



Inmovilización de β -galactosidasa y α -manosidasa: aplicación al estudio del potencial inmunomodulador de residuos glicosídicos presentes en *Fasciola hepatica*.

Tesina de grado correspondiente a la Licenciatura

en Bioquímica

Facultad de Ciencias

KAREN FRANCIA

Orientadora:

Dra. Cecilia Giacomini, Cátedra de Bioquímica, DepBio, Facultad de Química.

Co-orientadora:

Dra. Teresa Freire, Departamento de Inmunobiología, Facultad de Medicina.

Noviembre de 2015

INDICE

Resumen	5
1. Introducción	7
1.1. Función de las glicosidasas en la elucidación de la composición glucídica de las glicoproteínas	8
1.2. Función de las lectinas en la elucidación de la composición glucídica de las glicoproteínas	10
1.3. Estrategias de inmovilización	11
1.4. Inmovilización covalente utilizando el método del CDAP	14
1.5. Glicosidasas de interés glicobiológico	14
1.5.1 β -galactosidasa	15
1.5.2 α -manosidasa	15
1.6. Glicoproteínas modelo	16
1.6.1 Asialofetuina como sustrato de la β -Gal	16
1.6.2 Lactoferrina como sustrato de la α -Man	16
1.7. Importancia del análisis de carbohidratos en <i>Fasciola hepatica</i>	18
Objetivos	19
2. Materiales y Métodos	20
2.1. Enzimas y reactivos	20
2.2. Preparación del extracto enzimático de β -Gal	20
2.3. Ensayo de actividad enzimática para la β -Gal	20
2.4. Ensayo de actividad enzimática para la α -Man	21
2.5. Cuantificación de proteínas	22
2.6. Inmovilización de enzimas	22
2.6.1. Activación de lechos de agarosa (CDAP-agarosa)	22
2.6.2. Inmovilización de la β -Gal	23
2.6.3. Inmovilización de la α -Man	23
2.7. Determinación del pH óptimo para la β -Gal	23

2.8. Determinación de la estabilidad con el pH para la β -Gal inmovilizada	23
2.9. Deglicosilación de proteínas modelo	23
2.9.1. Obtención de asialofetuina	23
2.9.2. Degalactosilación de la asialofetuina	24
2.9.3. Demanosidación de la lactoferrina	24
2.10. Demanosidación de lisado de <i>F. hepatica</i>	25
2.10.1 Preparación de lisado total de <i>F. hepatica</i>	25
2.10.2. Demanosidación del lisado	25
2.11. Análisis por TLC	25
2.12. Análisis por HPLC	25
2.13. Ensayo de reactividad con lectinas	26
3. Resultados y discusión	27
3.1. Inmovilización de β -Gal y α -Man	27
3.2. Estudio de las propiedades de las enzimas inmovilizadas	28
3.2.1. pH óptimo de la β -Gal	28
3.2.2- Estabilidad con el pH de la β -Gal inmovilizada	29
3.2.3. Estudios de estabilidad con α -Man	30
3.3. Deglicosilación de glicoproteínas modelo	30
3.3.1. Degalactosilación de asialofetuina	30
3.3.2. Demanosidación de lactoferrina	32
3.4. Demanosidación de un extracto de <i>F. hepatica</i>	37
4. Conclusiones	39
5. Perspectivas	40
6. Bibliografía	41

Agradecimientos

A mis padres y mi hermana por ser una parte fundamental de este camino, siendo incondicionales y apoyándome en todos los momentos desde el inicio de la carrera.

A Cecilia por ser tan responsable, estar siempre pendiente en todos los detalles, ayudarme y principalmente enseñarme a trabajar desde el principio, mejorándome como estudiante y persona.

A la Cátedra de Bioquímica por abrirme sus puertas y a todos los compañeros por ayudarme cuando lo necesité.

A Teresa por su gran ayuda en este trabajo y su dedicación. A los integrantes del Departamento de Inmunobiología por ayudarme en los ensayos e integrarme en ese equipo de trabajo.

A mi familia por su compañía y aliento.

A mis amigos por acompañarme en los mejores momentos y ayudarme a sobrepasar los días más difíciles.

A Nati S. y Nati D, grandes amigas que formaron parte de éste camino haciendo las horas de estudio más divertidas.

A todos los que de alguna forma me acompañaron a lo largo de estos años en facultad, como fuera de ella.

Resumen

Los glicanos presentes en glicoproteínas y glicolípidos de los organismos vivos, participan en procesos de reconocimiento biológico. Por lo cual, cambios en los perfiles de los glicanos se correlacionan con ciertos estados patológicos. A su vez, la interacción huésped-patógeno (virus, bacterias, parásitos u hongos), involucra la participación de los glicanos, siendo esenciales durante el transcurso de la infección así como en estrategias de evasión inmunológica. En particular para los parásitos helmintos, se ha reportado que algunos motivos glucídicos presentes en sus glicoproteínas serían los responsables de la modulación de la respuesta inmune del hospedero. Para el caso de *Fasciola hepatica*, existen evidencias que señalan que los motivos glucídicos conteniendo manosa estarían involucrados en la regulación de la maduración de células dendríticas y en la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 con un alto componente regulador.

Por lo cual, la elucidación de la composición glucídica de muestras clínicas, organismos patógenos, glicoproteínas y glicolípidos, al igual que su función a nivel biológico, puede contribuir a un mayor entendimiento de las enfermedades vinculadas a procesos biológicos mediados por glicanos. Esto es fundamental para el desarrollo de métodos de diagnóstico, profilácticos o posibles tratamientos terapéuticos. El uso de glicosidasas inmovilizadas puede ser una herramienta útil para alcanzar este objetivo.

En este trabajo optimizó la inmovilización de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* y α -manosidasa de *Canavalia ensiformis* sobre agarosa activada con estructura cianato éster. Se obtuvieron rendimientos de inmovilización superiores al 70% generándose derivados con buena actividad (251 UE/g y 55 UE/g para la β -galactosidasa y α -manosidasa respectivamente). Se confirmó la capacidad de la β -galactosidasa y α -manosidasa de catalizar procesos de deglicosilación utilizando asialofetaina y lactoferrina como glicoproteínas modelo respectivamente. La liberación de galactosa y manosa fue confirmada por TLC y HPLC. A su vez se comprobó la factibilidad de reutilizar las glicosidasas inmovilizadas sin pérdida de su actividad. En el caso de la α -manosidasa el proceso de demanosidación también se evaluó estudiando la pérdida de reconocimiento de la lactoferrina demanosidada por la lectina ConA, específica para manosa. Se observaron porcentajes de demanosidación de 80 % y un 43 % a pH 4,5 y 6,5, respectivamente. Finalmente, se demostró que la α -manosidasa inmovilizada, fue capaz de demanosidar un extracto total de *Fasciola hepatica* a pH 6,5, obteniéndose porcentajes de demanosidación de 49 % y 57 % a 7,5 hs. y 24 hs. respectivamente.

Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de las glicosidasas inmovilizadas como herramienta biotecnológica en procesos de deglicosilación específica de glicoproteínas y modelos biológicos. El uso de esta herramienta permite confirmar la presencia de un determinado monosacárido en la estructura oligosacáridica de una glicoproteína o glicolípido. Por otro lado permite remover dicho monosacárido de la muestra en

cuestión de forma de poder evaluar la importancia del mismo en procesos biológicos mediados por glicanos.

1. Introducción

Una gran cantidad de las proteínas de los organismos vivos se encuentran glicosiladas. El proceso de glicosilación tiene lugar a nivel co-traducciona (N-glicosilación) y post-traducciona (O-glicosilación), y se realiza mediante la acción conjunta de una gran variedad de glicosiltransferasas y glicosidasas. La glicosilación puede implicar la adición de unos pocos residuos monosacáridos, o la formación de grandes cadenas de oligosacáridos ramificados [1].

Los glicanos que forman parte de las glicoproteínas y los glicolípidos participan en importantes procesos biológicos tanto a nivel estructural como funcional [2-4]. A nivel estructural cumplen un papel fundamental en la composición de la matriz extracelular y tienen la capacidad de conferir estabilidad, resistencia proteolítica y solubilidad a diversas proteínas secretadas. Por otro lado, a nivel funcional, estos glicocojugados participan en procesos enzimáticos o de reconocimiento biológico como la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular, fundamentales en la modulación de la respuesta inmune, desarrollo embrionario, diferenciación, cáncer e interacción huésped-patógeno [5-7]. Las moléculas glicosiladas también están involucradas en numerosos procesos patológicos. De hecho, determinados cambios en los perfiles de glicosilación se correlacionan con diversas patologías [4]. Por ejemplo, en las células cancerosas una de las principales modificaciones moleculares es la expresión de antígenos producidos por O-glicosilación incompleta, la cual ha servido como base para el diagnóstico oncológico [8,9]. Por otra parte, se han descrito que defectos en genes que codifican proteínas involucradas en las vías de glicosilación, conducen a trastornos congénitos con serias consecuencias médicas [4].

La interacción huésped-patógeno (virus, bacterias, parásitos u hongos), involucra la participación de los glicanos en el proceso de reconocimiento de receptores de las células blanco, al igual que en el desarrollo de estrategias de evasión inmunológicas. Algunos virus, son capaces de utilizar la vía de glicosilación de la célula huésped para modificar sus propias proteínas. Esto influye en el rol que cumplen las mismas en relación a su plegamiento, virulencia e invasión de la célula huésped. Por otra parte, se ha visto que el virus del HIV, así como el de la Influenza, utiliza oligosacáridos específicos para evadir el sistema Inmunológico de su hospedero [10,11].

En relación a los parásitos, existe amplia evidencia que demuestra que sus motivos glucídicos participan en la modulación del sistema inmune. De hecho, glicanos presentes en helmintos y extractos de los nemátodos, han sido asociados a la inducción de respuestas Th2 [12-16]. Estudios recientes de nuestro grupo de investigación, han revelado la importancia de glicanos ricos en manosa producidos por el helminto *Fasciola hepatica*, en la inhibición de la maduración de células dendríticas y

en la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th2 con un alto componente regulador [17,18].

En base a lo expresado anteriormente, la elucidación de la composición glucídica de muestras clínicas, organismos patógenos, glicoproteínas y glicolípidos, al igual que su función a nivel biológico, puede contribuir a un mayor entendimiento de los procesos biológicos, tanto normales como patológicos, mediados por glicanos. Esto es fundamental para el desarrollo de métodos de diagnóstico, profilácticos o posibles tratamientos terapéuticos [19].

A diferencia de los oligonucleótidos y proteínas que son polímeros lineales, las cadenas de glicanos presentan ramificaciones y diferentes tipos de uniones. Por lo cual, para elucidar la estructura de un oligosacárido se requiere de una combinación de métodos físicos y químicos. Dentro de estas estrategias se encuentran el uso de enzimas (endo y exoglicosidasas) y las lectinas (proteínas que unen carbohidratos) [20,21].

1.1. Función de las glicosidasas en la elucidación de la composición glucídica de las glicoproteínas

Las glicoproteínas pueden encontrarse N-glicosiladas u O-glicosiladas dependiendo del tipo de unión entre los glicanos y la estructura proteica. En la N-glicosilación, el glicano se encuentra unido a un residuo de asparagina presente en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Figura 1A). Los N-glicanos comparten una región central o core pentasacáridica conservada, compuesta por dos residuos de N-acetilglucosamina, unidos por enlace $\beta(1\rightarrow4)$ y tres residuos de manosa, donde una de las manosas terminales se encuentra unida por enlace $\alpha(1\rightarrow3)$ y la otra por enlace $\alpha(1\rightarrow6)$. Los mismos se dividen en tres clases: i) Los de alto contenido de manosa, compuestos por polímeros de manosa unidos al core pentasacáridico; ii) Los de tipo complejo, donde las dos manosas del core ($\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$) están sustituidas por unidades de N-acetilglucosamina y luego por otros azúcares que pueden incluir ácido siálico y fucosa; iii) Los híbridos, donde la rama correspondiente a la manosa $\alpha(1\rightarrow6)$ del core se encuentra sustituida exclusivamente por residuos de manosa, y a la manosa $\alpha(1\rightarrow3)$ se une una unidad de N-acetilglucosamina y forma una antena similar a la de los glicanos de tipo complejo (Figura 1B) [4,21].

Por otro lado, en la O-glicosilación el glicano se encuentra unido a un residuo de serina, treonina o hidroxiprolina a través de un residuo de N-acetilgalactosamina (Figura 1A). Existen otros tipos de O-glicosilación como los glicanos unidos por O-manosa producidos por hongos o plantas y la O-glicosilación de proteínas intracelulares mediada por enlaces O- α -N-Acetilglucosamina en células de mamífero que tiene la particularidad de no ser elongada [4]. Sin embargo, en mamíferos la O-glicosilación más abundante está constituida por cadenas carbohidratos unidas por un enlace O- α -

N-Acetilgalactosamina en proteínas de tipo mucina, las cuales se encuentran altamente O-glicosiladas [4,5].

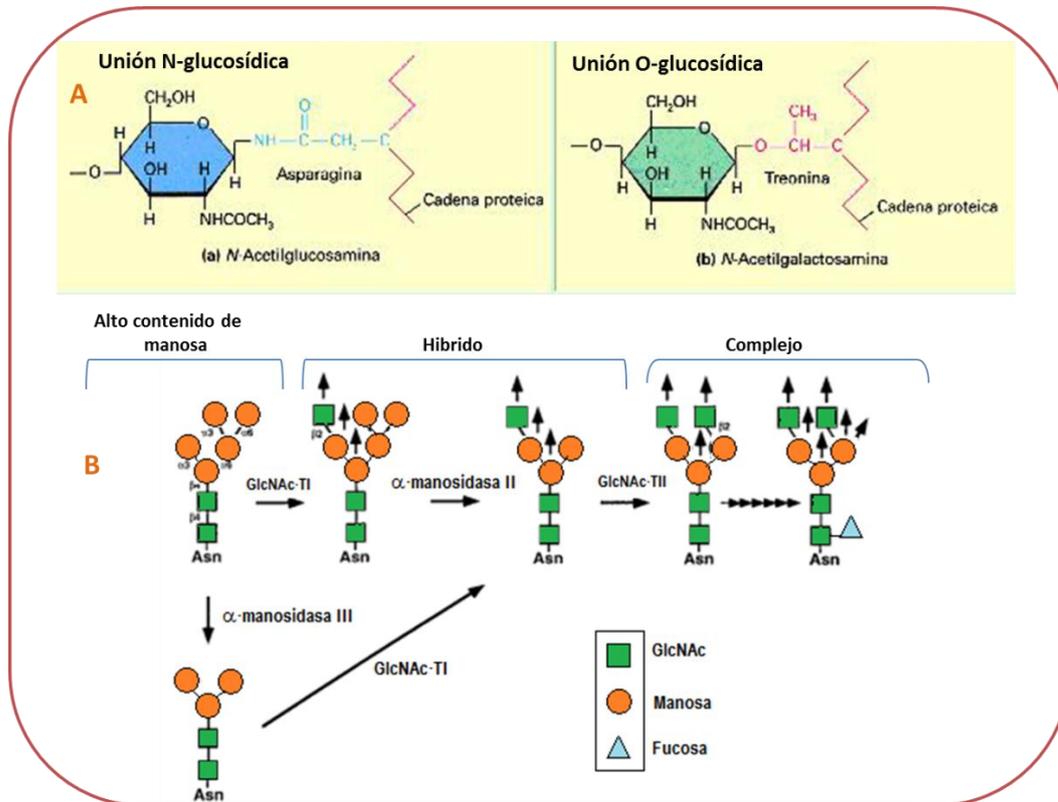


Figura 1. A-Clasificación de glicoproteínas según el tipo de enlace entre el esqueleto peptídico y los glicanos, en dos familias: N-glicoproteínas y O-glicoproteínas, modificada de Mathews et al [22]. **B- Clasificación de N-glicanos en:** alto contenido de manosas, híbridos y complejos. Modificado de Varki et al [23].

El uso de glicosidasas como estrategia para el estudio de la composición glucídica de las glicoproteínas, consiste en la liberación total o parcial de los glicanos, que posteriormente podrán ser analizados por técnicas analíticas de TLC, HPLC o espectrometría de masa. Para ello se utilizan una serie de endoglicosidasas, péptido-N-glicosidasa (PNGasa-F y PNGasa-A) o endo- β -N-acetil-glucosaminidasas (Endo-D y Endo-H), combinadas con exoglicosidasas (Figura 2). Las PNGasas catalizan la hidrólisis de los enlaces amida entre la asparagina y el residuo de N-acetil-glucosamina más interno de los N-glicanos, mientras que la β -N-acetilglucosaminidasa cataliza la hidrólisis entre las dos subunidades de N-acetilglucosaminas unidas al residuo de asparagina. Las exoglicosidasas catalizan la hidrólisis de unidades monosacarídicas desde el extremo no reductor dependiendo de la especificidad de cada una de ellas [24-30].

Una desventaja de la deglicosilación enzimática es el costo de obtención de las glicosidasas puras, ya sea mediante su purificación a partir de extractos celulares o mediante estrategias recombinantes. Por otra parte, éstas deben ser separadas del medio de reacción luego del proceso de deglicosilación de forma que no interfieran en

los estudios posteriores a ser realizados con la proteína o muestra biológica deglicosilada. Ambos problemas pueden resolverse con el uso de las enzimas inmovilizadas a un soporte sólido [30].

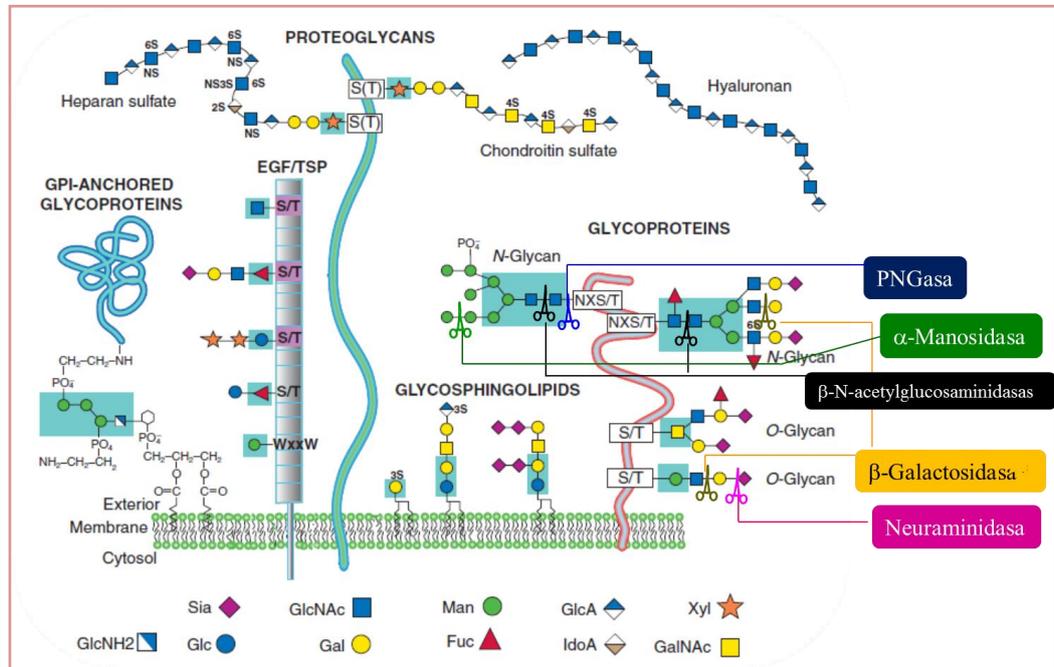


Figura 2. Representación de la membrana celular lipídica con los glicanos más importantes y las respectivas glicosidasas que catalizan su hidrólisis.

1.2. Función de las lectinas en la elucidación de la composición glucídica de las glicoproteínas

Otra estrategia para la elucidación de los carbohidratos que componen las glicoproteínas son las lectinas, herramienta que en el transcurso del tiempo se utiliza cada vez más. Son proteínas que poseen al menos un dominio con sitio de unión específico y reversible para carbohidratos que pueden formar parte de moléculas glicosiladas [31,32]. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y cumplen un papel importante en múltiples procesos biológicos, ya que son las responsables de descifrar los códigos relativos de los carbohidratos presentes en diferentes compuestos. Asimismo, debido a su alta especificidad, se han utilizado como una herramienta para estudios biotecnológicos tanto en las ciencias biológicas, como en las ciencias médicas ampliando el campo de conocimientos y permitiendo el desarrollo de nuevas investigaciones [31-33]. Las lectinas de distintos orígenes presentan afinidad por diferentes arreglos oligosacáridicos (Tabla I). Por lo cual pueden utilizarse para identificar y/o purificar glicoproteínas en forma específica. En este trabajo se utilizó la Conavalina de *Canavalia ensiformis* (ConA) por su especificidad por manosa.

Tabla I.- Algunas de las lectinas de mayor uso con su correspondiente especificidad. [33]

Especificidad a carbohidratos		
Especie	Monosacáridos	Glicanos
<i>Canavalia ensiformis</i>	Man/Glc	GlcNAc β 2Man α 6(GlcNAc β 2Man α 3)-Man β 4GlcNAc
<i>Ricinus communis</i> (Euphorbiaceae)	Gal	Gal β GlcNAc β 2Man α 6(Gal β 4-GlcNAc β 2Man α 3)Man β 4GlcNAc
<i>Arachis hypogaea</i>	Gal	Gal β 3GalNAc
<i>Sophora japónica</i>	GalNAc	GalNAc β 6Gal
<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc	Fuc α 6GlcNAc
<i>Caragana arborescens</i>	GalNAc	GalNAc α 3Gal α 4Gal β 4Glc

1.3. Estrategias de inmovilización

Se dice que una enzima se encuentra inmovilizada cuando ésta se encuentra recluida en una región definida del espacio, conservando su actividad catalítica. Dentro de las ventajas del uso de las enzimas inmovilizadas se encuentra la posibilidad de reutilizarlas disminuyendo los costos de purificación. Otra de las ventajas es la posibilidad de separarla del medio de reacción mediante un simple proceso de filtración deteniendo la reacción enzimática sin necesidad de utilizar condiciones drásticas que afecten la integridad de los componentes de la mezcla de reacción y obteniendo un producto libre de enzima [34-40].

Por otro lado, la inmovilización de una enzima restringe su movilidad y modifica el microambiente evitando el desplegamiento de su estructura tridimensional generado por efecto de factores físicos extremos, como aumento de temperatura o por agentes químicos, lo cual puede contribuir a un aumento de su estabilidad [39].

Sin embargo, la inmovilización enzimática, sobre todo cuando se utilizan métodos covalentes, puede generar cambios en su estructura que conlleven a una inactivación parcial de la misma disminuyendo su actividad específica. A su vez, se puede distorsionar el sitio activo disminuyendo la afinidad por el sustrato y como consecuencia un aumento en su constante de Michaelis-Menten (K_M). En algunos casos la inmovilización se puede dar de forma tal que el acceso al sitio activo se vea

restringido generando problemas difusionales fundamentalmente en el caso de sustratos macromoleculares. Por lo cual, las propiedades de la enzima inmovilizada (pH, temperatura óptima, parámetros cinéticos y estabilidad) pueden verse modificados en relación a la enzima soluble [39,40]. Esto hace que sea fundamental la adecuada selección de la estrategia de inmovilización y soporte a utilizar, teniendo en cuenta las propiedades de la enzima a inmovilizar. Es fundamental obtener un derivado enzimático con buenas propiedades de forma que la misma pueda ser utilizada a nivel biotecnológico. Se debe verificar que la enzima inmovilizada presenta alta actividad específica y condiciones óptimas de estabilidad, compatibles con el proceso que se va a catalizar [35-40].

Los métodos de inmovilización pueden clasificarse en dos grandes grupos: reversibles e irreversibles (Figura 3). Los métodos reversibles corren con la ventaja de que permiten la elución de la enzima una vez que la actividad decae por lo que el soporte puede reutilizarse, bajando los costos. Por el contrario, la inmovilización irreversible significa que luego de que se pierda la actividad enzimática, no es posible la elución de la proteína, por lo que el soporte no estará disponible para reutilizarlo [39].

La inmovilización reversible se da generalmente bajo condiciones suaves. El método más sencillo es la adsorción (interacción no covalente), que se basa en interacciones superficiales reversibles entre la enzima y el soporte. Si bien estas fuerzas de enlace se consideran débiles, cuando tienen lugar un alto número de interacciones no covalentes es posible una unión efectiva. En la adsorción física la unión se da a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o interacciones hidrofóbicas. Por otro lado en la adsorción iónica, las enzimas se unen a través de interacciones electroestáticas. El procedimiento de adsorción es simple, sin embargo es difícil encontrar condiciones bajo las cuales la enzima permanezca fuertemente unida y a la vez activa [39].

Otro de los métodos de inmovilización reversible es a través de los puentes disulfuro. Aunque se forma un enlace covalente entre la enzima y el soporte, este puede ser escindido por un agente reductor como el ditioneitol (DTT) bajo condiciones suaves. [39].

Por otra parte, los métodos de inmovilización irreversibles generalmente se dan por enlaces covalentes con el soporte, por entrecruzamiento y por entrapamiento o inclusión [39].

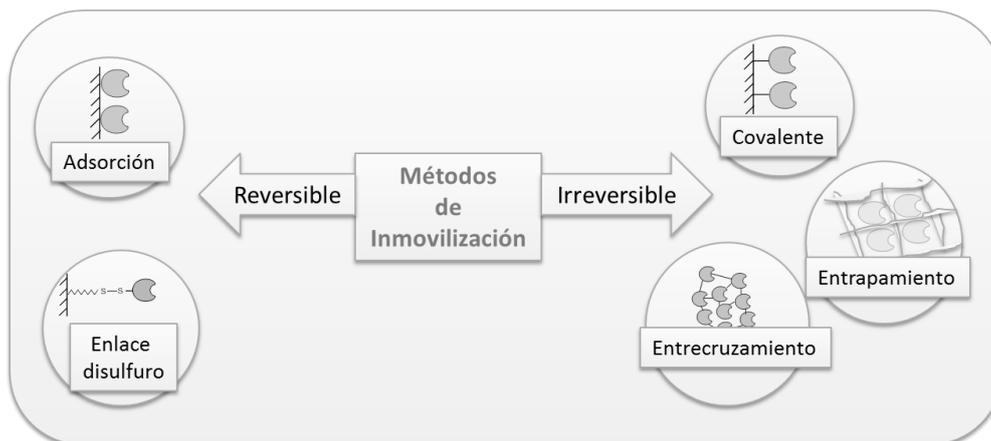


Figura 3. Clasificación de métodos de inmovilización enzimática en reversibles e irreversibles.

La inmovilización por unión covalente al soporte es la que se utiliza mayormente y su principal ventaja es que no tiene lugar la liberación de enzima al medio de reacción (leakage). El enlace covalente se forma entre los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y residuos aminoácidos expuestos en la superficie de la proteína. Los residuos aminoácidos de las proteínas que participan en la formación del enlace covalente son: grupos aminos, grupos carboxilos, grupos tiol, y grupos hidroxilos. Es importante que los grupos involucrados en la unión enzimática no sean fundamentales para la actividad catalítica [39].

Otro de los métodos irreversibles, es la inmovilización por entrecruzamiento. Este método no utiliza soporte y se basa en la formación de enlaces covalentes entre moléculas de enzima, o en el caso del co-entrecruzamiento, con proteínas inertes como gelatina o albumina sérica bovina por medio de un reactivo bifuncional como el glutaraldehído. Por medio de éste método sencillo se forma un agregado con alto peso molecular e insoluble, que puede tener la desventaja de que sea gelatinoso y por ende de difícil uso [41].

El siguiente método también irreversible, es la inmovilización por entrapamiento. Las moléculas de enzimas se encuentran libres pero restringidas por una red polimérica del gel. Se trata de un método no covalente, en el que los poros del gel se encuentran controlados de manera que no haya pérdida enzimática y pueda haber una circulación libre entre sustrato y producto. Este método tiene la ventaja de que las condiciones de entrapamiento son suaves, no afectando la enzima y por lo tanto reduciendo la pérdida de actividad enzimática [39].

Por último, el método de inmovilización por encapsulación es otro de los métodos irreversibles no covalentes. La enzima permanece libre en solución y una vez que se da la reacción es separada del sustrato y producto, a través de una membrana protectora semi-permeable que imposibilita el paso de la misma [42-44].

En este trabajo se utilizó un método de inmovilización covalente utilizando como soporte agarosa activada con estructuras cianato éster.

1.4. Inmovilización covalente utilizando el método de ciano-4-dimetil-amino-piridinio tetrafluoro borato (CDAP)

El método de inmovilización del CDAP consiste en la activación de la matriz o soporte, introduciendo grupos electrofílicos capaces de reaccionar con grupos nucleofílicos expuestos en la superficie de la proteína (enzima, anticuerpos, etc). La activación de la matriz se realiza utilizando el agente cianilante CDAP. Los hidroxilos de la matriz realizan un ataque nucleofílico sobre el CDAP generando grupos cianato éster sobre la agarosa (Figura 4). El CDAP tiene la ventaja de ser más electrofílico y menos tóxico que el bromuro de cianógeno tradicionalmente utilizado para estas activaciones. Es un reactivo seguro, no higroscópico y puede ser almacenado por largos períodos sin pérdida de estabilidad. Una vez activada la matriz con grupos cianato éster, estos reaccionan con los grupos amino expuestos en la superficie de la proteína, formando enlaces covalentes de tipo isourea [44]. En la Figura 4 se observan los pasos de la activación y posterior inmovilización de la proteína.

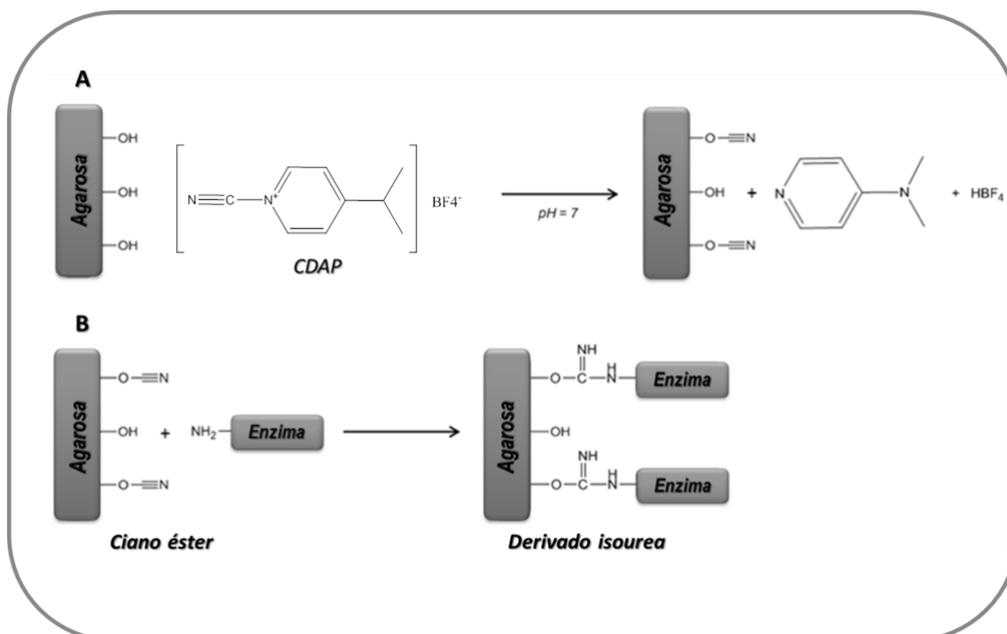


Figura 4. Mecanismo de activación de la agarosa por el método CDAP para inmovilización de proteínas. A) Activación del gel de agarosa a través de la reacción con el reactivo 1-ciano-4-(dimetilamino)-piridinio (CDAP). B) Inmovilización de la proteína de interés sobre soporte CDAP-Agarosa.

1.5. Glicosidasas de interés glicobiológico

Como se mencionó anteriormente, la deglicosilación enzimática de glicoproteínas requiere del uso de endo y exoglicosidasas. Las primeras catalizan la ruptura de enlaces

glicosídicos en el interior de la cadena carbohidrata, separando de raíz la cadena oligosacáridica de la estructura proteica de una glicoproteína. Por otra parte las exoglicosidasas hidrolizan el enlace glicosídico de residuos terminales, permitiendo la liberación secuencial y específica de los distintos residuos que componen la cadena oligosacáridica de una glicoproteína. Teniendo en cuenta la composición de azúcares de las cadenas glicosídicas de la mayoría de las glicoproteínas, las exoglicosidasas más utilizadas son α -manosidasa, α -fucosidasa, β -galactosidasa y sialidasa o neuraminidasa, que liberan residuos de manosa, fucosa, galactosa y ácido siálico, respectivamente [45].

A continuación presentamos las dos glicosidasas utilizadas en este trabajo, β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, y la α -manosidasa de *Canavalia ensiformis*, así como las glicoproteínas modelo utilizadas.

1.5.1. β -galactosidasa

La β -galactosidasa (β -D-galactosidogalactohidrolasa, EC 3.2.1.23) se encuentra en plantas, microorganismos y animales, y es de gran interés para la industria alimenticia. La β -galactosidasa (β -Gal) cataliza la hidrólisis de enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicos, por lo cual podría ser útil para la hidrólisis de residuos terminales de galactosa presentes en N-glicanos híbridos o complejos o en O-glicanos. Su peso molecular aparente es de 105.000 Da. Su pH óptimo se encuentra en el entorno de 4,5 cuando el sustrato es ONPG y 4,8 cuando el sustrato es lactosa; mientras que su temperatura óptima es de 46°C. En relación a la estabilidad de la enzima esta reportado que es estable en el intervalo de pH de 4,0 a 9,0. La actividad de β -Gal es inhibida por varios metales entre ellos cobre y plata [46].

1.5.2. α -manosidasa

La α -manosidasa (α -manosidomanohidrolasa, EC 3.2.1.24) se encuentra en semillas de plantas y tejidos animales. La estructura de la misma está compuesta por un tetrámero que contiene dos subunidades con un peso molecular de 66.000 Da y dos subunidades con peso molecular de 44.000 Da [47]. La α -manosidasa (α -Man) hidroliza unidades de manosa terminales unidas por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$, $\alpha(1\rightarrow3)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$. Su pH óptimo se encuentra entre 4,0 y 4,5. Con respecto a la estabilidad la misma es estable en un rango de pH de 6,0 – 8,5 por al menos 17 horas y mantiene más de un 80% de actividad a pH 6,0 y 4°C por al menos 5 meses [48]. Su K_M es de 2,5 mM para el sustrato p-nitro fenil α -D manopiranosido y es inhibida por los iones Ag^+ y Hg^{++} [48].

1.6. Glicoproteínas modelo

A los efectos de evaluar si la β -Gal y la α -Man inmovilizadas son efectivas para los procesos de deglicosilación selectiva de glicoproteínas es necesario contar con glicoproteínas modelo cuya composición glucídica sea conocida. En este trabajo utilizamos la asialofetulina y la lactoferrina como proteínas modelo de la deglicosilación de la β -Gal y α -Man, respectivamente.

1.6.1. Asialofetulina como sustrato de la β -Gal

La fetulina de origen bovino es una proteína de 48.400 Da, sintetizada en el hígado y secretada al torrente sanguíneo, siendo la glicoproteína de mayor concentración en suero en la etapa fetal. Se ha reportado que esta glicoproteína presenta tres sitios de O-glicosilación y tres sitios de N-glicosilación (Figura 5). Los N-glicanos complejos presentan una composición cuya relación molar es equivalente a: ácido siálico, galactosa, manosa y N-acetilglucosamina (3:3:3:5) cuya estructura se muestra en la Figura 5A [49, 50].

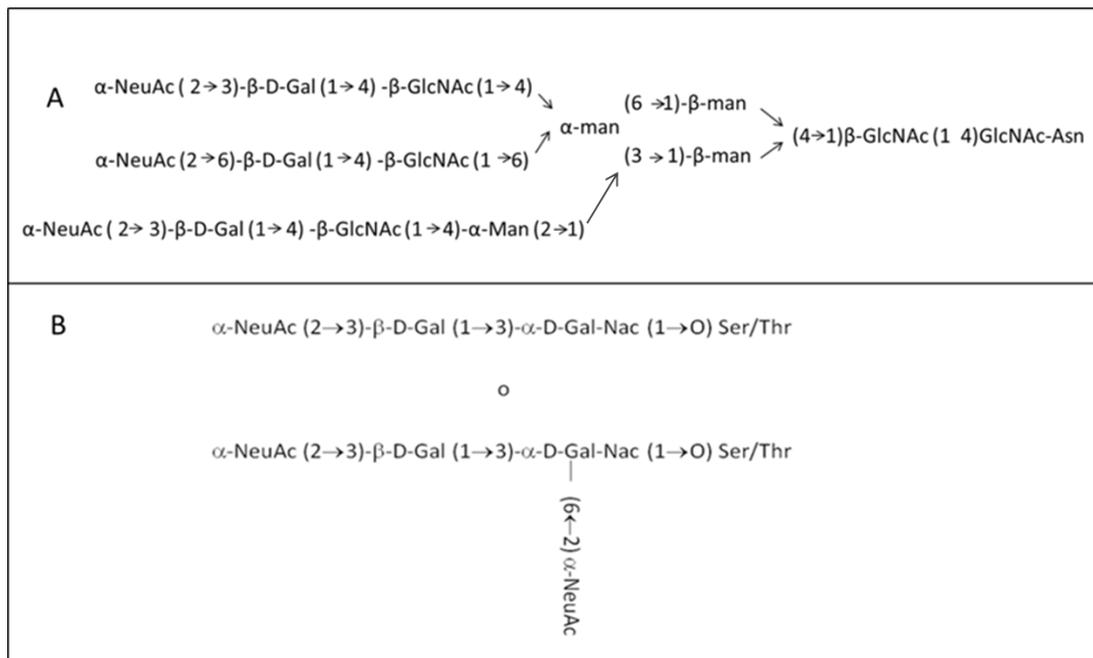


Figura 5. Composición oligosacáridica de la fetulina de suero fetal bovino A) Estructura de los N-glicanos complejos extraída de Baenziger, [49]. B) Estructura de O-glicanos, extraída de Nilsson et al [50].

La fetulina puede ser desialilada utilizando métodos químicos dejando unidades de galactosa terminales unidas por enlaces β (1 \rightarrow 4) [51]. De esta forma la asialofetulina es sustrato de la β -Gal.

1.6.2. Lactoferrina como sustrato de la α -Man

La lactoferrina es una proteína tipo transferrina, formada por una única cadena polipeptídica, con un peso molecular aproximado de 80.000 Da. Su principal función fisiológica es el transporte de hierro en el organismo, y también cumple una importante función inmunológica ya que tiene propiedades bacteriostáticas. Los glúcidos que aparecen con mayor frecuencia unidos covalentemente a la cadena aminoacídica de la lactoferrina son manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico, entre otros. En la literatura está reportado que esta proteína presenta de uno a cinco sitios de glicosilación, dependiendo de la especie. En el caso de la lactoferrina de bovino tiene cinco sitios de glicosilación: Asn233, Asn281, Asn368, Asn476 y Asn545 [52]. Es de conocimiento que la lactoferrina bovina, presenta glicanos complejos y con alto contenido de manosa (Figura 6). Además, estudios recientes con técnicas analíticas avanzadas determinaron estructuras híbridas con una amplia heterogeneidad en la composición de los glicanos [52-55].

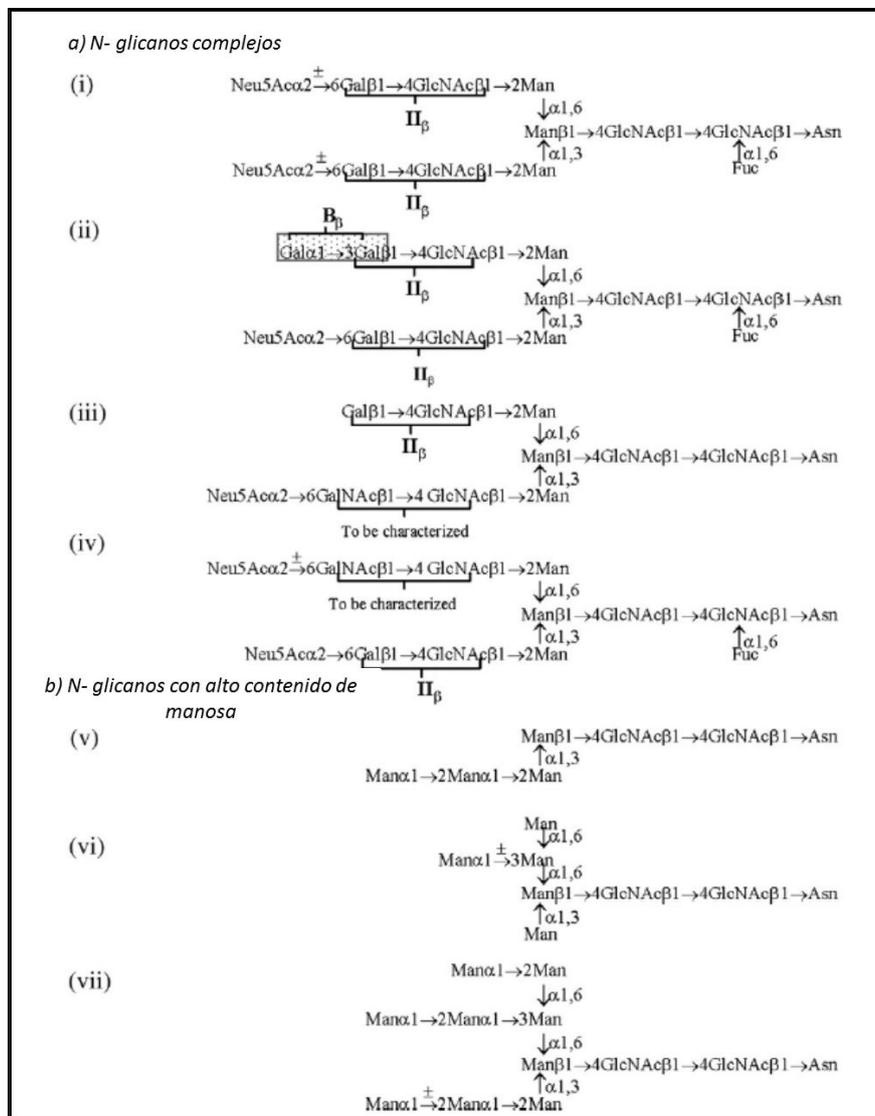


Figura 6. Estructura oligosacáridica de la lactoferrina bovina A) Estructura de los N-glicanos complejos. B) Estructura de N-glicanos con alto contenido de manosa, extraído de Yen et al [55].

Dado que la lactoferrina presenta N-glicanos con alto contenido de manosa, la misma puede ser utilizada como glicoproteína modelo para evaluar la funcionalidad de la α -Man inmovilizada.

1.7. Importancia del análisis de carbohidratos en *Fasciola hepatica*

La fasciolosis es una parasitosis que ataca fundamentalmente al ganado. Actualmente constituye un problema pecuario importante ya que es la responsable de pérdidas millonarias a nivel mundial, causadas por la disminución de producción de leche, carne y lana, el decomiso de hígados y carne y el costo de drogas fasciolisidas. En nuestro país, el responsable principal de esta zoonosis es el parásito *Fasciola hepatica* [56].

Existe amplia evidencia que indica que la mayoría de los helmintos tienen la capacidad de modular la respuesta inmune del hospedero en su beneficio, induciendo una respuesta celular de tipo Th2 modificada, con un alto componente regulador. Por otro lado, los helmintos pueden modular la actividad y/o función de las células dendríticas, las células presentadoras de antígeno más potentes y las únicas capaces de activar linfocitos T vírgenes. En particular, *F. hepatica* es capaz de inhibir la activación y posterior función de células dendríticas provocando que el huésped responda de forma ineficiente, inhibiendo la eliminación del parásito [57-61]. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha determinado que los glicanos producidos por *F. hepatica* desempeñan funciones reguladoras sobre mecanismos inmunes del huésped, y en particular sobre la función de las células dendríticas [18].

Si bien es muy escasa la información actual en relación a la composición glucídica de los glicanos presentes en la *F. hepatica*, existen evidencias obtenidas por nuestro grupo de investigación de que glicanos ricos en manosa presentes en *F. hepatica* participan en la inhibición de la maduración de células dendríticas [18]. Por ello, el uso de glicosidasas inmovilizadas constituye una herramienta interesante para la elucidación de la composición glucídica y determinación de la funcionalidad de los glicanos de este parásito. Por un lado el uso de exoglicosidasas permitiría la escisión en forma específica de determinados residuos glicosídicos, permitiendo confirmar su presencia en las cadenas oligosacáridicas de las glicoproteínas de *F. hepatica*. Por otro lado posibilitaría obtener extractos parasitarios desprovistos de estos azúcares permitiendo evaluar si los extractos deglicosilados pierden su capacidad de modular la respuesta inmune.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo de final de carrera es la optimización de la inmovilización de β -Gal de *Aspergillus oryzae* y α -Man de *Canavalia ensiformis* y la evaluación de su uso potencial como herramienta biotecnológica capaz de deglicosilar glicoproteínas en forma específica.

En este contexto, planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Optimizar la inmovilización de β -Gal y α -Man sobre soportes activados con estructura cianato éster.
- Evaluar el funcionamiento de las glicosidasas β -Gal y α -Man inmovilizadas, en la deglicosilación de glicoproteínas modelos.
- Identificar los carbohidratos liberados de las glicoproteínas modelo por acción de las glicosidasas y evaluar la pérdida de reconocimiento por lectinas específicas como consecuencia de la remoción de los carbohidratos.
- Evaluar la capacidad de la α -Man inmovilizada de demanosidar un extracto total de *F. hepatica* en las condiciones óptimas determinadas para las proteínas modelo.

2. Materiales y Métodos

2.1. Enzimas y reactivos

La α -Man de *C. ensiformis* (Jack bean) (α -D-manósido manohidrolasa, EC 3.2.1.24), la β -Gal de *A. oryzae* (β -D-galactósido galactohidrolasa, EC 3.2.1.23), la fetuina de suero de ternero, el 1, ciano-4-dimetilamino piridinio tetrafluoro borato (CDAP-BF₄), el o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), el p-nitrofenil- α -D-mannopiranosido (PNPM), la o-fenilendiamina (OPD), la galactosa, la manosa, y el orcinol fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). La lactoferrina bovina se obtuvo de Murray Golburn Co-operative Co. LTD (Melbourne). El reactivo BCA para determinación de proteína fue adquirido en Pierce (Rockford, Illinois, USA). Las placas de sílica para cromatografía en capa fina fueron adquiridas de Machery Nagel (Duren Germany). La Sepharosa 4B y las columnas de PD-10 (Sephadex G25) y NAP-5 (Sephadex G25) se adquirieron en GE HealthCare (Buckinghamshire, UK).

2.2. Preparación del extracto enzimático de β -Gal

Se incubó 1 g de enzima β -Gal de *Aspergillus Oryzae* (Sigma G 5160) con 7,5 mL de buffer de actividad (Acetato de sodio 50 mM, pH 5,5) bajo agitación magnética durante 30 minutos. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 4°C y 10.000 rpm. El extracto enzimático se guardó a 4°C.

2.3. Ensayo de actividad enzimática para la β -Gal

La actividad enzimática de la β -Gal se determinó utilizando el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG). El ONPG es incoloro mientras que el producto de la reacción, el orto-nitrofenol (ONP) es de color amarillo y absorbe a 405 nm (Figura 7).

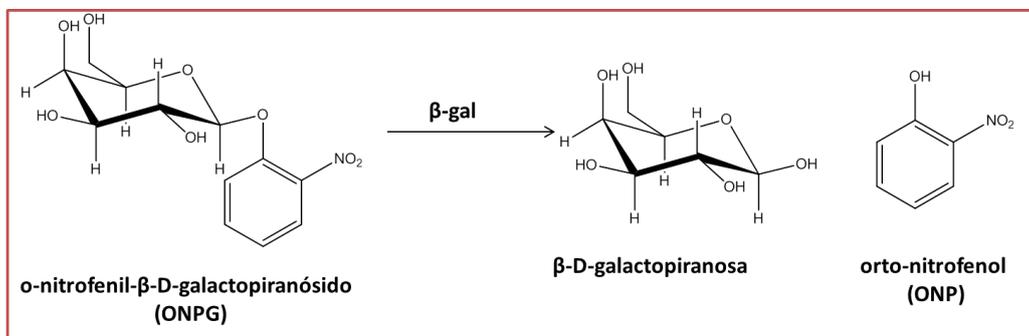


Figura 7. Reacción catalizada por la β -Gal utilizando ONPG como sustrato.

Se incubaron 100 μ l de una dilución de enzima gel-filtrada con 2 mL de ONPG 25 mM preparado en buffer de actividad a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia del producto formado a una longitud de onda de 405 nm. La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de ONP por minuto a pH 5,5 y temperatura ambiente. Para la gel-filtración de la enzima se utilizaron columnas PD-10 (Sephadex G-25). El coeficiente de extinción para el ONP a pH 5,5 es de $7,5 \times 10^2 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

Para medir la actividad de la enzima inmovilizada se preparó una suspensión estándar (0,1 g de la enzima inmovilizada re-suspendida en 1 mL de buffer de actividad). El ensayo se realizó en las mismas condiciones descritas para enzima soluble, utilizando espectrofotómetro equipado con agitación magnética. La concentración de enzima se expresó en UE/mL y UE/g para la enzima soluble y el derivado inmovilizado respectivamente.

2.4. Ensayo de actividad enzimática para la α -Man

Para el ensayo de actividad de la α -Man se utilizó como sustrato, el p-nitrofenil- α -D-manopiranosido (PNPM). El PNPM es incoloro y por lo tanto no absorbe en el espectro visible, mientras que el producto de la reacción, el p-nitrofenol (PNP), absorbe a 405 nm (Figura 8).

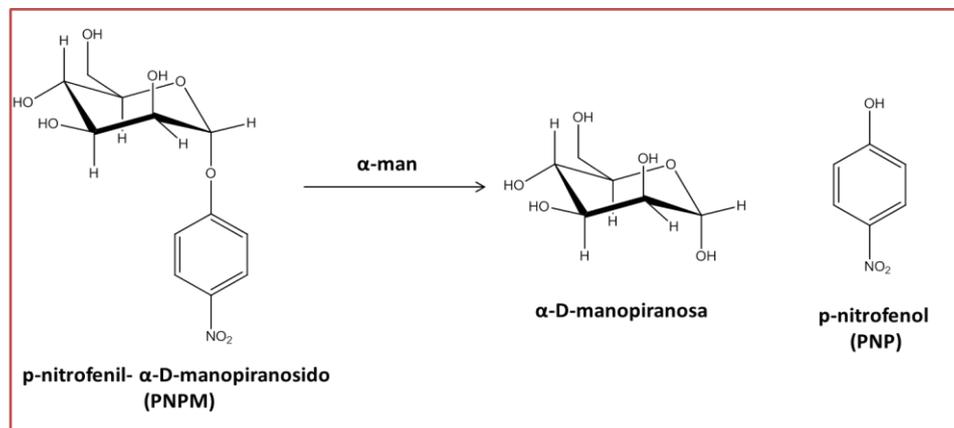


Figura 8. Reacción catalizada por la α -Man utilizando PNPM como sustrato.

Se incubaron 70 μ l de una dilución adecuada de enzima con 630 μ l de PNPM 5 mM en buffer citrato de sodio 50 mM pH 4,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de zinc. Se tomaron alícuotas de 100 μ l cada 30 segundos, y se le agregaron 200 μ l de buffer borato de sodio 0,2 M pH 9,8 para detener la reacción enzimática. Se transfirieron 200 μ l a una microplaca y se midió absorbancia a 405 nm en lector de placas de ELISA. Se determinó la concentración de PNP utilizando una curva de calibración. Se definió la unidad de enzima como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 μ mol de PNP por minuto a temperatura ambiente y pH 4,5.

Para medir la actividad de la enzima inmovilizada se preparó una suspensión estándar (25 mg de derivado enzimático en 1 mL de buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de zinc). El ensayo de actividad se realizó en las mismas condiciones que para la enzima en solución. Para evitar que el derivado sedimente, la toma de suspensión estándar y la reacción enzimática se llevó a cabo utilizando agitación magnética. La concentración de enzima se expresó en UE/mL y UE/g para la enzima soluble y el derivado inmovilizado respectivamente.

2.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica del ácido bicinónico (BCA). Esta se basa en la reducción de Cu^{+2} a Cu^{+} por parte de los residuos cisteína, tirosina y triptófano de la proteína. Posteriormente, el BCA forma un complejo con los iones Cu^{+} en medio alcalino, que absorbe a 562 nm. Se incubaron 15 μL de muestra con 300 μL de reactivo a 60°C durante 15 minutos. Luego se midió la absorbancia a 562 nm y se determinó la concentración de proteína interpolando en la correspondiente curva de calibración. Para la construcción de la curva de calibración se utilizó seroalbúmina bovina como estándar. La cuantificación de la enzima inmovilizada para el caso de la β -Gal, se realizó utilizando el mismo procedimiento pero incubando 50 μL de enzima con 1 mL de reactivo a 60°C durante 15 minutos bajo agitación. Para el caso de la α -Man la cantidad de enzima inmovilizada se determinó por diferencia entre la proteína aplicada y la recuperada en el sobrenadante. Los resultados se expresaron en mg/mL para la enzima soluble y mg/g para los derivados inmovilizados.

2.6. Inmovilización de enzimas

2.6.1. Activación de lechos de agarosa (CDAP-agarosa)

El gel agarosa 4B, se activó utilizando el agente cianilante 1-ciano-(4-dimetilamino) piridinotetrafluorborato (CDAP) de forma de introducir grupos cianato éster [36]. Todos los reactivos utilizados fueron pre enfriados a 4°C. Se lavaron 3 g de agarosa 4B con: 50 mL de agua destilada, 50 mL de acetona:agua (3:7) y 50 mL de acetona:agua (6:4). Se escurrió el gel haciendo vacío, se suspendió en 2 mL de acetona:agua (6:4) y se colocó en baño de hielo. Posteriormente, se agregaron a la suspensión de gel, 75 mg de CDAP disueltos en 2 mL de acetona:agua (6:4) bajo agitación vigorosa durante 3 minutos. A continuación se agregaron 240 μL de una solución de trietilamina (TEA) gota a gota durante un periodo de 2 a 3 minutos. Después de 3 minutos de agitación continua, se transfirió rápidamente la mezcla de reacción a un recipiente conteniendo 50 mL de HCl 50 mM enfriado a 4°C. Luego de un máximo de dos minutos el gel se lavó rápidamente en una placa filtrante con 50 mL de agua a 4°C y se utilizó en forma inmediata para la inmovilización de la enzima correspondiente.

2.6.2. Inmovilización de la β -Gal

Se incubaron 1,5 g de agarosa activada con 15 mL de β -Gal (40 UE/mL; 1 mg/mL) en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8,3 (buffer de inmovilización), durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en roto-torque. Se separó el sobrenadante por filtración, se lavó el derivado inmovilizado con buffer de actividad y se guardó a 4 °C.

2.6.3. Inmovilización de la α -Man

Se incubaron 0,3 g de agarosa activada con 2 mL de α -Man (12 UE/mL, 0,40 mg/mL) en buffer fosfato de sodio 100 mM pH 7,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de zinc (buffer de inmovilización) durante 4 horas a temperatura ambiente y agitación suave en roto-torque. Se separó el sobrenadante por filtración, se lavó el derivado inmovilizado con buffer de inmovilización y se guardó a 4 °C.

2.7. Determinación del pH óptimo para la β -Gal

Se midió la actividad enzimática de la enzima soluble e inmovilizada a distintos pHs. Para los pHs 4,6 y 5,5 se utilizó buffer acetato de sodio 100 mM, mientras que para los pHs del rango 6,5 - 8,3 se utilizó buffer fosfato de sodio 100 mM. Los coeficientes de extinción molar (ϵ) del ONP a los distintos pHs se determinaron midiendo la absorbancia de soluciones de diferentes concentraciones de ONP a distintos pHs. Luego se obtuvo la curva, Absorbancia vs [ONP], para cada uno de los pHs utilizados, en la cual las pendientes corresponden a los diferentes ϵ .

2.8. Determinación de la estabilidad con el pH para la β -Gal inmovilizada

Se incubaron suspensiones estándar de β -Gal inmovilizada a distintos pHs (pH: 4,6; 5,5; 6,5; 8,3) durante 24 hs a temperatura ambiente. Se midió la actividad enzimática residual y se comparó con la actividad inicial del derivado enzimático.

2.9. Deglicosilación de proteínas modelo

2.9.1. Obtención de asialofetuina

La asialofetuina se obtuvo mediante la desialilación química de fetuina. Se disolvieron 30 mg de Fetuina en 2,55 mL de HCl 0,2 N, y se incubaron en un termo block a 80°C durante una hora. Se enfrió en baño de agua a temperatura ambiente y se neutralizó con NaOH 2,0 N. Luego se dializó durante 24 horas contra buffer acetato de amonio 50 mM, pH 5,5. Se centrifugó el producto de diálisis durante 5 minutos a 10.000 rpm y se midió el pH para verificar la efectividad de la diálisis.

2.9.2. Degalactosilación de la asialofetuina

Se incubaron 2 mL de solución de asialofetuina (6 mg/mL) con 0,1 g de β -Gal inmovilizada durante 24 horas bajo agitación suave en roto-torque a temperatura ambiente. Se separó el derivado por filtración, se lavó con buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,5 y se conservó a 4 °C para volver a utilizar. El sobrenadante se gel-filtró en columnas de Sephadex G-25 PD-10 equilibrada en buffer acetato de amonio 50 mM, pH 5,5 para separar la asialofetuina degalactosilada de la galactosa liberada. Se sembraron 2,0 mL de asialofetuina degalactosilada, se eluyó con el buffer acetato de amonio 50 mM pH 5,5, y se recogieron las siguientes fracciones; i) la fracción donde eluye la asialofetuina degalactosilada (volúmenes entre 2,5 y 5,5 mL), la que se guarda para realizar estudios de reconocimiento con lectinas y ii) Una segunda fracción (volúmenes entre 5,5 mL y 10,5 mL) donde se espera que eluya la galactosa liberada. Esta última fracción, se liofiliza se retoma en 300 μ L de agua y se guarda para analizar por TLC y HPLC.

2.9.3. Demanosidación de la lactoferrina

Se preparan soluciones de lactoferrina (9,8 mg/mL) en buffer citrato de sodio 50 mM, pH 4,5 suplementado con acetato de zinc 0,1 mM y en buffer citrato de sodio 50 mM, pH 6,5 suplementado con acetato de zinc 0,1 mM. Se gel-filtran en columnas PD-10 (Sephadex G-25) para separar moléculas de bajo peso molecular presentes en el preparado comercial.

Se incubaron 0,05 g de α -Man inmovilizada con 2 mL de lactoferrina (7 mg/mL) durante 24 horas bajo agitación suave en roto-torque a temperatura ambiente. Se separó el derivado inmovilizado por filtración, se lavó con buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7,5 conteniendo acetato de zinc 0,1 mM y se guardó para volver a utilizar. El sobrenadante de la demanosidación se gel-filtró en columnas PD-10 (Sephadex G-25) equilibrado en buffer acetato de amonio 50 mM pH 5,5, para separar la lactoferrina demanosidada de la manosa liberada. Se sembraron 2,0 mL de lactoferrina demanosidada, se eluyó con el buffer acetato de amonio 50 mM pH 5,5 y se recogieron las siguientes fracciones; i) la fracción donde eluye la lactoferrina demanosidada (volúmenes entre 2,5 y 5,5 mL), la que se guarda para realizar estudios de reconocimiento con lectinas; ii) Una segunda fracción (volúmenes entre 5,5 mL y 10,5 mL) donde se espera que eluya la manosa liberada. Esta última, se liofilizó, se retomó en 300 μ L de agua y se guardó para analizar por TLC y HPLC.

2.10. Demanosidación del lisado de *F. hepatica*

2.10.1 Preparación de lisado total de *F. hepatica*

Los gusanos adultos de *F. hepatica* utilizados para la generación del lisado total parasitario se obtuvieron de los conductos biliares de hígados bovinos cedidos por el frigorífico Carrasco. Se lavaron durante una hora a 37°C con buffer fosfato salino (PBS) a pH 7,4. Posteriormente se procedió a la ruptura mecánica de los mismos, se sonicó y se centrifugó a 40.000 rpm durante 60 min. Luego, se re-suspendió en PBS conteniendo un cocktail de inhibidores de proteínas (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y se dializó contra PBS durante 24 horas y se guardó a -80°C.

2.10.2. Demanosidación de lisado total de *F. hepatica*

El lisado parasitario se almacenado a -80°C. Se descongeló a 4°C y luego se gel- filtró en columnas NAP- 5 (Sephadex G25) equilibradas en buffer citrato de sodio 50 mM, pH 6,5 suplementado con 0,1 mM de acetato de Zinc para remover componentes de bajo peso molecular del extracto. Se agregaron 112 μ L de un cocktail de inhibidores de proteínas disuelto en 10 mL de PBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 1 mL de lisado gel filtrado.

Se incubaron 0,05 g de α -Man inmovilizada con 0,5 mL del lisado (2 mg proteína/mL) bajo agitación suave en roto-torque durante 7,5 y 24 horas a temperatura ambiente. Se separó el derivado enzimático por filtración, se lavó con buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5 suplementado con 0,1 mM acetato de zinc y se guardó para posteriores usos. El sobrenadante de la demanosidación conteniendo el extracto parasitario demanosidado se dializó contra buffer PBS pH 7,4 utilizando membrana de diálisis de corte 3 kDa para separar la manosa liberada y se guardó a -80 °C para análisis de reconocimiento con lectinas.

2.11. Análisis por TLC

Se sembraron 5 μ L de las fracciones a analizar y de los estándares correspondientes en placas de silica-gel 60 (20 cm x 10 cm). Se utilizó como fase móvil metanol, cloroformo, acetona, hidróxido de amonio (42:16:25:16). Se reveló con orcinol 2% (0,2 g orcinol monohidrato en etanol: sulfúrico (95:5)) y calor.

2.12. Análisis por HPLC

Se utilizó un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Waters, equipado con detector de índice de refracción, columna Shodex Asahiapak NH2P50 4E, (4,6 mm d.i. x 250 mm de largo) a 25 °C, con la siguiente fase móvil: acetonitrilo:agua (75:25) y un flujo de 1 mL/min.

2.13. Ensayo de reactividad con lectinas

Para evaluar la efectividad de la demanosidación de lactoferrina se realizó un ensayo de tipo ELISA (Enzyme linked Immuno Sorbent Assay) utilizando Concanalina A de *Canavalia ensiformis* con especificidad para manosa. Se sensibilizó una placa de 96 pocillos (NUNC, Dinamarca) con la proteína deglicosilada o el lisado demanosidado (1-10 μ g) durante toda la noche a 4°C en buffer carbonato 100 mM pH 9,0. Luego, se efectuaron tres lavados con PBS conteniendo tween 0,1% (PT) y se bloqueó con gelatina 1% en PBS durante una hora a 37°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PT y se incubó durante una hora a 37°C con la lectina correspondiente biotinilada, diluída con PTG (gelatina 0,5 % en PBS- Tween 0,1%). A continuación se lavó tres veces con PT para luego incubar por 45 minutos a 37°C con Streptavidina conjugada con peroxidasa (1/2000 diluida en PTG). Luego se llevaron a cabo nuevamente tres lavados con PT para posteriormente incubar con 200 μ L de o-fenilendiamina 0,5 mg/mL (OPD) por pocillo, en buffer citrato fosfato 100 mM, pH 5,0 y peróxido de hidrógeno (30%). El desarrollo de color fue cuantificado con lector ELISA midiendo absorbancia a 492 nm.

3. Resultados y discusión

3.1. Inmovilización de β -Gal y α -Man

La β -Gal y la α -Man se inmovilizaron sobre CDAP- agarosa, mediante una estrategia de inmovilización covalente donde se forman enlaces de tipo isourea entre los grupos amino de la proteína y los grupos cianato éster de la agarosa activada. Las inmovilizaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 4 horas a pH 8,3 y 7,5 para la β -Gal y la α -Man respectivamente. Para evaluar el proceso de inmovilización se determinaron los rendimientos de inmovilización (porcentaje de proteína inmovilizada en relación a la aplicada expresada en mg) y los rendimientos de actividad (porcentaje de Unidades de Enzima inmovilizada en relación a la actividad aplicada).

El proceso de inmovilización fue exitoso para ambas enzimas obteniéndose rendimientos de inmovilización superiores al 60%.

En el caso de la β -Gal se consiguió inmovilizar la enzima en forma completamente activa obteniéndose rendimientos de inmovilización y de actividad del orden de 60-70% (Tabla II). Esto significa que la enzima no se inactivó durante el proceso de inmovilización.

Tabla II.- Inmovilización de β -Gal de *A. oryzae* sobre CDAP-agarosa

	UE/g aplicado	mg prot/g aplicado	UE/g inmov.	%	mg prot/g inmov.	%
1	348	10,6	288	83	7,2	68
2	390	8,7	239	61	5,3	61
3	390	8,7	226	58	5,0	57

En el caso de la α -Man (Tabla III) se obtuvieron rendimientos de inmovilización superiores al 70%. Sin embargo los rendimientos de actividad fueron levemente menores, del orden de un 60-70%. Estos resultados podrían indicar que durante el proceso de inmovilización pudo tener lugar una inactivación parcial de la enzima.

Otra posibilidad es que durante el proceso de inmovilización la enzima haya sufrido cambios en su estructura que se reflejen en un cambio en la afinidad por el sustrato y por lo tanto en un aumento de su K_M . Esto último podría llevar a que al trabajar a concentraciones bajas de sustrato debido al costo del mismo se esté subestimando la actividad del derivado.

Tabla III.- Inmovilización de α -Man de *C. ensiformis* sobre CDAP-agarosa.

	UE/g aplicado	mg prot/g aplicado	UE/g inmov.	%	mg prot/g inmov.	%
1	74	2,7	53	72	2,4	90
2	82	3,0	46	56	2,9	98
3	95	2,0	68	71	1,4	70
4	95	2,0	56	59	1,5	74
5	73	2,7	51	70	2,7	100

Se estudió la estabilidad de la enzima inmovilizada en buffer fosfato de sodio 100 mM, pH 7,5 suplementado con acetato de Zn 0,1 mM a 4 °C en función del tiempo y se observó que la misma mantuvo un 100% de su actividad inicial al cabo de 90 días.

Para ambas enzimas se obtuvieron derivados enzimáticos con una buena actividad, 251 UE/g y 55 UE/g para la β -Gal y α -Man, respectivamente, lo que hace posible su aplicación a procesos de deglicosilación de glicoproteínas.

3.2. Estudio de las propiedades de las enzimas inmovilizadas

Uno de los objetivos de este trabajo fue la aplicación de glicosidasas inmovilizadas a la deglicosilación de glicoproteínas modelo y glicoconjugados presentes en un extracto de *F. hepatica*. Dado que las glicoproteínas o muestras biológicas a deglicosilar pueden no ser estables al pH óptimo de la glicosidasa utilizada, se realizaron estudios de estabilidad y condiciones óptimas de funcionamiento de la enzima en función del pH.

Para el caso de los derivados de β -Gal se estudió el pH óptimo y la estabilidad de la enzima a distintos pHs a los efectos de ver el rango de pH en que la misma podría ser aplicada en procesos de degalactosilación.

3.2.1. pH óptimo de la β -Gal

Dado que la absorbancia del ONP, producto de la hidrólisis enzimática del ONPG, es dependiente del pH, se determinaron sus coeficientes de extinción a diferentes pH (Tabla IV).

Tabla IV.- Coeficientes de extinción del ONP a diferentes pH

pH	4,6	5,5	6,5	8,3
ϵ mM ⁻¹ cm ⁻¹	0,89	0,84	0,92	3,6

Luego se determinó la influencia del pH en la velocidad de la enzima y se graficaron las velocidades relativas a pH 5,5, en función del pH (Figura 9).

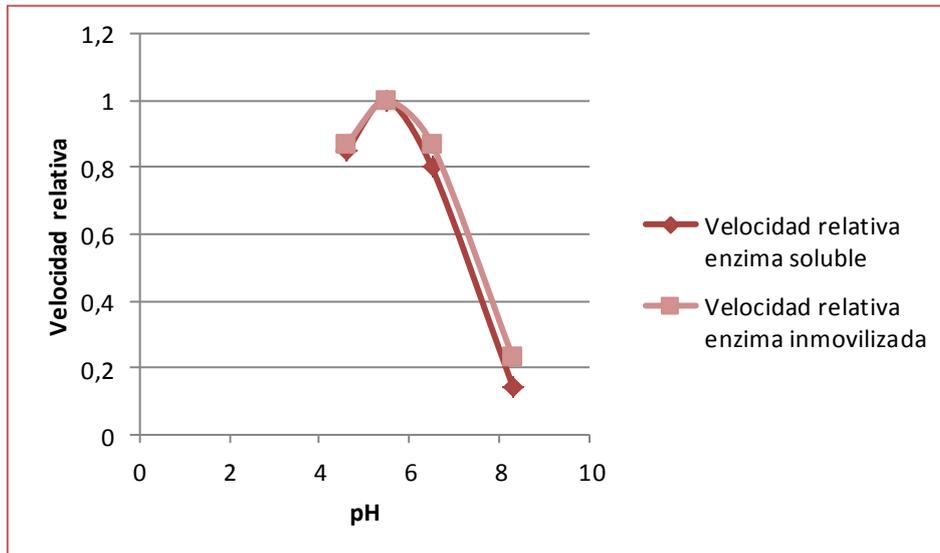


Figura 9. Estudio de la velocidad relativa de β -Gal de *A. oryzae* en función del pH.

Estos resultados permitieron concluir que la enzima presentó su máxima velocidad a pH 5,5 tanto en su forma soluble como inmovilizada, lo cual concuerda con lo reportado en bibliografía [46].

3.2.2. Estabilidad con el pH de la β -Gal inmovilizada

Los resultados obtenidos para la estabilidad de la β -Gal inmovilizada a distintos pHs (Figura 10) demostraron que la misma permanece activa al cabo de 24 horas, a temperatura ambiente, en un amplio rango de pH (pH: 3,5 - 8,3).

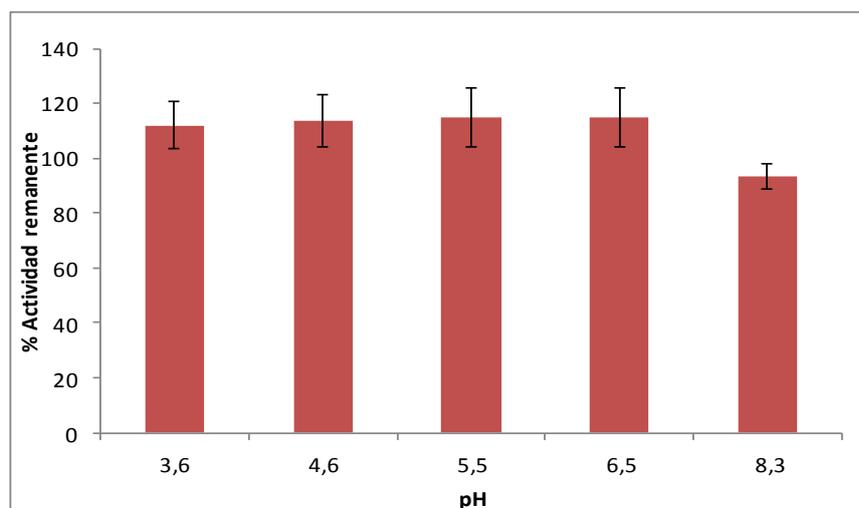


Figura 10. Estudio de la estabilidad de la β -Gal de *A. oryzae* en función del pH (% Actividad remanente a 24hs vs pH)

3.2.3. Estudios de estabilidad con α -Man

Uno de los objetivos específicos de este trabajo era el uso de α -Man en la demanosidación de extractos de *F. hepatica*. Dado el alto costo de la α -Man de *C. ensiformis* y de su sustrato, se acotaron los estudios de estabilidad y condiciones óptimas, a los requeridos para su aplicación al modelo biológico seleccionado.

Cuando se disminuyó el pH del extracto de *F. hepatica* a valores inferiores de 6,5 se observó precipitación del mismo. Por lo cual se resolvió estudiar cómo funciona la α -Man a dicho pH. Para eso se determinó la actividad enzimática de la enzima a pH 6,5 y se comparó con los valores obtenidos a su pH óptimo, 4,5 [47].

Los resultados obtenidos indicaron que la actividad a pH 6,5 es 90% menor que a su pH óptimo. Sin embargo se pensó que aumentando la cantidad de enzima utilizada en el ensayo y prolongando los tiempos del mismo, sería viable el uso de la α -Man a pH 6,5. Estos resultados se muestran en la sección 3.3.2. y 3.4.

3.3. Deglicosilación de glicoproteínas modelo

A los efectos de estudiar si las glicosidasas inmovilizadas son una herramienta válida para la deglicosilación de glicoproteínas se seleccionaron dos glicoproteínas modelo para optimizar los procesos de deglicosilación. Por un lado, la asialofetuína, una proteína que presenta unidades de β -galactosa terminales en las cadenas oligosacáridicas [50], y fue utilizada para evaluar los procesos de degalactosilación. Por otro lado, para evaluar los procesos de demanosidación se seleccionó la lactoferrina que contiene N-glicanos con alto contenido de manosa [52-53].

3.3.1. Degalactosilación de asialofetuina

Se incubaron 0,1 g de derivado de β -Gal inmovilizada con 2 mL de asialofetuina (6 mg/mL) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se separó el derivado inmovilizado por filtración para reutilizarlo y el sobrenadante se gel-filtró para separar la asialofetuina degalactosilada de la galactosa liberada. La fracción correspondiente a los azúcares se concentró por liofilización y se evaluó por TLC y HPLC para identificar la presencia de galactosa.

Se sembraron en placas de TLC, las fracciones correspondientes a la galactosa liberada por el proceso de degalactosilación junto con estándares de galactosa de concentraciones decrecientes con el objetivo de determinar la sensibilidad del método. En la Figura 11 se puede observar que el análisis por TLC permite detectar concentraciones de galactosa de hasta 2 mM, aunque la banda obtenida es muy tenue.

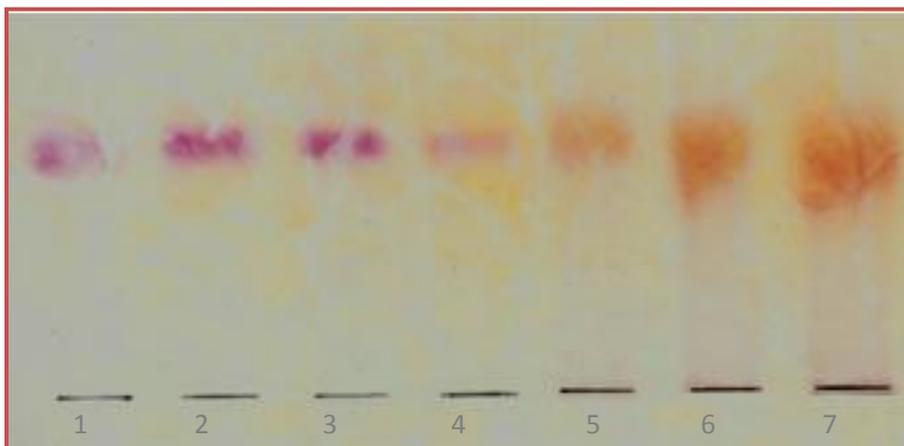


Figura 11. Cromatografía en capa fina de la fracción conteniendo azúcares correspondientes a la degalactosilación de asialofetuina. Carriles: 1.- galactosa 20 mM, 2.- galactosa 10 mM, 3.- galactosa 5 mM, 4.- galactosa 2 mM, 5.- Producto de degalactosilación (5 μ L), 6.- Producto de degalactosilación (10 μ L), 7.- Producto de degalactosilación (15 μ L)

En los carriles 5-7 correspondiente a las fracciones de la galactosa liberada por el proceso de degalactosilación, se logró visualizar una banda a la altura de los estándares de galactosa confirmando la liberación de la misma. Este experimento se repitió varias veces obteniéndose los mismos resultados.

También, se realizó un blanco con el mismo protocolo utilizado para la degalactosilación, pero esta vez utilizando agarosa sin activar en lugar de la β -Gal inmovilizada, verificándose que no se libera galactosa en ausencia de β -Gal (resultado no mostrado). Esto implica que la liberación de galactosa es inherente a la acción de la enzima. Estos resultados permitieron concluir que la β -Gal inmovilizada es una herramienta válida para la degalactosilación de glicoproteínas conteniendo β -galactosa terminal.

A continuación se realizaron ciclos de degalactosilación re-utilizando el derivado enzimático. Las fracciones donde se esperaba encontrar los carbohidratos liberados por acción de la β -Gal se analizaron por TLC y HPLC. En la Figura 12A se muestra una cromatografía en capa fina, donde se observa claramente una banda a la misma altura que el estándar de galactosa en los carriles correspondientes a los azúcares liberados cuando el derivado enzimático fue reutilizado. Estos resultados confirman la liberación de galactosa lo que permite concluir que el re-uso del derivado es viable. Los mismos resultados se observaron luego de un tercer uso.

Estos resultados fueron confirmados analizando las muestras correspondientes a la liberación de carbohidratos por HPLC. Se compararon los perfiles de un estándar de galactosa 10 mM, con los de las muestras de degalactosilación observándose en ambos casos el mismo tiempo de retención (Figura 12B).

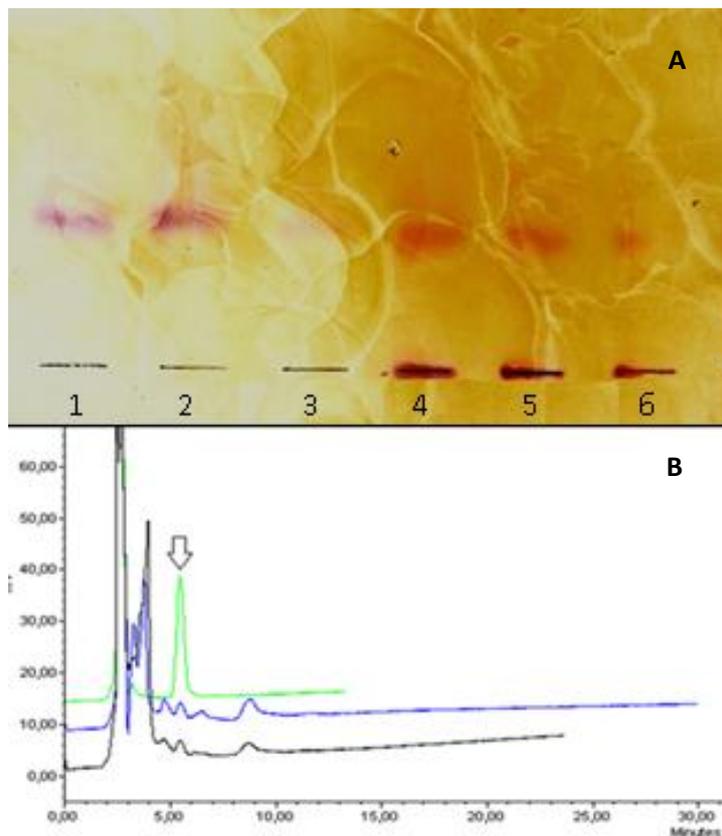


Figura 12. A) Cromatografía en capa fina de la fracción de carbohidratos correspondientes a la degalactosilación de asialofetuina. Carriles: 1.- galactosa 10 mM, 2.- galactosa 5 mM, 3.- galactosa 2 mM, 4.- Producto de degalactosilación del re-uso (15 μ L), 5.- Producto de degalactosilación del re-uso (10 μ L), 6.- Producto de deglicosilación del re-uso (5 μ L) **B) Cromatografía HPLC.** Verde- Estándar de galactosa 10 mM Negro.-Producto de deglicosilación (primer uso) Azul.-Producto del re-uso del derivado enzimático.

La concentración de la galactosa liberada en la degalactosilación fue de 1,9 mM tanto con enzima inmovilizada utilizada por primera vez o reutilizada.

Cabe destacar que la sensibilidad de la técnica del HPLC es mayor a la de la TLC. A su vez el detector de índice de refracción es un detector universal mientras que el orcinol, revelador utilizado en la TLC, es específico para carbohidratos. Esto explica por qué en el HPLC se pueden detectar otros picos correspondientes a otros componentes de las muestras que no pueden ser identificados por TLC.

3.3.2. Demanosidación de lactoferrina

La capacidad de la α -Man inmovilizada de catalizar procesos de demanosidación de glicoproteínas fue evaluada utilizando lactoferrina como glicoproteína modelo. La demanosidación se realizó incubando 0,05 g de α -Man inmovilizada con 2 mL de

lactoferrina (7 mg/mL) durante 24 horas a temperatura ambiente y pH 4,5 (pH óptimo de la enzima). Se separó el sobrenadante por filtración y se gel-filtró para separar la lactoferrina demanosidada de la manosa liberada.

La fracción correspondiente a los carbohidratos liberados fue concentrada por liofilización y analizada por TLC y HPLC para identificar presencia de manosa.

En una placa de TLC se sembraron estándares de distintas concentraciones de manosa (5-50 mM), para determinar la sensibilidad del método, junto con las fracciones correspondientes a los carbohidratos. En la Figura 13 se puede observar que es posible detectar por TLC concentraciones de manosa de hasta 5 mM.

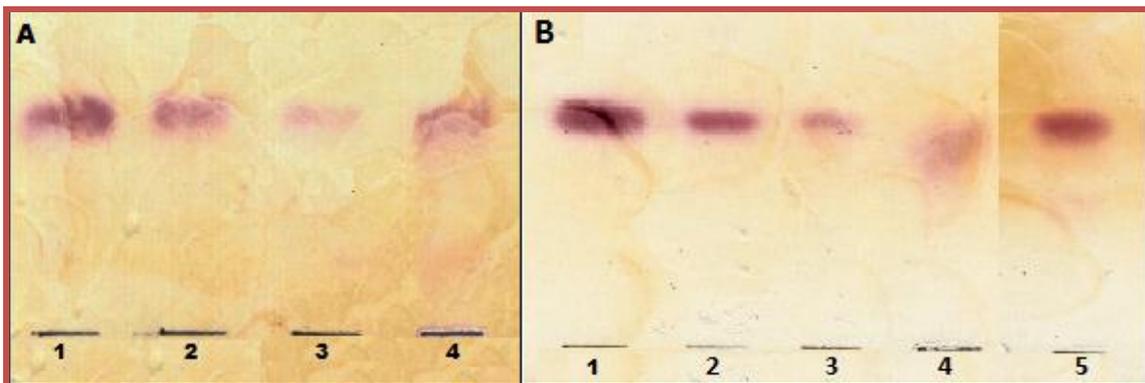


Figura 13. Cromatografía en capa fina de la fracción de carbohidratos correspondientes a la demanosidación de lactoferrina. A) Carriles: 1.- manosa 50 mM, 2.- manosa 10 mM, 3.- manosa 5 mM, 4.- Producto de demanosidación del primer uso (15 μ L), **B)** Carril 1.- manosa 50 mM, 2.- manosa 10 mM, 3.- manosa 5 mM, Carril 4.- Producto de demanosidación del primer re-uso (15 μ L) Carril 5.- Producto de demanosidación del segundo re-uso (15 μ L).

En la cromatografía de la Figura 13A se observa que hubo liberación de manosa ya que se distingue una banda en el carril correspondiente al producto de demanosidación, a la misma altura que el estándar de manosa.

Posteriormente, se evaluó la factibilidad de reutilizar el derivado en procesos de demanosidación. Una vez que se realizó el ensayo de demanosidación, el derivado se lavó con buffer fosfato de sodio pH 7,5, 100 mM, suplementado con acetato de zinc 0,1 mM y se guardó a 4°C para nuevos usos. Como se observa en la Figura 13B cuando se re-utilizó el derivado se observó liberación de manosa, lo que permite concluir que el re-uso es posible.

Además, se realizaron controles con el mismo protocolo de demanosidación pero incubando lactoferrina con agarosa sin activar, que permitieron confirmar que la liberación de la manosa observada se produjo efectivamente por la acción de la enzima (No se muestra).

Los resultados obtenidos se confirmaron por HPLC. Se inyectó un estándar de manosa de concentración de 2 mM junto con las muestras del primer, segundo y tercer uso del

derivado enzimático (Figura 14). En los cromatogramas de las fracciones correspondientes a los carbohidratos liberados por el proceso de demanosidación, se observa un pico con tiempo de retención igual al del estándar de manosa, esto reafirmaría los resultados obtenidos con TLC.

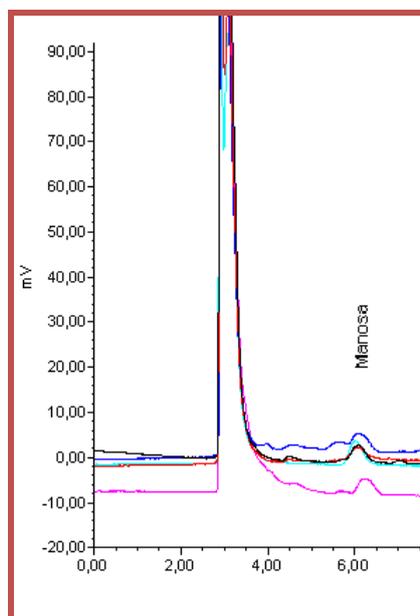


Figura 14. Cromatografía HPLC de la fracción correspondiente a los carbohidratos obtenida de la demanosidación de lactoferrina. -Celeste: Estándar de manosa 2 mM.- Rojo: Producto de la demanosidación.- Azul: Producto de la demanosidación del primer re-uso.- Negro: Producto de la demanosidación del segundo re-uso.- Fuxia: Producto de demanosidación de una segunda serie de experimentos.

A continuación se realizaron estudios de reconocimiento lectina-carbohidrato utilizando ConA, una lectina que reconoce manosa. Si el proceso de demanosidación fue efectivo, la lactoferrina desprovista de manosa no debería ser reconocida por la ConA. En caso de que el proceso de demanosidación haya sido parcial, se debería observar una disminución del reconocimiento de la lactoferrina por parte de la ConA. Se adsorbieron en placa ELISA concentraciones equivalentes de lactoferrina sin tratar, lactoferrina demanosidada a pH 4,5 y el blanco correspondiente (lactoferrina incubada con agarosa sin activar en las mismas condiciones que el proceso de demanosidación). Posteriormente se incubó con ConA biotinilada y a continuación con estreptavidina conjugada a peroxidasa. Se reveló y se midió absorbancia a 492 nm. Una disminución en la absorbancia indica disminución en el reconocimiento de la lectinas como consecuencia de la demanosidación.

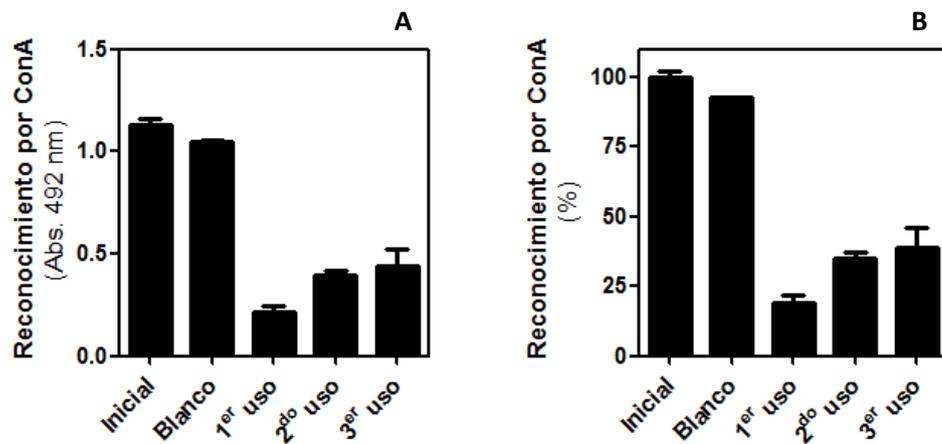


Figura 15. Reconocimiento de manosa presente en la lactoferrina por ConA. Se realizó un ensayo tipo ELISA. Se sensibilizaron los pocillos con lactoferrina demanosidada y sin demanosidar (1 μ g) y se incubó con ConA (1 μ g/ml). Inicial: Lactoferrina. Blanco: Lactoferrina tratada con agarosa sin activar. 1^{er}, 2^{do} y 3^{er} uso del derivado enzimático: Lactoferrina demanosidada. Para el gráfico B se consideró el 100% de reconocimiento, al valor de absorbancia correspondiente al obtenido con el material inicial. En ambas gráficas la barra de error indica la SD (desviación estándar).

En la Figura 15 se observa que la ConA presenta el mismo grado de reconocimiento por la lactoferrina sin tratar (inicial) y el blanco. Esto descarta el desprendimiento de manosa de forma inespecífica como consecuencia de la incubación a pH 4,5 a temperatura ambiente durante 24 de la lactoferrina. Sin embargo, se observa una pérdida de reconocimiento de lectina de más del 80% como consecuencia de la demanosidación a pH 4,5 lo que confirmaría la efectividad del proceso de demanosidación, reafirmando los resultados iniciales en los que se identificó manosa liberada, por TLC y HPLC. En el segundo y tercer uso del derivado enzimático se observa una disminución de la reactividad de las lectinas del 65% y 61% respectivamente. La pérdida de reconocimiento es menor con respecto al primer uso de la enzima inmovilizada, pero de todas formas sigue siendo efectiva la demanosidación.

Uno de los objetivos de este trabajo fue el uso de la manosidasa inmovilizada para la demanosidación de extractos de *F. hepatica*. Dado que este precipita a pHs inferiores a 6,5, se estudió la demanosidación de lactoferrina a pH 6,5 manteniendo la temperatura (ambiente) y el tiempo (24 horas).

Cuando se analizaron los datos por cromatografía en capa fina, se observó una banda a la misma altura que los estándares de manosa. Sin embargo, la intensidad de la misma era menor que cuando el proceso de demanosidación se realizó a pH 4,5. Esto era de esperar, debido a que la enzima no está trabajando en su pH óptimo. Estos resultados también se confirmaron por HPLC. Al igual que para pH 4,5 se hicieron estudios de re-usos del derivado obteniéndose idénticos resultados. Esto confirma que es posible el

uso en forma reiterada del derivado de α -Man para procesos de demanosidación a pH 6,5 (No se muestran resultados).

Por último se realizó el ensayo de reconocimiento con lectinas donde se observó una disminución en el reconocimiento de ConA en relación a la lactoferrina inicial (Figura 16).

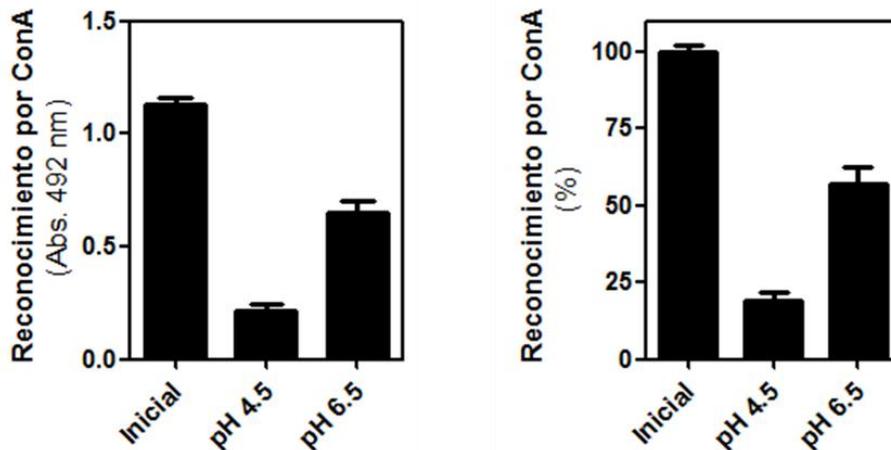


Figura 16. Reconocimiento de manosa presente en lactoferrina por Con A. Se sensibilizaron los pocillos con lactoferrina demanosidada y sin demanosidar (1 μ g) y se incubó con ConA 1 μ g/ml. Se compara la reactividad de las lectinas de la lactoferrina inicial con los promedios de la reactividad de la lactoferrina demanosidada (4,5 y 6,5). Para el gráfico B se consideró el 100% de reconocimiento, al valor de absorbancia correspondiente al obtenido con la muestra inicial. En ambas gráficas la barra de error indica la SD (desviación estándar).

En la Figura 16 se comparan los promedios de los resultados de reconocimiento con lectinas obtenidos para las muestras de lactoferrina demanosidadas a pH 4,5 y 6,5 a temperatura ambiente durante 24 horas. En función de estos resultados se podría concluir que en la demanosidación a pH 4,5 el reconocimiento por las lectinas disminuye un 80%, en cambio cuando la demanosidación se realiza a pH 6,5 el reconocimiento por las lectinas disminuye un 43%, por lo tanto el derivado enzimático claramente funciona mejor a su pH óptimo, pero de todas formas es viable trabajar a pH 6,5.

Con los derivados utilizados en reiteradas oportunidades, tanto a pH 4,5 como 6,5, se hizo un pool de derivado inmovilizado y se determinó la actividad enzimática confirmándose que se mantenía un 100% de la actividad inicial. Ese pool de derivado se continuó utilizando en procesos de demanosidación en forma exitosa lo que confirma su re-uso por más de tres veces.

3.4. Demanosidación de un extracto de *F. hepatica*

Una vez que se validó y optimizó el uso de α -Man inmovilizada como herramienta para la demanosidación de glicoproteínas utilizando proteínas modelos, se trasladó a un sistema biológico. Se llevó a cabo la demanosidación de un extracto total de *F. hepatica*. Previamente, las condiciones de demanosidación se fijaron en función de los resultados obtenidos con los estudios realizados con la lactoferrina, teniendo en cuenta las propiedades del extracto parasitario.

El ensayo se realizó incubando 0,05 g de derivado enzimático con 0,5 mL de lisado gel-filtrado, con una concentración de proteínas de 2 mg/mL, durante 7,5 hs y 24 hs, a temperatura ambiente. La relación carga enzimática: cantidad de proteína en el lisado fue 14 veces mayor que cuando se trabajó con lactoferrina para compensar el hecho de que se trabaja a un pH desfavorable para la enzima. Al lisado se le adicionó inhibidores de proteasas para evitar la proteólisis enzimática de las proteínas del extracto ya que es un extracto rico en proteasas. Se realizó en forma simultánea el blanco correspondiente, incubando el lisado con agarosa sin activar en las mismas condiciones. Las demanosidaciones se realizaron a 7,5 hs y 24 hs a los efectos de evaluar el efecto del tiempo en el proceso de demanosidación.

La efectividad del proceso de demanosidación se evaluó mediante el ensayo de reactividad con la lectina ConA. Cabe destacar que la ConA presenta especificidad por la manosa y también por la glucosa, esto podría contribuir al reconocimiento del lisado por la lectina y de esta forma sobreestimar el mismo. Asimismo existe la posibilidad de que hayan manosas que no se encuentren en los extremos de las cadenas carbohidratas y que no son hidrolizables por la α -Man pero si reconocidas por la lectina. En el ensayo se observó una pérdida de reconocimiento por las lectinas en las muestras tratadas con respecto a la muestra inicial, sin embargo también se observa una disminución del reconocimiento de las lectinas en las muestras blanco (Figura 17A y 17B), que podría ser causado por la proteólisis del lisado durante la incubación. Por lo cual se evaluó la pérdida de reactividad del lisado por la ConA considerando la A_{492} del blanco como el 100% de reconocimiento (Figura C). Se puede observar que la reactividad disminuye un 49% a las 7,5hs y un 57% a las 24hs. Esto confirma la demanosidación de las glicoproteínas presentes en el extracto parasitario utilizando α -Man. También confirmamos que la demanosidación es viable a tiempos menores (7,5 hs) sin pérdida de efectividad.

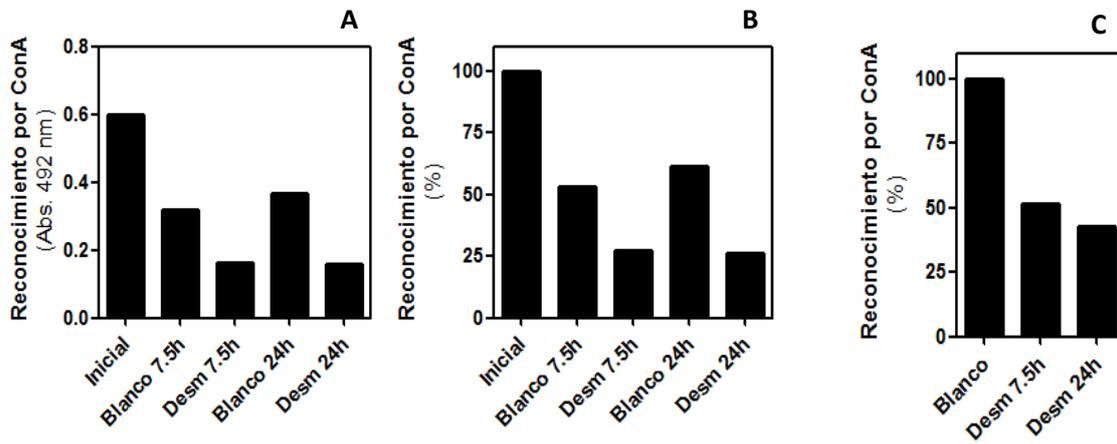


Figura 17. Reconocimiento de manosa por ConA presente en lisados parasitarios. Se sensibilizaron los pocillos con extracto parasitario demanosado y sin demanosar (10 μ g) y se incubó con ConA-biotinilada (1 mg/mL). Inicial (extracto parasitario sin tratar), Blanco (extracto parasitario incubado con agarosa sin activar en las condiciones utilizadas para la demanosidación, Demanosidación 7,5 (extracto parasitario incubado con manosa durante 7,5 hs), Demanosidación 24 (extracto parasitario incubado con manosa durante 24 hs). Para el gráfico B se consideró el 100% de reconocimiento, al valor de absorbancia correspondiente al obtenido con la muestra inicial. Para el gráfico C se consideró el 100% de reconocimiento al valor de absorbancia correspondiente al obtenido para cada blanco correspondiente.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se logró optimizar la inmovilización de la β -Gal de *A. oryzae* y la α -Man de *C. ensiformis* sobre agarosa activada con estructuras cianato éster. Se obtuvieron rendimientos de inmovilización y actividad favorables para ambas enzimas. En el caso de la α -Man se observó inactivación parcial como consecuencia del proceso de inmovilización. Sin embargo, se obtuvieron derivados enzimáticos con una carga adecuada para ambas enzimas, 251 UE/g y 55 UE/g para β -Gal y α -Man, respectivamente. Se estudiaron algunas propiedades de las glicosidasas inmovilizadas. Para la β -Gal se determinó que su pH óptimo se encuentra en el entorno de 5,5, coincidiendo con la enzima en solución. También se demostró que se mantiene activa durante 24 horas, a temperatura ambiente en el rango de pH de 3,5 a 8,3. Para la α -Man, se evaluó el funcionamiento de la enzima inmovilizada a pH 6,5, condiciones requeridas para su aplicación en la demanosidación de extractos parasitarios de *F. hepatica*. Si bien la actividad enzimática de la α -Man a pH 6,5 es sensiblemente menor que a su pH óptimo (4,5) se logró utilizar en procesos de demanosidación a ese pH.

La funcionalidad de las glicosidasas inmovilizadas se estudió utilizando glicoproteínas modelo. La liberación del monosacárido correspondiente fue confirmada por TLC y HPLC. Para la α -Man también se evaluaron los procesos de deglicosilación mediante pérdida de reconocimiento por ConA, una lectina específica para manosa. Se obtuvo una pérdida de reconocimiento por ConA de un 80 % y un 43 % como consecuencia del proceso de demanosidación de lactoferrina a pH 4,5 y 6,5, respectivamente. Cuando se estudió la demanosidación de un lisado de *F. hepatica* se observó un porcentaje de demanosidación de un 49 % y 57 % cuando la demanosidación se realizó a 7,5 hs y 24 hs respectivamente.

Tanto la β -Gal como la α -Man inmovilizada pudieron ser reutilizadas en los procesos de deglicosilación con glicoproteínas modelo, solo para una de ellas, la α -Man, se comprobaron los re-usos con el lisado de *F. hepatica* manteniendo un 100 % de su actividad enzimática.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de final de carrera permiten concluir que el uso de glicosidasas inmovilizadas constituye una herramienta útil en procesos de deglicosilación específica de glicoproteínas y modelos biológicos.

5. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo abren distintas líneas para continuar la investigación.

En primer lugar, esta herramienta podría ser de gran utilidad en la elucidación de la composición y funcionalidad de glicanos de glicoproteínas que participan en procesos biológicos tanto normales como patológicos.

También, se podría transferir los procesos de inmovilización utilizados en este trabajo a otras glicosidasas de interés para el estudio de otros modelos de glicoproteínas. Por otra parte se podrían utilizar nanopartículas magnéticas como soporte y verificar la eficiencia de los derivados obtenidos como herramienta biotecnológica. El tamaño reducido de las nanopartículas podría ser una ventaja cuando se utiliza como soporte para enzimas inmovilizadas, fundamentalmente cuando se trabaja con sustratos macromoleculares como en el caso de las glicoproteínas.

Por último, también es posible utilizar los glicoconjugados desprovistos de manosa obtenidos de los lisados de *F. hepatica* para estudiar si efectivamente pierden su capacidad inmunomoduladora sobre las células dendríticas.

6. Bibliografía

- [1] Deviln, T. Síntesis de Proteínas: Traducción y modificaciones postraducción, In: *Bioquímica*, 4ta ed, Wiley J. and Sons, Inc., Eds. , Editorial Reveté, Barcelona, Vol 1, pp 261.
- [2] Schroder S., Frank M., Pia H., Claes A., Jens F., Sven M-L., Thomas B., Volkmar G., Urlich M., (2010) "*Site-specific analysis of N-linked oligosaccharides of recombinant lysosomal arylsulfatase A produced in different cell lines*", *Glycobiology*, 20, 248-259.
- [3] Carr, S.A., Huddleston, J., Bean, M.F., (1993) "*Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry*". *Protein Science*, 2, 183-196.
- [4] Spiro R.G., (2002) "*Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation and diseases implication of glycopeptide bonds*". *Glycobiology*, 12, 43-56
- [5] Varki, A., (1993) "*Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*". *Glycobiology*, 3, 97-130.
- [6] Taylor, M., Drickamer, K. (2011). *Introduction to Glycobiology*, New York, Oxford University Press.
- [7] Morelle, W., Michalski, J-C., (2007) "*Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry*", *Nature Protocols*, 2, 1585 - 1602.
- [8] Brockhausen I., (1999) "*Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells*" *Biochim. Biophys.* 1, 67-95.
- [9] Freire T., (2002) "*Antígenos mucínicos de O-glicosilación simple: nuevas similitudes moleculares entre células cancerosas y parásitos*". *Actas de Fisiología*. 8, 89 -107.
- [10] Vigerust, D.J and Shepherd, V.L., (2007) "*Virus glycosylation: role in virulence and immune interaction*". *Trends in Microbiology* 15, 211-216.
- [11] Vigerust, D.J., Ulett, K.B., Boyd, K.L., Madsen, J., Hawgood, S., Mc Cullers, J.A., (2007) "*N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses*". *J Virol.* 81, 8593-8600.
- [12] Faveeuw, C., Mallevaey, T., Paschinger, K., Wilson, I.B., Fontaine, J., Mollicone, R., Oriol, R., Altmann, F., Lerouge, P. Capron, M., Trottein, F., (2003) "*Schistosome N-glycans containing core α 3-fucose and core β 2 xilose epitopes are strong inducer of Th2 responses in mice*" *Eur. J. Immunol.*, 33, 1271-1281.
- [13] Van Die, I, Cummings, R.D. (2010) "*Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response?*", *Glycobiology*, 20, 2-12.

- [14] Tawill, S., Le Goff, L., Ali, F., Blaxter, M., Allen, J.E. (2004) "Both free-living and parasitic nematodes induce a characteristic Th2 response that is dependent on the presence of intact glycans", *Infect Immun*, 72, 398-407.
- [15] van Liempt, E., van Vliet, S.J., Engering, A., García Vallejo, J.J., Bank, C.M., Sanchez-Hernandez, M., van Kooyk, Y., van Die, I. (2007) "Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation", *Molec. Immunol.*, 44, 2605-2615.
- [16] Everts, B., Hussaarts, L., Driessen, N.N. Meevissen, M.H., Schramm, G., van der Hamm, A.J., van der Hoeven, B., Scholzen, T., Burgdorf, S., Mohrs, M., Pearce, E.J., Hokke, C.H., Haas, H., Smits, H.H., Yazdanbakhsh, M. (2012) "Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor", *J. Exp. Med.*, 209, 1753-1767.
- [17] Rodríguez, E., Noya, V., Cervi, L., Giacomini, C., Freire, T. (2014) "Glycans from *Fasciola hepatica* modulate dendritic cell maturation and function" 13th International Symposium on DENDRITIC CELLS, France.
- [18] Noya, V., Rodriguez, E., Cervi, L., Giacomini, C., Brossard, N., Chiale, C., Carmona, C., Freire, T., (2014) "Modulation of Dendritic Cell Maturation by *Fasciola hepatica*: Implications of glycans and mucins for Vaccine Development" *Journal of Vaccines & Vaccination*, 5, 1-8.
- [19] Yamada, K., Kakehi, K., (2011) "Recent advances in the analysis of carbohydrates for biomedical use" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 702-727.
- [20] Darville, L.N.F., Merchant, M.E., Murray, K.K., (2011) "A mass spectrometry approach for the study of deglycosylated proteins" *Microchemical journal*, 99, 309-311.
- [21] Morelle, W., Michalski, J-C., (2007) "Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry", *Nature Protocols*, 2, 1585 – 1602.
- [22] Mathews C., van Holde K., Ahern K. (2002) *Bioquímica*. 3era edición. PEARSON EDUCACIÓN, S.A. Madrid, España.
- [23] Varki, A., N-Glycans, In: *Essentials in Glicobiology*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, Vol 1, pp 85.
- [24] Pauline, M., Raymond, R. (1997) "Rapid, sensitive sequencing of oligosaccharides from glycoproteins" *Current opinion in biotechnology*, 8, 488-497.
- [25] Schröder, S., Matthes, F., Hyden, P., Andersson, C., Fogh, J., Müller-Loennies, S., Brulke, T., Gieselmann, V., Matzner, U. (2010) "Site-specific analysis of N-linked oligosaccharides of recombinant lysosomal arylsulfatase A produced in different cell lines", *Glycobiology*, 20, 248-259.
- [26] Grueninger-Leitch, F., D`arcy, A., D`arcy, B., Chène, C. (1996) "Deglycosylation of proteins for crystallization using recombinant fusion protein glycosidases", *Protein Science*, 5, 2617-2622.

- [27] Hägglund, P., Bunkenborg, J., Elortza, F., Jensen, O.N., Roepstorff, P., (2004) "A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation", *Journal of Proteome Research*, 3, 556-566.
- [28] Hägglund, P., Matthiesen, R., Elortza, F., Højrup, P., Roepstorff, P., Jensen, O.N., Bunkenborg, J., (2007) "An enzymatic deglycosylation scheme enabling identification of core fucosylated N-glycans and O-glycosylation site mapping of human plasma proteins", *Journal of Proteome Research*, 6, 3021-3031.
- [29] Zhang, W., Wang, H., Zhang, L., Yao, J., Yang, P., (2011) "Large-scale assignment of N-glycosylation sites using complementary enzymatic deglycosylation", *Talanta*, 85, 499-505.
- [30] Mohamed N. R., Nur Haziqah C. M., Nor Aziah B., Fahrul H., Roswanira A. W., (2015) "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes", *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 28 (2), 205-220
- [31] Gallego del Sol, F., Nagano, C.S., Benildo, S.C., Sampaio, A.H., Sanz, L., Calvete, J.J., (2006) "Lectinas." *Investigación y Ciencia* 361, 57-67.
- [32] González León, S., Caso de Armas, D., González Chávez, A. (2011) "Lectina: una biomolécula que promete en las ciencias biomédicas", *Rev. Ciencias Médicas*, 15, 3-12.
- [33] Rudiger, H., Gabius, H-J. (2002), "Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications", *Glycoconjugate Journal*, 18, 589-613.
- [34] Brena, B.M., Batista Viera, F., Immobilization of Enzymes: A literature survey. In: *Methods and Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*, Guisan, J.M., Editor, Totowa, New Jersey, Humana Press, pp 15-30.
- [35] Bučko M., Mislovičová D., Nahálka J., Vikartovská A., Šefčovičová J., Katrlík J., Gemeiner P., Lacík, Štefuca V., Polakovič M., Rosenberg M., Rebroš M., Šmogrovičová D., Švitel J., (2012) "Immobilization in biotechnology and biorecognition: from macro to nanoscale systems", *Chemical Papers*, 66, 983-998.
- [36] Giacomini C., Villarino A, Franco-Fraguas L., Batista Viera F., (1998) "Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silica and agarose: comparison of different methods" *Journal of Molecular Catalysis*, 4, 313-327.
- [37] Cabral J.M.S., Kennedy J.F. Covalent and coordination immobilization of proteins. In: *Protein Immobilization. Fundamentals and Applications*, Taylor, R.F. Editor, Marcel Dekker, New York, pp 73-138.
- [38] Azevedo, A.M, Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P. (2001) "Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous-organic solvents mixtures" *J. Molec. Catal. B: Enzymatic*, 15, 147-153.
- [39] Batista F. Métodos de inmovilización enzimática. Cátedra de bioquímica.

- [40] Broun G. , Chemically aggregated enzymes. In *Method in Enzymology*. Edited by Mosbach K. Academic Press, New York; Vol 44. pp. 263-280.
- [41] García-Junceda E, García-García JF, Bastida A, Fernandez-Mayoralas A. (2004) "Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades" *Bioorg. Med. Chem.* 12, 1817-1834.
- [42] Katchalski, E.; Silman, I.; Goldman, R. (1971) "Effect of the microenvironment on the mode of action of immobilized enzymes." *Adv. Enzymol.* 34, 445-536.
- [43] Sheldon R.A., (2007) "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance". *Adv. Synth. Catal.* 349 (8-9) 1289–1307.
- [44] Batista-Viera F., Janson J-C, Carlsson J. (2011) "Affinity chromatography", *Protein Purification. Principles, High Resolution Methods and Applications.*, 232-235.
- [45] Varki A., Gagneux P. (1999). "Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function". *Glycobiology*, 9, 747-755.
- [46] Tanaka Y, Kagamiishi A, Kiuchi A, Horiuchi T. (1975) "Purification and properties of beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae*" , *J Biochem.* 77, 241-247.
- [47] Kimura, Y., (1999) "The N-glycans of Jack bean α -Mannosidase. Structure, topology and functions", *European Journal of Biochemistry.* 264, 168-175.
- [48] Yu-Teh Li. (1967). "Studies on the Glycosidases in Jack Bean Meal: Isolation and properties of mannosidase" . *The Journal of Biological Chemistry*, 242, 5474-5480.
- [49] Baenziger J,U, Fiete D., (1979). "Structure of the Complex Oligosaccharides of Fetuin" *The Journal Biological chemistry*, 254, 789-795.
- [50] Nilsson B., Nordén N.E., Svensson S. (1979). "Structural studies on the carbohydrate portion of fetuin" *J. Biol. Chem.*, 254, 4545-4553
- [51] De Waard A., Hickman, S. and Kornfeld, F. (1976) "Isolation and Properties of P-Galactoside Binding Lectins of Calf Heart and Lung", *The Journal of Biological Chemistry*, 251, 7581-7587.
- [52] O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., M'Heaney, R., (2014), "Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation", *Glycobiology* , 24, 220–236.
- [53] Mata, L.; Castillo, H.; Sánchez, L.; Puyol, P. and Calvo, M. (1994) "Effect of trypsin on bovine lactoferrin and interaction between the fragments under different conditions". *Journal of Dairy Research*, 61, 427-432.
- [54] Shimazaki, K.; Tanaka, T.; Kon, H.; Oota, K.; Kawaguchi, A.; Maki, Y. and Sato, T. (1993) "Separation and Characterization of the C-Terminal Half Molecule of Bovine Lactoferrin", *Journal of Dairy Science*, 76, 946-955.
- [55] Yen M., Wu A., Zhang Y., Yu-Ping G., En-Tzu C., (2011) "Recognition roles of the carbohydrate glycotopes of human and bovine lactoferrin lectin-N-glycan interaction" *Biochimica et Biophysica*, 1810, 139-149

- [56] Mas-Coma, S. (2009), "*Fasciola, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control*" Adv. Parasitol, 69, 41-146.
- [57] Spithill, T. (2012). "*Prospects for immunoprophylaxis against Fasciola hepatica (liver fluke)*". Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [58] Van Disel, I. (2010) "*Glycan gimmickry by parasitic helminths: A strategy for modulating the host immune response*" Glicobiology, 20,2-12.
- [59] Dowling D, Hamilton C, Donnelly S, La Course J, Brophy P, Dalton J, (2010) "*Major secretory antigens of the helminth Fasciola hepatica activate a suppressive dendritic cell phenotype that attenuates Th17 cells but fails to activate Th2 immune responses*" Infect Immun, 78, 793-801.
- [60] Falcón C, Carranza F, Martínez F, Knubel C, Masih D, Motrán C., (2010) "*Excretory-secretory products (ESP) from Fasciola hepatica induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells*" Vet Immunol Immunopathol, 137, 36-46.
- [61] Hamilton C, Dowling D, Loscher C, Mophew R, Brophy P, O'Neill S., (2009) "*Fasciola hepatica tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function*" Infect Immun, 6 , 2488-2498.