laboratorio y una de origen comercial (SNA com). Se evaluó la interacción de SNA biotinilada en el laboratorio (50 µg/mL) y SNA biotinilada comercial (50 µg/mL) frente a fetuina inmovilizada en placa utilizada como glicoproteína modelo, en concentraciones de 10 y 20 µg/mL.

Al comparar la unión de ambas lectinas biotiniladas frente a fetuina, se observa que tanto el grado de biotinilación como la funcionalidad es similar en los dos casos, lo que indica que el proceso de biotinilación realizado en el laboratorio fue exitoso y comparable en calidad al de la SNA comercial. Esto refuerza la idea de que las condiciones de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

biotinilación empleadas son óptimas para preservar la actividad biológica de la lectina, y permitir su interacción con la glicoproteína.

El éxito de la biotinilación alcanzada fue verificado luego por un análisis posterior de cuantificación de los moles de biotina introducidos por mol de proteína (ver sección 3.3.3)

Paralelamente, se realizó una electroforesis SDS-PAGE en gel homogéneo 12%, según se describió en la sección 3.4.2., para verificar si existían diferencias en la corrida de lectinas biotiniladas y sin biotinilar (Figura 16).

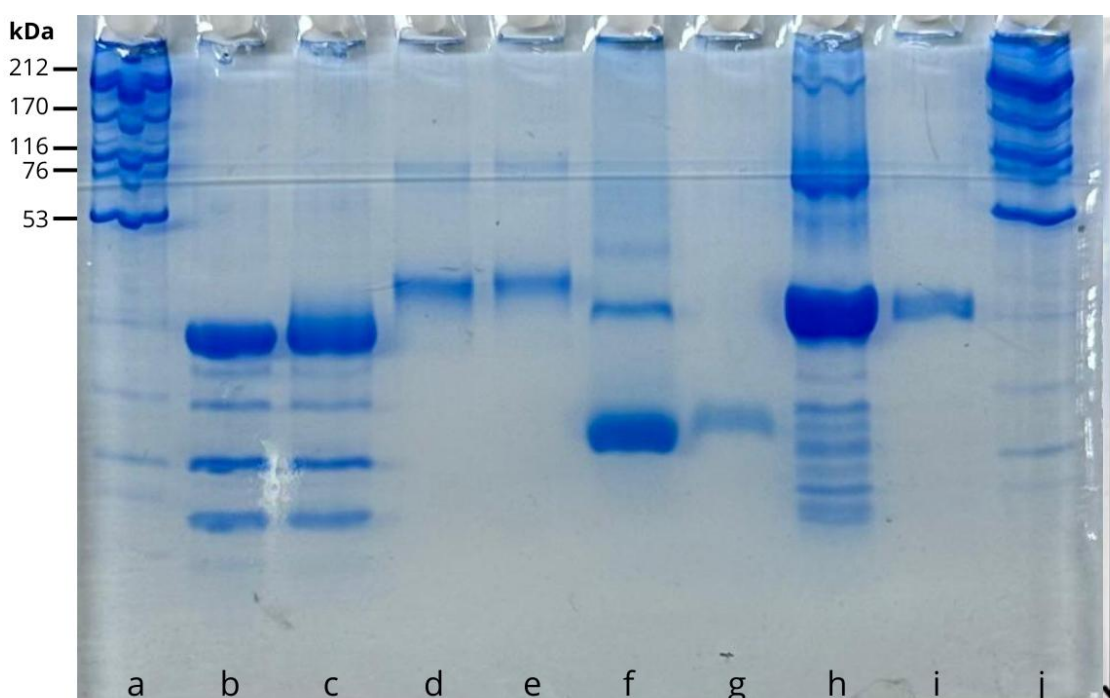


Figura 16. SDS-PAGE de lectinas biotiniladas y sin biotinilar. Gel homogéneo al 12 % y tinción con Coomassie Brilliant Blue (CBB). Carriles a y j: estándares de peso molecular; b: ConA; c: ConA biotinilada; d: SNA; e: SNA biotinilada; f: WGA; g: WGA biotinilada; h: SBA; i: SBA biotinilada.

Para evaluar si el proceso de biotinilación afectó la integridad de las lectinas se realizó una electroforesis SDS-PAGE. No se observan diferencias significativas en el peso molecular aparente de ambos estados de las lectinas (biotiniladas y sin biotinilar), atribuible al bajo peso molecular de las moléculas de biotina y especialmente, a la baja

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cantidad de moléculas de biotina incorporados por lectina (aproximadamente 1 a 6 según la cuantificación de biotinas presentada en la sección 4.3.3).

En el caso de ConA se observa el patrón característico de cuatro bandas en el gel, correspondiente a las unidades monoméricas de esta lectina en condiciones desnaturalizantes, coherente con su estructura nativa de tetrámero. Este patrón se conserva tanto en la muestra biotinilada como en la no biotinilada, lo que indica que el proceso de biotinilación no afectó su integridad estructural. En cuanto a las lectinas WGA y SBA, se observan algunas diferencias entre los perfiles proteicos, en las muestras nativas se observan bandas que no están presentes en las correspondientes biotiniladas. Esto podría deberse a la etapa de gel filtración posterior a la biotinilación, que habría permitido remover impurezas o proteínas presentes en las soluciones originales por interacciones inespecíficas con la columna, permitiendo así contar con lectinas biotiniladas y de mayor pureza que las comerciales.

4.3.3. Cuantificación de la biotinilación de las lectinas

La cuantificación de la biotinilación de las lectinas es un paso fundamental para evaluar la eficiencia del proceso y garantizar que la interacción con la estreptavidina ocurre efectivamente debido a la presencia de biotina en las lectinas. Para ello, se empleó el ensayo con HABA, el cual permite determinar la cantidad de biotina conjugada a las lectinas a través de su interacción con el complejo HABA-avidina. Cuando el HABA se une a la avidina, forma un complejo que absorbe a 500nm. Dado que la biotina tiene una mayor afinidad por la avidina, desplaza al HABA, provocando una disminución en la absorbancia a 500nm de manera proporcional a la cantidad de biotina presente en la muestra (Figura 17).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

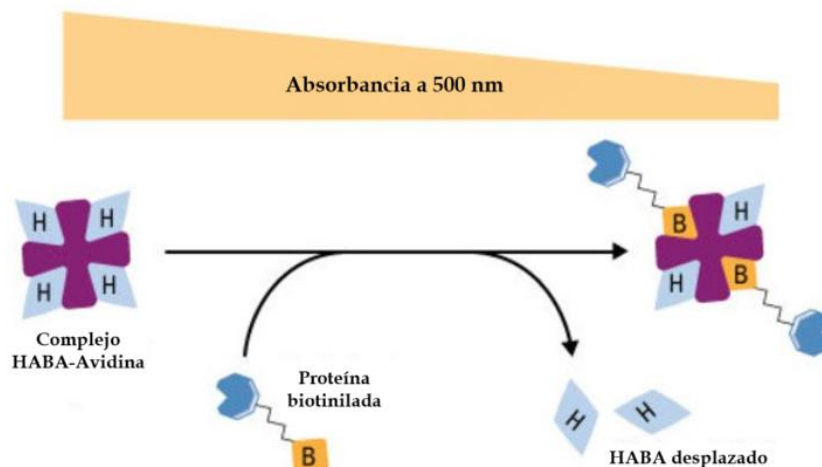


Figura 17. Esquema del ensayo con HABA para la detección de biotina incorporada a la lectina (adaptada de Thermo Scientific Pierce Biotin Quantitation Kit).

El cambio en la absorbancia a 500nm del complejo HABA-avidina antes y después de la adición de la lectina biotinilada se utilizó para cuantificar la cantidad de biotina en cada muestra. Las medidas de absorbancia se realizaron por duplicado para cada lectina utilizada en el trabajo, así como para la HRP biotinilada provista por el fabricante del kit, la cual se emplea como control positivo debido a su grado de biotinilación conocido (Referencia: 4 moléculas de biotina unidas por molécula de HRP) (Tabla 2).

Tabla 2. Cuantificación de biotinas incorporadas a las lectinas, mediante ensayo con HABA. Abs H/a: absorbancia medida a 500nm de la solución HABA/avidina; Abs H/a/b: absorbancia a 500nm de la solución HABA/avidina/biotina. HRP, control positivo.

Lectina biotinilada	Abs H/a (500nm)	Abs H/a/b (500nm)	Mol de Biotina/mol de proteína
SBA	0.662	0.573	6.30
	0.687	0.592	6.70
SNA	0.531	0.517	1.15
	0.653	0.603	0.90
PSA	0.657	0.550	3.00

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

	0.653	0.603	1.40
WGA	0.648	0.556	1.90
	0.638	0.516	2.60
PHA-L	0.656	0.569	6.40
	0.660	0.569	6.70
ConA	0.641	0.604	2.30
	0.697	0.630	4.10
ECA	0.651	0.484	5.30
	0.676	0.577	3.10
HRP-biotinilada (control positivo de biotinilación)	0.638	0.504	3.50

Los resultados obtenidos mediante el ensayo HABA evidenciaron que el grado de biotinilación fue satisfactorio en todas las lectinas usadas, ya que en todos los casos se detectaron más de 1 mol de biotina por mol de proteína. A su vez, el valor correspondiente al control positivo de HRP es de 3.5 biotinas por molécula de proteína, lo cual se aproxima al valor indicado por el fabricante. Esto indica que el procedimiento de biotinilación realizado en el laboratorio permitió incorporar una cantidad suficiente de biotinas como para permitir la interacción con la estreptavidina en los ensayos ELLA y la posterior señal a 450nm.

Al analizar los resultados, se observa que algunas lectinas como SNA presentaron un grado de biotinilación relativamente bajo (0.90-1.15 mol moles de biotina/mol de proteína). Esto podría atribuirse a un número reducido o a una menor accesibilidad de las lisinas expuestas en su superficie. Por otro lado, lectinas como SBA o PHA-L, mostraron valores significativamente más altos, lo que sugiere una mayor disponibilidad de sitios de reacción. Estas diferencias podrían influir en la eficiencia de unión a estreptavidina en los ensayos posteriores, aunque en este caso, como se observó experimentalmente, los niveles obtenidos fueron adecuados para asegurar una señal detectable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un análisis de las estructuras de las lectinas estudiadas durante este trabajo, a los efectos de evaluar si el grado variable de biotinilación podría relacionarse con la cantidad de lisinas superficiales de las proteínas. Todas las lectinas estudiadas poseen en su estructura entre 8 y 12 residuos de lisina por monómero de proteína expuestos al exterior de la proteína (Figura 18). A su vez, en las condiciones de biotinilación (buffer salino, temperatura ambiente, pH 7.4) es de esperar que las mismas se encuentren formando su estructura cuaternaria (por ej. ECA, PSA como dímeros, ConA o PHA-L como tetrameros, etc.). Esto podría causar que parte de las lisinas no estén del todo accesibles para el reactivo de biotinilación. Esto podría explicar el grado de biotinilación entre 3 y 6 biotinas por molécula observado para estas lectinas.

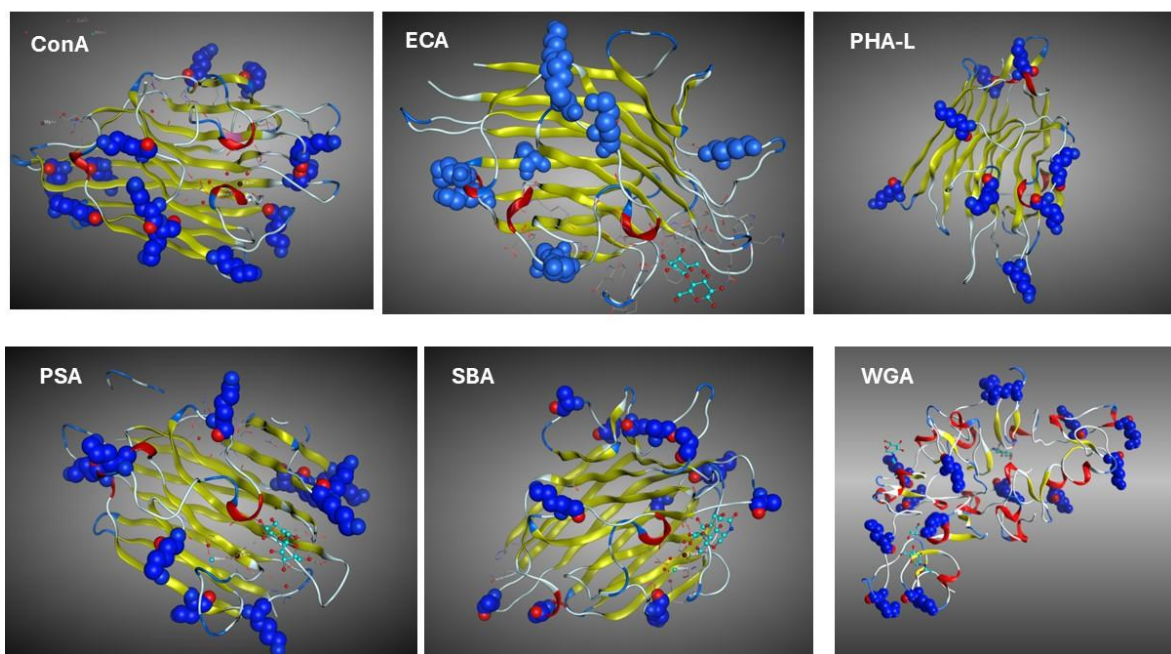


Figura 18. Estructuras de algunas de las lectinas biotiniladas. En azul en modelo de bolas se observan las lisinas.

Otro factor a tener en cuenta es que el protocolo establecido por el proveedor, ya establece un rendimiento de entre 3 y 5 biotinas, por lo cual es un resultado esperable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el caso de la SNA I su estructura no se encontró cristalizada en base de datos, por lo que no se pudo evaluar el grado de accesibilidad de las lisinas. Si bien en este caso el kit HABA/avidina demostró una biotinilación baja respecto a las demás lectinas, Al comparar con SNA-biotinilada obtenida comercialmente (Proveedor: Vector, USA) el reconocimiento a igual concentración de lectina fue el mismo con ambas lectinas. Este hecho confirma que la biotinilación es suficiente y comparable a la obtenida mediante otros protocolos (Figura 15).

4.4. Deglicosilación de Transferrina humana recombinante (hTrf)

Para evaluar si el ensayo en placa optimizado en este trabajo reconoce de forma diferencial las glicoisofomas alteradas de una glicoproteína, y en particular la hTrf, se la modificó mediante una estrategia quimio/enzimática de deglicosilación. Para ello, posterior a la desialilación química, se aplicó una siguiente etapa de degalactosilacion enzimática (Figura 19).

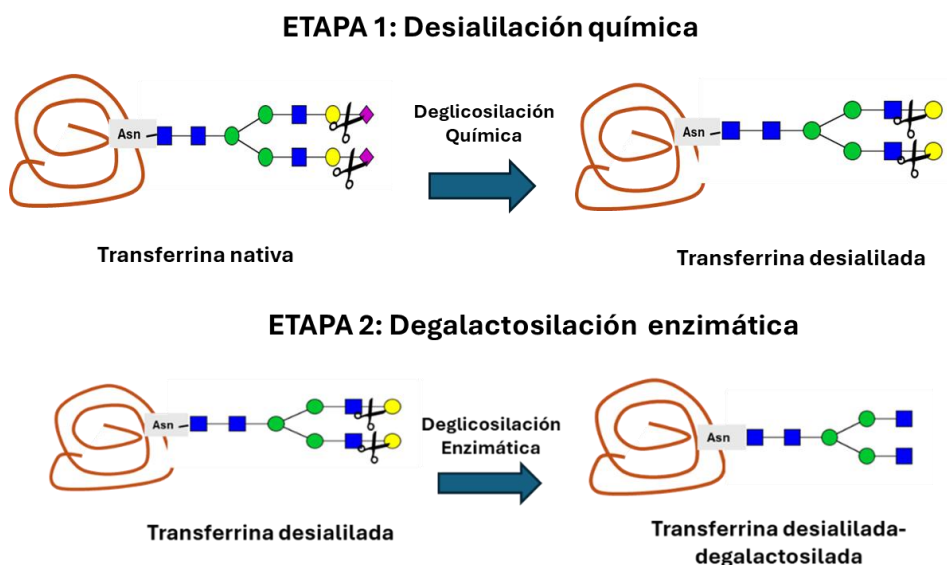


Figura 19. Esquema del tratamiento secuencial aplicado a la transferrina humana recombinante (hTrf) para la generación de glicoisofomas. Incluye una primera etapa de desialilación química y una segunda etapa de degalactosilación enzimática.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La etapa 1 se aplicó tanto a hTrf como a bTrf, ambas de origen comercial. La etapa 2 posterior (degalactosilación enzimática) fue aplicada únicamente a hTrf.

Este enfoque permitió obtener variantes de transferrina con distintos grados de glicosilación, que fueron utilizadas para evaluar el reconocimiento diferencial de las diferentes lectinas en el ensayo ELLA optimizado.

En primer lugar, se realizó un ELLA con hTrf y bTrf, en estados nativo y desialiladas químicamente, frente a las lectinas SNA y ECA, ambas en 3 concentraciones, para garantizar la proporcionalidad (Figuras 20 y 21).

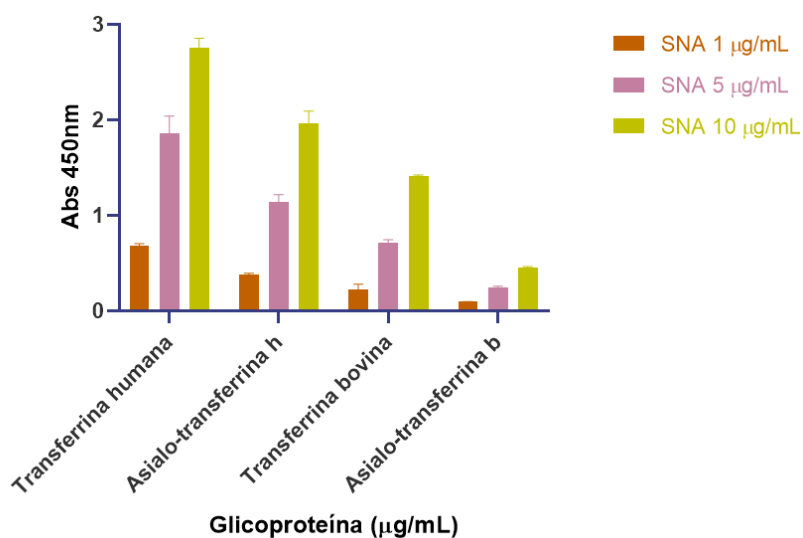


Figura 20. Evaluación del reconocimiento de transferrina nativa y desialilada (humana y bovina) (10 µg/mL) frente a la lectina SNA en concentraciones 1, 5 y 10 (µg/mL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

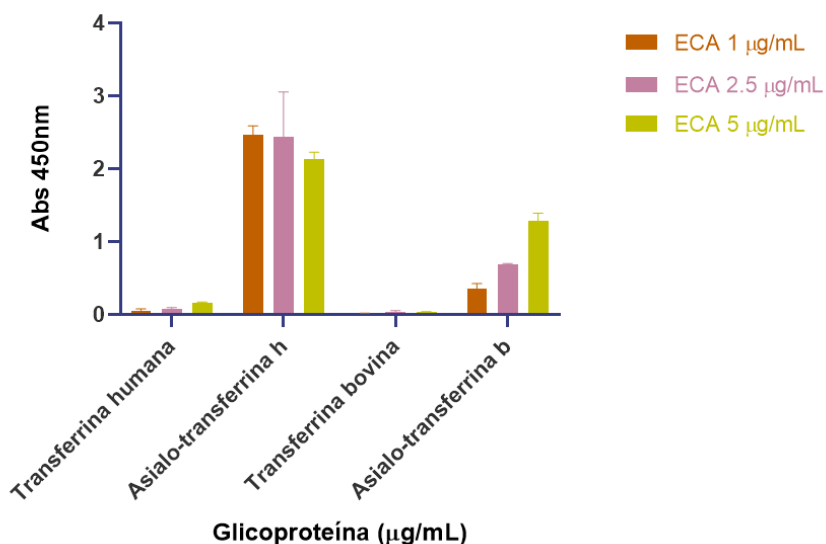


Figura 21. Evaluación del reconocimiento de transferrina nativa y desialilada (humana y bovina) ($10\mu\text{g/mL}$) frente a ECA en concentraciones 1, 2,5 y 5 ($\mu\text{g/mL}$).

En la Figura 20 se observa una clara disminución en la señal de reconocimiento cuando se analiza la asialotransferrina en comparación con la transferrina nativa. Este resultado es consistente con la especificidad de SNA, que reconoce residuos de ácido siálico terminal en glicanos, presentes en la transferrina nativa pero ausentes tras la desialilación. Este comportamiento se mantiene tanto para hTrf como para bTrf, aunque en esta última los niveles de señal fueron considerablemente más bajos en las condiciones evaluadas.

La Figura 21 muestra los resultados obtenidos al evaluar el reconocimiento de las mismas glicoproteínas con la lectina ECA, la cual tiene especificidad por residuos de galactosa terminales. En este caso, se observa un cambio inverso al detectado con SNA: la transferrina nativa, tanto humana como bovina, presentan una señal de reconocimiento muy baja, mientras que las formas desialiladas muestran un nivel más alto de señal. En este caso, la eliminación previa de los residuos de ácido siálico terminales deja expuestos residuos de galactosa, que pueden ahora ser reconocidos por ECA.

Sin embargo, se observan diferencias entre la hTrf y bTrf. En el caso de bTrf (tanto nativa como desialilada), la señal obtenida es notoriamente menor que la de hTrf en sus respectivas glicoisofomas, a pesar de haberse utilizado la misma concentración

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

proteica. Esto sugiere que el perfil de glicosilación entre ambas especies no es equivalente, bTrf podría estar menos glicosilada, o sus glicanos tener una composición o estructura diferente que afecta el reconocimiento por las lectinas utilizadas.

En base a estos resultados, se decidió continuar el trabajo únicamente con hTrf para los ensayos posteriores, dado su mejor desempeño en términos de señal y a la necesidad de contar con un modelo que represente con mayor fidelidad la glicosilación humana.

A continuación se realizó un ensayo ELLA utilizando las tres glicoisofomas de hTrf generadas y se evaluó su interacción con las lectinas SNA, ECA, PHA-L y PSA (Figura 22).

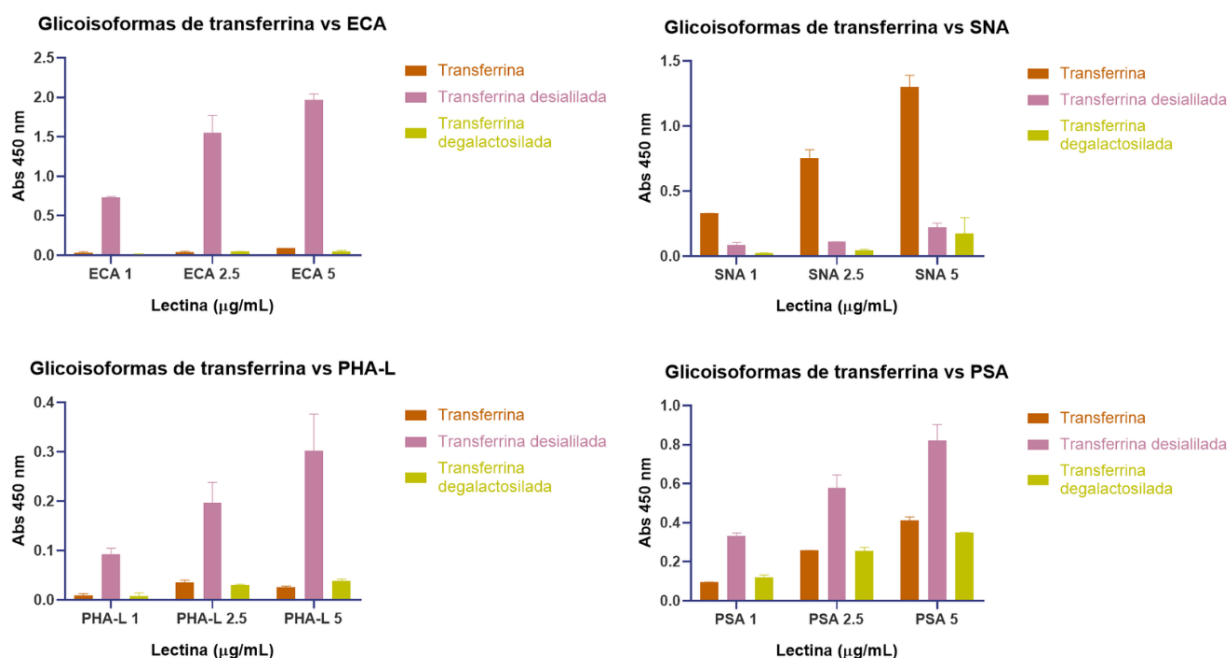


Figura 22. Evaluación del reconocimiento diferencial de diversas lectinas frente a tres glicoisofomas de transferrina humana recombinante. Transferrina nativa, transferrina desialilada y transferrina degalactosilada en concentración 10 µg/mL.

Se observa un reconocimiento diferencial de las glicoisofomas de hTrf por parte de las lectinas, en función de sus especificidades. En este caso, ECA muestra una mayor interacción con la hTrf desialilada, mientras que SNA presenta una interacción más fuerte con la hTrf nativa. Por su parte, PHA-L, que también reconoce estructuras con galactosa,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

exhibe mayor afinidad hacia la hTrf nativa. Finalmente, PSA reconoce residuos de manosa (y fucosa), y su interacción se ve inhibida en presencia de glicanos biantenarios con GlcNAc, lo cual explicaría la disminución en la intensidad de la señal frente a la hTrf degalactosilada, en la cual quedan expuestos los residuos de GlcNAc.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se logró la producción de una lectina a partir de semillas de *Erythrina crista-galli* (ceibo rojo), con un grado de pureza adecuada que mostró capacidad de interacción diferencial con transferrina humana recombinante en condiciones experimentales controladas, evidenciando su potencial como herramienta de reconocimiento de isoformas de esta glicoproteína.

Se realizó la biotinilación de 6 lectinas vegetales comerciales: SNA, SBA, PSA, WGA PHA-L y ConA y de la ECA obtenida en el laboratorio; se cuantificó el grado de biotinilación alcanzado en cada caso, y se las usó exitosamente en ensayos de tipo ELLA frente a glicoproteínas modelo.

Se generaron glicoisoformas de transferrina humana recombinante mediante estrategia quimio-enzimática que incluyó desialilación química y posterior tratamiento con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, obteniéndose patrones de glicosilación diferenciales que sirvieron como modelos para evaluar la especificidad de las lectinas utilizadas.

Se diseñó y optimizó un ensayo ELLA con lectinas, que permitió detectar diferencias en la interacción de distintas lectinas (ECA, SNA, SBA, PSA, WGA PHA-L y ConA) con transferrina humana recombinante y sus variantes con perfiles de glicosilación modificados, validando la sensibilidad del sistema para detectar alteraciones en la glicosilación.

Los resultados obtenidos respaldan el potencial de las lectinas como herramientas bioquímicas complementarias en el estudio de defectos congénitos de glicosilación (CDG), especialmente para la caracterización de patrones alterados en muestras de glicoproteínas plasmáticas, en particular la transferrina humana usada como biomarcador.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Como perspectivas de este trabajo, entendemos que sería relevante validar este sistema con muestras clínicas reales de pacientes con diagnóstico confirmado o sospecha de CDG, a fin de evaluar su aplicabilidad diagnóstica directa y su capacidad para diferenciar entre tipos específicos de CDG. Incluso se podría evaluar si dichas alteraciones se deben a modificaciones en glicosilación de transferrina, aportando al diagnóstico del tipo de CDG.

Además, podría ampliarse el panel de lectinas a usar en el estudio, incluyendo otras con especificidades distintas, para obtener un perfil más completo de reconocimiento de la glicosilación y eventualmente aumentar la sensibilidad del método frente a diferentes subtipos de CDG. Para esto se propone la purificación y caracterización de lectinas obtenidas de otras variedades de plantas autóctonas, como por ejemplo el ceibo blanco (*Erythrina crista-galli* var. *Leucochlora Lombardo*), con el fin de ampliar el repertorio de herramientas lectínicas y evaluar posibles diferencias en especificidad entre especies o variantes vegetales locales. En ese contexto, nuestro grupo de investigación, ya ha realizado estudios preliminares a partir de extractos realizados a partir de semillas de este tipo de ceibo y fracciones parcialmente purificadas, observando presencia de actividad lectina (Bautista, 2013).

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abu Bakar, N., Lefeber, D. J., & van Scherpenzeel, M. (2018). Clinical glycomics for the diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(3), 499–513. <https://doi.org/10.1007/s10545-018-0144-9>
- Audicio, P., Méndez, M. S., Queijo, C., & Lemes, A. (2021). Caracterización bioquímica y genética de pacientes con defectos congénitos de la glicosilación: Experiencia en Uruguay. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 55(3), 283–288.
- Bautista, W. (2013). *Producción y aplicaciones de la lectina de ceibo (Erythrina cristagalli)*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/1515>
- Blăniță, D., Boiciuc, C., Morava, E., & Ușurelu, N. (2021). *Congenital disorders of glycosylation: A booming chapter in pediatric genetics*. 41. <https://doi.org/10.53040/cga11.2021.023>
- Bojar, D., Meche, L., Meng, G., Eng, W., Smith, D. F., Cummings, R. D., & Mahal, L. K. (2022). A Useful Guide to Lectin Binding: Machine-Learning Directed Annotation of 57 Unique Lectin Specificities. *ACS Chemical Biology*, 17(11), 2993–3012. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00689>
- Bruneel, A., Cholet, S., Tran, N. T., Mai, T. D., & Fenaille, F. (2020). CDG biochemical screening: Where do we stand? *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, 1864(10), 129652. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129652>
- Chandra, N. R., Prabu, M. M., Suguna, K., & Vijayan, M. (2001). Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. *Protein Engineering*, 14(11), 857–866. <https://doi.org/10.1093/protein/14.11.857>
- Franco Fraguas, L., Carlsson, J., & Lönnberg, M. (2008). Lectin affinity chromatography as a tool to differentiate endogenous and recombinant erythropoietins. *Journal of Chromatography. A*, 1212(1–2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.036>
- Franco-Fraguas, L., Plá, A., Ferreira, F., Massaldi, H., Suárez, N., & Batista-Viera, F. (2003). Preparative purification of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 790(1–2), 365–372. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00086-2](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00086-2)
- Freeze, H. H., & Schachter, H. (2009). Genetic Disorders of Glycosylation. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, & M. E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1939/>

- Gomme, P. T., McCann, K. B., & Bertolini, J. (2005). Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*, 10(4), 267–273. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03333-1](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03333-1)
- Gorelik, E., Galili, U., & Raz, A. (2001). On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Reviews*, 20(3–4), 245–277. <https://doi.org/10.1023/a:1015535427597>
- Guillard, M., Wada, Y., Hansikova, H., Yuasa, I., Vesela, K., Ondruskova, N., Kadoya, M., Janssen, A., Van den Heuvel, L. P. W. J., Morava, E., Zeman, J., Wevers, R. A., & Lefeber, D. J. (2011). Transferrin mutations at the glycosylation site complicate diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(4), 901–906. <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9311-y>
- Hall, P. L., Lam, C., Wolfe, L., Edmondson, A., & ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. (2025). Biochemical testing for congenital disorders of glycosylation: A technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 27(4), 101328. <https://doi.org/10.1016/j.gim.2024.101328>
- Hashim, O. H., Jayapalan, J. J., & Lee, C.-S. (2017). Lectins: An effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, 5, e3784. <https://doi.org/10.7717/peerj.3784>
- Hernandez Cruz, P., Pérez Campos, E., Martínez Martínez, L., Ortiz, B., & Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(1), 21–27.
- Jaeken, J. (2013). Congenital disorders of glycosylation. *Handbook of Clinical Neurology*, 113, 1737–1743. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00044-7>
- Jaeken, J., Hennet, T., Matthijs, G., & Freeze, H. H. (2009). CDG nomenclature: Time for a change! *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1792(9), 825–826. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.08.005>
- Jaeken, J., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Casaer, P., Snoeck, L., Corbeel, L., Eggermont, E., & Eeckels, R. (1980). Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: A new syndrome?: 90. *Pediatric Research*, 14(2), 179–179. <https://doi.org/10.1203/00006450-198002000-00117>
- Katrlík, J., Svitel, J., Gemeiner, P., Kozár, T., & Tkac, J. (2010). Glycan and lectin microarrays for glycomics and medicinal applications. *Medicinal Research Reviews*, 30(2), 394–418. <https://doi.org/10.1002/med.20195>
- Lacey, J. M., Bergen, H. R., Magera, M. J., Naylor, S., & O'Brien, J. F. (2001). Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 47(3), 513–518.
- Lis, H., & Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chemical Reviews*, 98(2), 637–674. <https://doi.org/10.1021/cr940413g>
- Manoj, N., & Suguna, K. (2001). Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. *Protein Engineering*, 14(10), 735–745. <https://doi.org/10.1093/protein/14.10.735>

- Mathews, C. K., Ahern, K. G., & Van Holde, K. E. (2002). *Bioquímica*.
- Mishra, A., Behura, A., Mawatwal, S., Kumar, A., Naik, L., Mohanty, S. S., Manna, D., Dokania, P., Mishra, A., Patra, S. K., & Dhiman, R. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 134, 110827. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>
- Morelle, W., & Michalski, J.-C. (2007). Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. *Nature Protocols*, 2(7), 1585–1602. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.227>
- Penezić, A., Križakova, M., Miljuš, G., Katrlík, J., & Nedić, O. (2019). Diagnostic Potential of Transferrin Glycoforms-A Lectin-Based Protein Microarray Approach. *Proteomics. Clinical Applications*, 13(5), e1800185. <https://doi.org/10.1002/prca.201800185>
- Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2), 347–352. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
- Porciúncula González, D. C. (2019). *Diseño racional y síntesis enzimática de galactósidos con potencial actividad como inhibidores de galectinas*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/32156>
- Rapoport, E. M., Pochechueva, T. V., Kurmyshkina, O. V., Pazynina, G. V., Severov, V. V., Gordeeva, E. A., Belyanchikov, I. M., André, S., Gabius, H.-J., & Bovin, N. V. (2010). Solid-phase assays for study of carbohydrate specificity of galectins. *Biochemistry. Biokhimiia*, 75(3), 310–319. <https://doi.org/10.1134/s0006297910030077>
- Raynor, A., Haouari, W., Lebredonchel, E., Foulquier, F., Fenaille, F., & Bruneel, A. (2024). Biochemical diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Advances in Clinical Chemistry*, 120, 1–43. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2024.03.001>
- Rodríguez, E., Francia, K., Brossard, N., García Vallejo, J. J., Kalay, H., van Kooyk, Y., Freire, T., & Giacomini, C. (2018). Immobilization of β -galactosidase and α -mannosidase onto magnetic nanoparticles: A strategy for increasing the potentiality of valuable glycomic tools for glycosylation analysis and biological role determination of glycoconjugates. *Enzyme and Microbial Technology*, 117, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.05.012>
- Rüdiger, H. (2002). Structure and Function of Plant Lectins. In H. Gabius & S. Gabius (Eds.), *Glycosciences* (1st ed., pp. 415–438). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527614738.ch23>
- Rüdiger, H., & Gabius, H. J. (2001). Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18(8), 589–613. <https://doi.org/10.1023/a:1020687518999>
- Scherpenzeel, M. van, Willems, E., & Lefeber, D. J. (2016). Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation. 358. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9639-x>
- Sharon, N., & Lis, H. (1989). Lectins as cell recognition molecules. *Science (New York, N.Y.)*, 246(4927), 227–234. <https://doi.org/10.1126/science.2552581>
- Sosicka, P., Ng, B. G., & Freeze, H. H. (2022). Chemical Therapies for Congenital Disorders of Glycosylation. *ACS Chemical Biology*, 17(11), 2962–2971. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.1c00601>

- Spiro, R. G. (2002). Protein glycosylation: Nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, 12(4), 43R-56R.
<https://doi.org/10.1093/glycob/12.4.43r>
- Van Damme, E. J. M. V., Peumans, W. J., Pustai, A., & Bardocz, S. (1998). *Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications*. John Wiley & Sons.
- Varki, A., & Kornfeld, S. (2022). Historical Background and Overview. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, P. Stanley, G. W. Hart, M. Aebi, D. Mohnen, T. Kinoshita, N. H. Packer, J. H. Prestegard, R. L. Schnaar, & P. H. Seeberger (Eds.), *Essentials of Glycobiology* (4th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK579927/>
- Verheijen, J., Tahata, S., Kozicz, T., Witters, P., & Morava, E. (2020). Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: An update. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 22(2), 268–279. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0647-2>
- Wada, Y. (2016). Mass spectrometry of transferrin glycoforms to detect congenital disorders of glycosylation: Site-specific profiles and pitfalls. *Proteomics*, 16(24), 3105–3110.
<https://doi.org/10.1002/pmic.201500551>
- Wada, Y., Nishikawa, A., Okamoto, N., Inui, K., Tsukamoto, H., Okada, S., & Taniguchi, N. (1992). Structure of serum transferrin in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189(2), 832–836.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)92278-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)92278-6)
- Wolfe, L. A., & Krasnewich, D. (2013). Congenital disorders of glycosylation and intellectual disability. *Developmental Disabilities Research Reviews*, 17(3), 211–225.
<https://doi.org/10.1002/ddrr.1115>
- Xia, B., Zhang, W., Li, X., Jiang, R., Harper, T., Liu, R., Cummings, R. D., & He, M. (2013). Serum N-glycan and O-glycan analysis by mass spectrometry for diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Analytical Biochemistry*, 442(2), 178–185.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.037>