



# **UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS**  
**Programa de Posgrado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**Especialidad en Almacenamiento y Procesamiento de Granos**

**Síntesis de Neoglicanos a partir de Albúmina Sérica Bovina y  
Oligosacáridos de Quitosano para el Análisis de Glicoepítopes  
Asociados al Reconocimiento Bacteriano**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**Presenta:**

**Gabriela Pérez Chenoweth**

# Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"

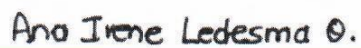


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## APROBACIÓN

### Síntesis de Neoglicanos a partir de Albúmina Sérica Bovina y Oligosacáridos de Quitosano para el Análisis de Glicopeptidos Asociados al Reconocimiento Bacteriano

Q.B. Gabriela Pérez Chenoweth

  
\_\_\_\_\_

Dra. Ana Irene Ledesma Osuna

Director de la tesis

  
\_\_\_\_\_

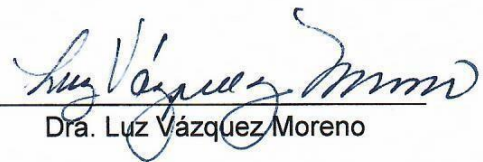
Dra. Beatriz Montaña Leyva

Miembro del Comité de tesis

  
\_\_\_\_\_

Dra. Concepción L. Medina Rodríguez

Miembro del Comité de tesis

  
\_\_\_\_\_

Dra. Luz Vázquez Moreno

Miembro del Comité de tesis

Hermosillo

Junio 2021

# CONTENIDO

	Páginas
<b>APROBACIÓN</b> .....	i
<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	vi
<b>DEDICATORIA</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	xiii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b> .....	3
Glicobiología.....	3
Estructuras de Glicoconjugados.....	4
Biosíntesis de glicoproteínas.....	7
Síntesis de Neoglicanos.....	9
Funciones de Glicoconjugados.....	12
Lectinas y Adhesinas.....	14
Lectinas.....	14
Lectina aglutinina de germen de trigo.....	16
Adhesinas.....	17
Bacterias Patógenas y su reconocimiento.....	17
Adherencia bacteriana.....	18
Anti-adherencia.....	19
El Papel de Glicanos .....	19

Alimentos y moléculas de anti-adherencia.....	20
Papel en el reconocimiento.....	22
Investigación de glicoconjugados como moléculas de anti-adherencia.....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	26
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
Objetivos Generales.....	27
Objetivos Particulares.....	27
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	28
Materiales.....	28
Separación de Oligosacáridos de Quitosano.....	28
Síntesis de Glicoconjugados.....	28
Acetilación de Neoglicanos.....	29
Caracterización de Neoglicanos.....	30
Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE).....	30
Cuantificación de Grupos Amino Disponibles.....	30
Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR)...	30
Patrones de emisión de fluorescencia.....	31
Ensayos de Biorreconocimiento.....	31
Lectinoensayos.....	31
Ensayos de reconocimiento con bacterias.....	32
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	33
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	34
Síntesis de Neoglicanos.....	34
Caracterización de Neoglicanos.....	36
Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE).....	36

Cuantificación de Grupos Amino Disponibles.....	40
Patrones de Emisión de Fluorescencia.....	42
Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).	46
Ensayos de Biorreconocimiento.....	46
Lectinoensayos.....	46
Ensayos de reconocimiento con bacterias.....	50
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>56</b>

Hermosillo, Sonora a 29 de julio de 2021.

Asunto: Cesión de derechos

**UNIVERSIDAD DE SONORA  
P R E S E N T E.**

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada Síntesis de Neoglicanos a partir de Albúmina Sérica Bovina y Oligosacáridos de Quitosano para el Análisis de Glicopéptidos Asociados al Reconocimiento Bacteriano, en los sucesivos LA OBRA, realizada como trabajo terminal con el propósito de obtener el Grado de Maestra en Ciencias, en virtud de lo cual autorizo a la Universidad de Sonora (UNISON) para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución, distribución pública, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios de la institución y se integren a los repositorios de la universidad, estatales, regionales, nacionales e internacionales.

La UNISON se compromete a respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA que cometa el suscrito frente a terceros.

**A T E N T A M E N T E**



---

**Gabriela Pérez Chenoweth**



LIC. GILBERTO LEÓN LEÓN  
Abogado General  
UNIVERSIDAD DE SONORA

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, que en cada parte del camino me ayudo.

A mis padres, fui bendecida y lo sigo siendo cada día por ustedes. Gracias por que me ayudaron a llegar hasta aquí. Amor y apoyo incondicional nunca tuvo tanto sentido como en estos últimos años, mi corazón estará siempre agradecido con Dios por ustedes, los quiero mucho. Por cierto, aún no he terminado, pero no sé qué sigue.

También a mi hermana, Graciela (nae), que me soportó, molestó, animó, ayudó a mantener la cordura y un horario de sueño semi-saludable. Quien sea que dijo: “las hermanas se vuelven las mejores amigas, de las que nunca te puedes deshacer y sin importar que pase siempre estarán para ayudarte” no se equivocó y yo tuve mucha suerte contigo, aun cuando no concordamos en tantas cosas.

Un agradecimiento muy especial para mi directora de tesis Dra. Ana Irene Ledesma Osuna que creyó en mí y en mi capacidad para continuar en esta investigación, no estoy segura si hubiese decidido continuar sin su ayuda y ejemplo. Aun después de que mi tiempo como alumna se termine llevaré lo que aprendí de usted a todas partes

Gracias a Dra. Beatriz Montañó, Dra. Luz Vázquez y Dra. Concepción Medina, por aceptar ser parte de mi comité, por ayudar en este trabajo en cada reunión y hacerme sentir que tenía un espacio para mejorar, por cada corrección que me llevo a aprender más y cada comentario con la verdadera intención de apoyar a progresar en mis capacidades como persona en la ciencia y en la investigación.

A mis primas, que no solo por el lazo de sangre también por su amistad, que siempre están allí para escucharme de esto que a veces no me dejaba de dar vueltas en la cabeza, Vianey, Karen, Claudia y Evireth, muchas gracias.

Muchas gracias a mis amigos de casi y más de diez años, la edad no ha podido aun con nosotros, pero tal vez la nostalgia sí. Rea, Diana, Armando, Atza, Raúl, por más cafés (o tés) por venir, gracias por estar allí.



Agradecimientos especiales a Dra. Maritza Álvarez Ainza por su ayuda que fue de gran apoyo para realizar los ensayos de reconocimiento con bacterias, Ana María Guzmán por su ayuda con las técnicas de re-acetilación, a Dra. Gabriela Ramos-Clamont y Q.B. Rosa Idalia Armenta Corral del laboratorio de CIAD por su apoyo durante el análisis de infrarrojo, al maestro César Otero León por su apoyo y disponibilidad en la preparación de soluciones y uso de equipo de laboratorio.

## **DEDICATORIA**

A mi familia. A mi madre, a mi padre y a mi hermana.

Los quiero más de lo que puedo expresar.

## RESUMEN

En los últimos años la falta de regulación en el uso de antibióticos ha contribuido a la resistencia bacteriana. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas profilácticas para su prevención y dentro de éstas, la terapia de anti-adherencia ha generado resultados prometedores. La terapia se basa en la utilización de moléculas con estructura análoga a las que participan en el reconocimiento bacteriano, lo que impide (por competencia) la unión de la bacteria con el hospedero y consecuentemente previene la infección. El objetivo fue sintetizar neoglicanos con la capacidad de interferir en el reconocimiento biológico. Se llevó a cabo la síntesis de neoglicanos por medio de la reacción de Maillard usando albúmina sérica bovina (BSA) y oligosacáridos de quitosano (sin ultrafiltrar, ultrafiltrados y ultrafiltrados re-acetilados) en proporción 1:2 (p/p) y temperatura de 50, 60 y 70 °C por 30 minutos. La caracterización de neoglicanos se realizó por medio de electroforesis SDS-PAGE, cuantificación de grupos amino libres, espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) y patrones de emisión de fluorescencia intrínseca. Además, se realizaron ensayos de reconocimiento con la lectina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés) específica para residuos de N-acetilglucosamina. La caracterización permitió evidenciar la conjugación de oligosacáridos de quitosano con BSA. La mayor glicación se presentó en los neoglicanos obtenidos a 70°C, en los tres grupos de neoglicanos. Los ensayos con la lectina WGA mostraron que los neoglicanos mayormente reconocidos en los tres grupos fueron aquellos obtenidos a 70 °C y sintetizados a partir de oligosacáridos ultrafiltrados y posteriormente re-acetilados. En los ensayos con las cepas de *E. coli* K88+ y *E. coli* K88 ac se observó mayor reconocimiento con neoglicano del grupo con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenido a 50 °C, seguidos por el neoglicano con oligosacáridos ultrafiltrados y re-acetilados obtenidos a 70 °C por la cepa *E. coli* K88+, y neoglicanos obtenidos a 70 °C con oligosacáridos sin ultrafiltrar por la cepa *E. coli* K88 ac. Concluyendo con esto, que, los neoglicanos sintetizados tienen la capacidad de ser reconocidos por cepas de contienen adhesinas de reconocimiento hacia N-acetilglucosamina y glucosamina, esto abre la posibilidad de ampliar la variedad de cepas que se pueden incluir para la terapia de anti-adherencia.

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructuras de glucosa, en forma de cadena abierta (izquierda) y cíclica (derecha) en configuración D. Los grupos hidroxilo se presentan en dos orientaciones ( $\alpha$ y $\beta$ ) siendo la orientación $\beta$ la representada.....	6
2	Procesamiento de N-glicanos en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Abreviaturas: Asn, asparagina; ER, retículo endoplásmico; Fuc, fucosa; Glc, glucosa; Sia, ácido siálico; Gal, galactosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Man, manosa.....	8
3	Primer paso en reacción de Maillard.....	11
4	Funciones de glicoconjugados de la superficie celular.....	13
5	Esquema del efecto de moléculas protectoras de la leche materna. A) Moléculas glicadas unidas a bacterias, B) Bacterias no asociadas a moléculas glicadas siguen su ruta por el tracto gastrointestinal y C) Bacterias que se adhieren al tejido intestinal. Representación en negro corresponde a bacterias patógenas y en blanco a microbiota normal.....	20
6	Estrategias de terapias de anti-adherencia. (A) Inhibir la adherencia al intervenir la biosíntesis de adhesinas, (B) inhibir su correcto ensamblaje o, (C) del ensamblaje de receptores de células de un hospedero, (D) Impidiendo la unión por un reemplazamiento competitivo dirigido a recetores de las células o (E) de las bacterias, (F) uso de moléculas de gran peso molecular o microorganismos específicos o (G) uso de anticuerpos.....	23
7	Geles de electroforesis SDS-PAGE, en donde se encuentran A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos sin filtrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C en B) BSA-OUF los neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, y en C) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados a 50, 60 y 70°C.....	37
8	Patrones de emisión de fluorescencia de neoglicanos obtenidos. Espectros de A) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos-ultrafiltrados y re-acetilados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a	

	50, 60 y 70°C y C) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos sin filtrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C. ....	43
9	Espectros de Infrarrojo correspondientes a A) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrado y re-acetilados obtenidos a 50, 60 y 70 °C y B) BSA-OUF, neoglicano con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrado obtenido a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFAC, neoglicano con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados.....	47
10	Ensayos de reconocimiento por la lectina de germen de trigo (WGA). Los tratamientos se encuentran como A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados y como control positivo el neoglicano comercial de albumina sérica bovina con triacetilglucosamina. ....	49
11	Ensayos de reconocimiento de A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados con <i>Escherichia coli</i> K88 ac.....	51
12	Ensayos de reconocimiento de A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados con <i>Escherichia coli</i> K88+.....	53

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Concentración proteica obtenida por método de Bradford de neoglicanos obtenidos .....	35
2	Masas moleculares calculadas a partir de la migración en electroforesis SDS-PAGE .....	39
3	Grupos amino disponibles de los neoglicanos a obtenidos a diferentes temperaturas .....	41
4	Cambios en la intensidad de fluorescencia de neoglicanos con oligosacáridos de quitosano.....	45

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a antibióticos por parte de bacterias patógenas representa un incremento en la morbilidad y mortalidad de la población, lo que constituye una amenaza de salud pública a nivel mundial (Oteo y Aracil, 2015). Dicha resistencia es debida primordialmente a la utilización excesiva de antibióticos (Huttunen *et al.*, 2016), por consiguiente, la necesidad de estudiar nuevas opciones para combatir las enfermedades causadas por microorganismos es cada vez mayor.

La búsqueda de alternativas al uso de antibióticos ha llevado a la investigación de moléculas capaces de prevenir las infecciones. Para ello, es necesario conocer la manera en que las bacterias patógenas actúan. En este contexto, el reconocimiento de la bacteria hacia estructuras específicas en el huésped es el primer paso necesario para la colonización del hospedero y posterior desarrollo de la infección (Huttunen *et al.*, 2016). El bloquear este reconocimiento se considera como una de las opciones viables para impedir que la enfermedad tome lugar. Esta estrategia es conocida como terapia antiadherente y en ella se emplean moléculas que juegan un papel importante en el reconocimiento de patógenos, como lo son las moléculas de superficie que son reconocidas por los patógenos, así como las lectinas bacterianas (adhesinas) que reconocen estas moléculas de superficie. Sin embargo, debido a su complejidad estructural, la investigación y desarrollo para su utilización representa un reto (Novotny *et al.*, 2013; Sharon, 2006).

La terapia antiadherente, también llamada glicoterapia, se ha propuesto para prevenir la interacción de lectinas bacterianas con los glicoconjugados del hospedero. Esta estrategia propone la síntesis de glicoproteínas o glicolípidos denominados neoglicanos, los cuales son evaluados con la finalidad de comprobar su participación en la inhibición de la adhesión bacteriana. Los neoglicanos en las terapias de antiadherencia por sí solos han creado una nueva área de investigación, no solo por ser una estrategia novedosa sino por las múltiples formas de poder ser utilizada y los beneficios potenciales al compararlos con los antibióticos utilizados actualmente (Sattin y Bernardi, 2016).

Las ventajas de la terapia antiadherente sobre el uso convencional de antibióticos son principalmente que los neoglicanos no contribuyen al ciclo de multiresistencia de las bacterias involucradas, tampoco se espera se desarrolle toxicidad o reacción inmunológica por ser moléculas con estructuras similares a las presentes en el hospedero y por lo tanto que no se reconozcan como extrañas (Krachler y Orth, 2013). La terapia antiadherente se ha estudiado en cepas de *E. coli* causantes de infecciones (Asadpoo et al., 2021; Grange et al., 2002). Esta estrategia de control ha sido posible al elucidar las estructuras oligosacáridas que son reconocidas específicamente por cada variante de *E. coli*, identificando además las secuencias de carbohidratos presentes en las células blanco y que son susceptibles de ser reconocidas (Sharon, 2006; Arnaud et al., 2013; Krachler et al., 2013).

Se ha reportado que adhesinas fimbriales de *E. coli* reconocen estructuras con glucosamina y N-acetilglucosamina (Dubreil et al., 2016; Mouricout et al., 1990). Adicionalmente, se ha reportado que estructuras con N-acetilglucosamina también están presentes en secuencias que son reconocidas por bacterias de *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus suis* (Sharon, 2006), bacterias patógenas causantes de diversas infecciones que afectan la salud del hospedero (Saarela et al., 1995).

La fuente más abundante de N-acetilglucosamina en la naturaleza proviene de la quitina (Abraham, 2004) sin embargo, a mayor peso molecular y grado de acetilación de este polímero, la solubilidad es menor, lo que dificulta el poder utilizarlo para la síntesis de neoglicanos. La utilización de quitosano (polisacárido de N-acetilglucosamina parcialmente acetilado) para la síntesis de neoglicanos de interés y la posterior re-acetilación de los mismos, representa una alternativa viable debido a su solubilidad en soluciones acuosas. Lo anterior representa una estrategia viable para la obtención de moléculas con la capacidad de ser reconocidas por lectinas bacterianas pertenecientes a cepas de *E. coli*, y con la posibilidad de ser utilizadas en la terapia antiadherente para diversas bacterias.



# REVISIÓN BIBLIGRÁFICA

## Glicobiología

La glicobiología es una ciencia relativamente nueva que se encarga de estudiar los glicanos, es decir los carbohidratos y polisacáridos tanto libres como unidos a moléculas más complejas. Esta área incluye la química de carbohidratos, síntesis, modificaciones a su estructura, degradación de glicanos y el análisis de su función en sistemas biológicos. Los glicanos pueden estar unidos a proteínas y son llamados glicoproteínas, o unidos a lípidos denominados glicolípidos; siendo las glicoproteínas, las más abundantes en la naturaleza (von der Lieth *et al.*, 2006; Varki *et al.*, 2015).

El estudio de estas moléculas debe tener en consideración las dificultades que conlleva su investigación ya que los glicoconjugados son de gran complejidad y diversidad estructural debido a las diferentes uniones que pueden presentarse entre los carbohidratos que los componen, las cuales se encuentran de forma natural en muchos organismos vivos (Varki *et al.*, 2015).

Los glicanos que se encuentran en las membranas celulares pueden estar unidos tanto a proteínas como a lípidos transmembranales, y no solo su diversidad de secuencias es un contribuyente a la dificultad de su estudio, sino, también al hecho de ser parte de la glicocálix el cual debido a su interacción con otras células o patógenos cambia constantemente (Verbet y Cacan, 2001). A diferencia del estudio de las proteínas y ácidos nucleicos, el estudio de la estructura de los glicoconjugados por medio de la genética no es sencilla debido a que ésta juega solo un papel parcial en la determinación de su estructura. La glicómica estudia la expresión del glicoma en las células e intenta elucidar el catálogo de glicosiltransferasas requeridas para que las estructuras glicosiladas se presenten en un organismo (von der Lieth *et al.*, 2006).

En comparación con la importancia dada a otras moléculas encontradas en alimentos y en organismos vivos, los glicanos han sido estudiados principalmente desde el punto

de vista químico y metabólico, sin tener en cuenta su papel en las funciones biológicas en las que participan (Varki *et al.*, 2015).

### **Estructura de Glicoconjugados**

En la naturaleza, los glicoconjugados son de diferentes tipos. Como su nombre lo sugiere se trata de moléculas conjugadas, entre las que se encuentran los glicolípidos y las glicoproteínas principalmente. En el caso de glicolípidos, se conforman por una parte lipídica y una parte de glicanos, mientras que las glicoproteínas están compuestas por una parte proteica a la cual se unen los glicanos, estas moléculas generalmente se encuentran presentes en la membrana celular y en algunos casos también como moléculas extracelulares (Costa 2017; Ha y Bhagavan, 2011).

En este caso las moléculas de interés son las glicoproteínas, donde tenemos proteínas o péptidos, los cuales se encuentran unidos a glicanos, por enlaces covalentes que pueden ser de dos tipos; uniones tipo O (uniones por medio oxígeno) y uniones tipo N (uniones por medio de nitrógeno) (Ha y Bhagavan, 2011).

Dentro de las uniones de carbohidratos con proteínas existen dos clases, proteoglicanos y glicoproteínas. Los proteoglicanos son moléculas que tienen un alto contenido de glicanos en comparación a glicoproteínas donde la unión de carbohidratos en la proteína es menor. Las glicoproteínas son de estructura muy diversa, la cual es determinada por las moléculas que las conforman, por ello es importante conocer la estructura de ambas moléculas, ya que éstas determinarán la función biológica de la glicoproteína resultante (Costa, 2017; Ha y Bhagavan, 2011).

La parte proteica de las glicoproteínas está determinada por los diferentes aminoácidos que la constituyen. Las secuencias de proteínas pueden estar conformadas de 20 aminoácidos diferentes. La secuencia primaria determina las propiedades de la molécula total, por ejemplo, su solubilidad, su estabilidad, la estructura tridimensional y los sitios disponibles para unión a glicanos (Voet y Voet 2007; Varki *et al.*, 2015). Mientras que a la porción compuesta por carbohidratos se le

atribuyen características propias de estas estructuras. Los carbohidratos presentan múltiples grupos funcionales como hidroxilo, aldehídos o cetonas, estando estos presentes en la configuración D (Figura 1), refiriéndose a la orientación espacial del grupo hidroxilo de su carbono anomérico, esta forma es la que se encuentran en la naturaleza (Tymoczko, 2007).

Los carbohidratos tienen diversas características que los distinguen de los ácidos nucleicos y proteínas. Pueden ser moléculas ramificadas y esto es debido a que pueden unirse entre monómeros de diversas maneras, ya que los grupos hidroxilos presentes pueden formar enlaces glicosídicos entre los distintos hidroxilos de otro monómero dando como resultado oligosacáridos o polisacáridos con gran variabilidad estructural (Tymoczko, 2007; York, Kochut y Miller, 2010). Aunado a ello, los carbohidratos, al formar los enlaces glucosídicos, pueden tomar la conformación alfa ( $\alpha$ ) o beta ( $\beta$ ), del carbón anomérico (Cohen y Varki, 2014; York *et al.*, 2010).

La función biológica que tienen los glicanos o carbohidratos en las estructuras complejas que forman parte en las células de los diferentes organismos, no ha sido completamente elucidada. Aunque, aun no es conocida alguna excepción donde los glicanos no formen parte de la estructura de superficies celulares, la investigación sobre sus funciones continúa. Por su arreglo tan diverso en las superficies celulares, su elucidación es compleja. Además, en un organismo se pueden llevar a cabo cambios en la glicación de proteínas ya sintetizadas y funcionales, generando cambios estructurales y en su funcionalidad. Como es el caso de las hemoproteínas, donde la glicación de éstas determina si son capaces de transportar oxígeno o no (Stein y Briken, 2010; Tang *et al.*, 2020). Sin embargo, a pesar de las dificultades que esto presenta, el continuo estudio de estas moléculas en conjunto con nuevas herramientas de investigación, como la espectrometría de masas, ha llevado a la elucidación de las estructuras que se encuentran presentes en las células (von der Lieth *et al.*, 2006; Varki *et al.*, 2015).

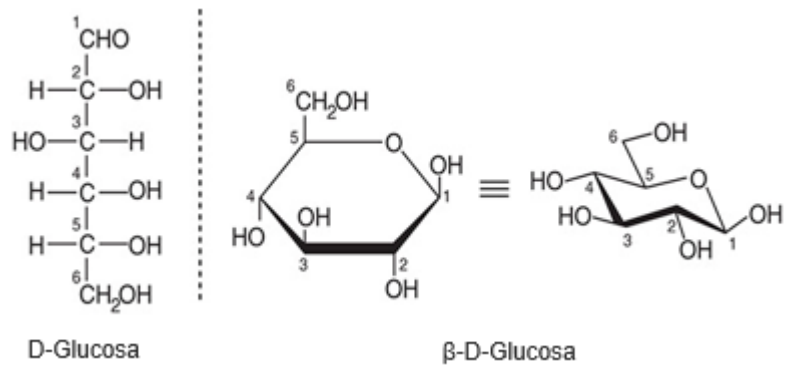


Figura 1. Estructuras de glucosa, en forma de cadena abierta (izquierda) y cíclica (derecha) en configuración D. Los grupos hidroxilo se presentan en dos orientaciones ( $\alpha$  y  $\beta$ ) siendo la orientación  $\beta$  la representada.

Fuente: Varki *et al.*, 2015

## Biosíntesis de glicoproteínas

La biosíntesis de glicoconjugados se da mediante glicosilación enzimática de proteínas. El mecanismo es similar a un sistema sustrato-aceptor, un proceso complejo que se da por competencia de sustratos por las enzimas glicosiltransferasas y glicosilhidrolasas. Durante la biosíntesis, la adición de monómeros se da por la presencia de las enzimas catalizadoras, glicosiltransferasas, las cuales reconocen específicamente el glicosil sustrato-donador (nucleótidos de carbohidratos) y el glicosil sustrato-aceptor, del glicano parcialmente sintetizado. Estas enzimas tienen sitios celulares específicos, como lo son el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico (ER), en donde se lleva a cabo este proceso (Figura 2).

La unión de los glicanos a las proteínas ocurre en estos organelos secuencialmente, después de que la proteína es codificada en el ribosoma. Primeramente, en el retículo endoplásmico se da la adición de glicanos a las proteínas, lo cual inicia con la transferencia de la base de  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  (nueve moléculas de manosa, dos de acetilglucosamina y tres de glucosa), procedentes de un donador glicosil, hacia un polipéptido por acción de una oligosacariltransferasa en un sitio de glicación definido por una secuencia específica de aminoácidos asparagina-X-treonina/Ser (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina). Posteriormente en el aparato de Golgi se lleva a cabo una modificación de los glicanos ya unidos a la proteína, esto en los residuos de glicanos expuestos, conservando la base  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , las estructuras resultantes pueden variar dependiendo de la disponibilidad de glicanos que tengan las enzimas durante la síntesis. Todo este proceso da como producto final glicoproteínas maduras y listas para ser transportadas al lugar donde ejercerán su función (Cao *et al.*, 2018; Meng *et al.*, 2018; Stanley, Schchter y Taniguchi, 2009; York *et al.*, 2010).

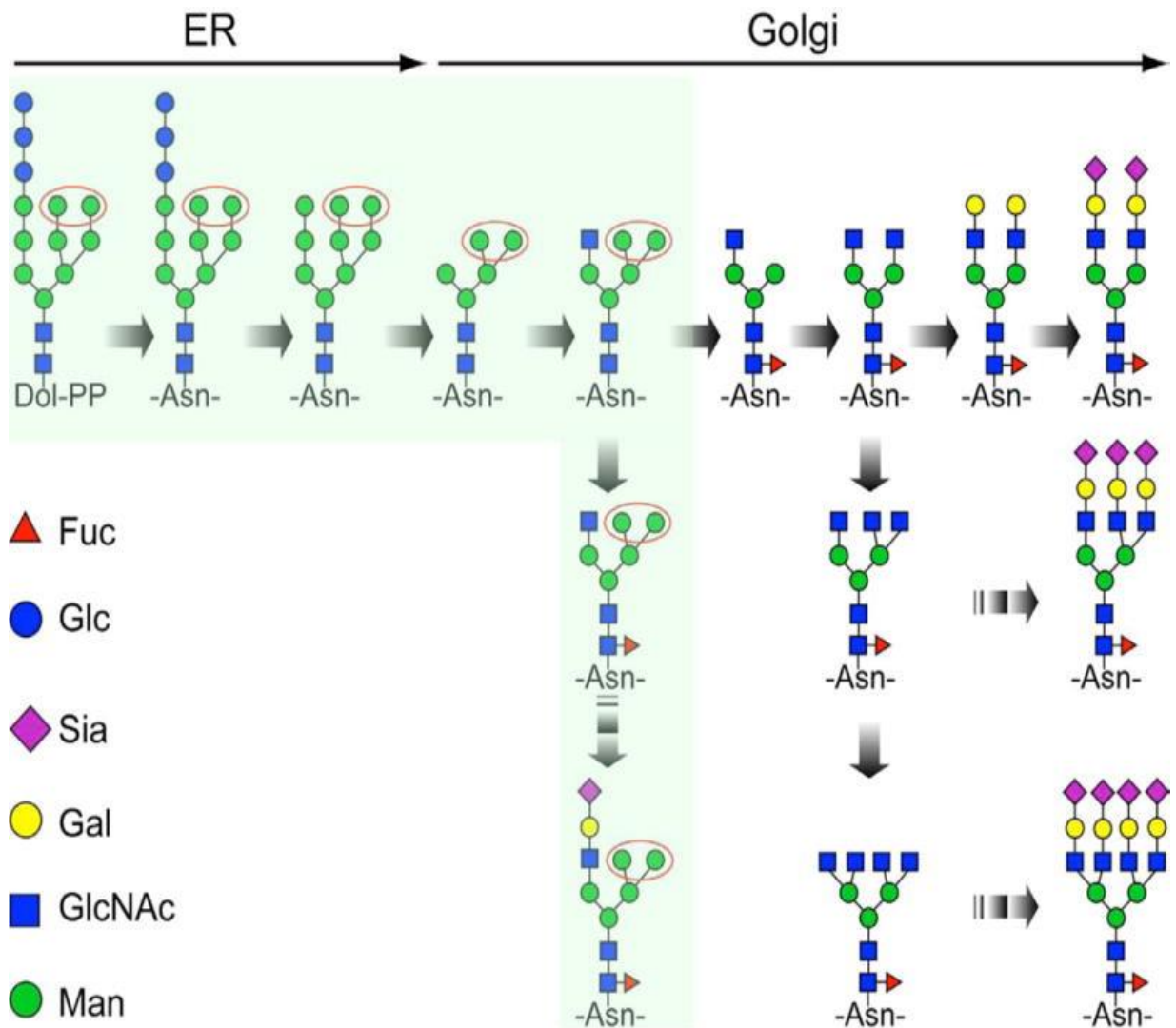


Figura 2. Procesamiento de N-glicanos en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Abreviaturas: Asn, asparagina; ER, retículo endoplásmico; Fuc, fucosa; Glc, glucosa; Sia, ácido siálico; Gal, galactosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Man, manosa.

Fuente: Cao *et al.*, 2018.

La modificación de proteínas por medio de la glicosilación con glicanos complejos es frecuente en la síntesis post-traslacional de proteínas en células eucariotas y estas modificaciones tienen influencia sobre la estructura y función general de las glicoproteínas. Aunado a ello, tienen efecto sobre la localización, señalización, tiempo de vida y proteólisis de las mismas. Esto es importante debido a que alrededor del 50% del total de las proteínas humanas, son glicosiladas. Cada célula conocida en un organismo está cubierta por glicanos, lo cual sugiere que el glicoma es esencial para la vida (Cohen y Varki, 2014; Saraswathy *et al.*, 2011; Struwe y Robinson, 2019; York *et al.*, 2010).

El papel que realizan los glicanos que forman parte de las estructuras de glicoconjugados, es específico. El cambio en la estructura del carbohidrato puede generar una diferencia sobre la funcionalidad de la molécula de la cual forman parte. La adición de glicanos sobre una proteína se denomina macroheterogeneidad. Mientras que el rango de estructuras de glicanos disponibles que existen en un solo sitio de glicosilación es determinado como microheterogeneidad (Struwe y Robinson, 2019).

La glicosilación de proteínas es necesaria para el correcto plegamiento de proteínas, en caso de que no se lleve a cabo de forma correcta o se vea inhibida, da como consecuencia la agregación y degradación de la misma (Saraswathy *et al.*, 2011).

### **Síntesis de Neoglicoconjugados**

La síntesis de glicoconjugados fuera de la célula utilizando como base un organismo o enzimas es costosa y compleja, debido principalmente a la baja disponibilidad comercial y a los elevados costos de las enzimas transferasas y azúcares nucleótidos necesarios. Este factor debe considerarse ya que podría disminuir su factibilidad, lo cual también contribuiría a la posibilidad de generar poco interés para ser implementada en un futuro (Meng *et al.*, 2018; Varki, 2009).

La síntesis de esta clase de moléculas que logren tener función biológica puede presentar inconvenientes ya que los epítopes de reconocimiento en cada tipo de patógeno son diferentes, aunado a la gran variedad de glicanos existentes en la superficie celular y a que contribuyen a la complejidad de la interacción entre patógeno y célula (Palaniappan y Bertozzi, 2016).

Existen métodos de síntesis conocidos y estudiados para la obtención de glicoproteínas, con el fin de utilizarlas como moléculas de anti-adherencia, entre ellas se encuentran la síntesis no enzimática o reacción de Maillard. Esta reacción se presenta comúnmente durante el procesamiento térmico de alimentos. El mecanismo de esta reacción consiste en una serie de reacciones reversibles en las primeras etapas, en las que interviene un grupo amino (de la proteína, siendo el residuo lisina más comúnmente usado) y un azúcar reductor (Figura 3). La unión del carbonilo del azúcar con la amina de la proteína forma una base de Schiff. Después de esto, se da un reacomodo que da como resultado lo que se conoce como producto de Amadori. En una matriz alimenticia la reacción avanza hasta la obtención de productos finales de glicación debido a la complejidad de la misma y a la presencia de grupos carbonilos y aminas que continúan retroalimentando la reacción.

En el contexto de moléculas de anti-adherencia se considera que este tipo de síntesis puede llevarse a cabo de manera controlada mediante el establecimiento de las condiciones de reacción que conduzcan a la formación de los productos deseados (Fayle *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009).

Existe información que sustenta la capacidad de reconocimiento por parte de lectinas y adhesinas bacterianas hacia neoglicanos sintetizados a través de la reacción de Maillard, por lo que la terapia de anti-adherencia utilizando este método de síntesis es factible (Colombo, Pitirollo y Lay, 2018; Cozen y Read, 2012; Huttunen *et al.*, 2016; Sharon, 2006).



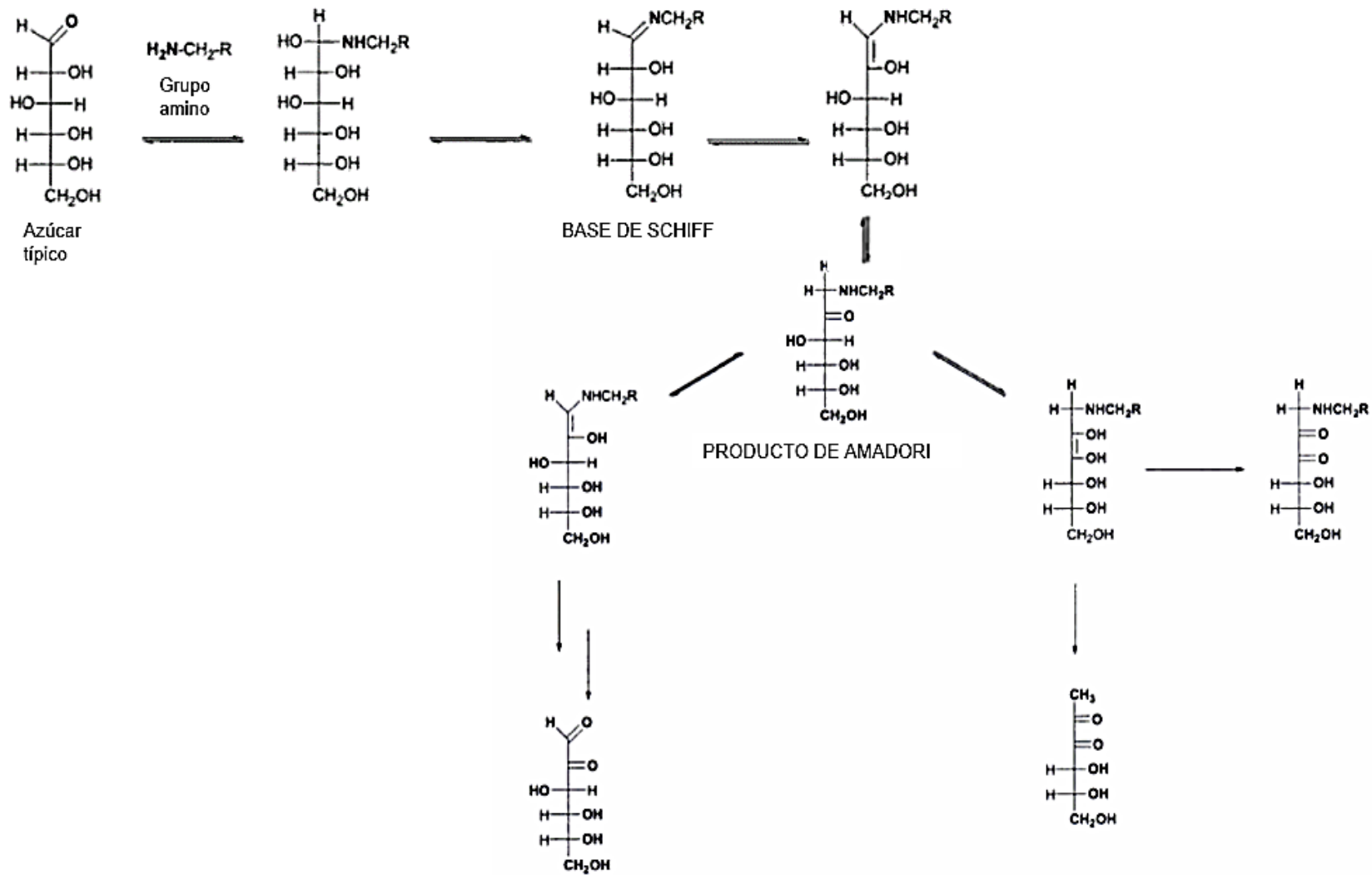


Figura 3. Primer Paso en reacción de Maillard

Fuente: Fayle *et al.*, 2002

## Funciones de Glicoconjugados

Las funciones que los glicoconjugados pueden llevar a cabo son muy diversas. Una de las más comúnmente conocidas es la de soporte, ya que gran variedad de glicoproteínas y glicolípidos se encuentran como moléculas transmembranales. Además, debido a que los glicanos forman parte de la superficie celular, las interacciones entre las células y otro tipo de reconocimientos biológicos se dan generalmente a través de la interacción de estructuras de glicanos (Figura 4), como por ejemplo el reconocimiento de anticuerpos, unión a patógenos, adherencia celular, interacciones entre células y señalización (Cohen y Varki, 2014; Varki *et al.*, 2015).

En una sola célula puede percibirse una gran biodiversidad química y estructural en la que están involucradas una variedad de funciones (Verbert y Cacan, 2001). Problemas en la síntesis de glicoconjugados, se verán reflejados en una deficiencia o en la pérdida de la capacidad de llevar a cabo su función (Cao *et al.*, 2018).

Un papel importante que tienen los glicanos es en el reconocimiento de patógenos debido a que las estructuras de carbohidratos son las que son susceptibles de ser reconocidas por los patógenos. Esta unión es necesaria para que los microorganismos se adhieran, reproduzcan, proliferen en las células blanco y la infección se lleve a cabo (Pereira y Giugliano, 2013; Sharon y Ofek, 2000; Verbert y Cacan, 2001).

Las moléculas en la superficie de microorganismos patógenos son capaces de reconocer diferentes secuencias de glicanos en la superficie de células llamadas glicoeptótopes, los cuales son diferentes dependiendo del microorganismo (Sarabia-Sainz *et al.*, 2009). Por esto, encontrar una molécula con una estructura específica que tenga la capacidad de impedir la adherencia para un patógeno en particular es parte de la complejidad en la investigación sobre esta clase de moléculas.

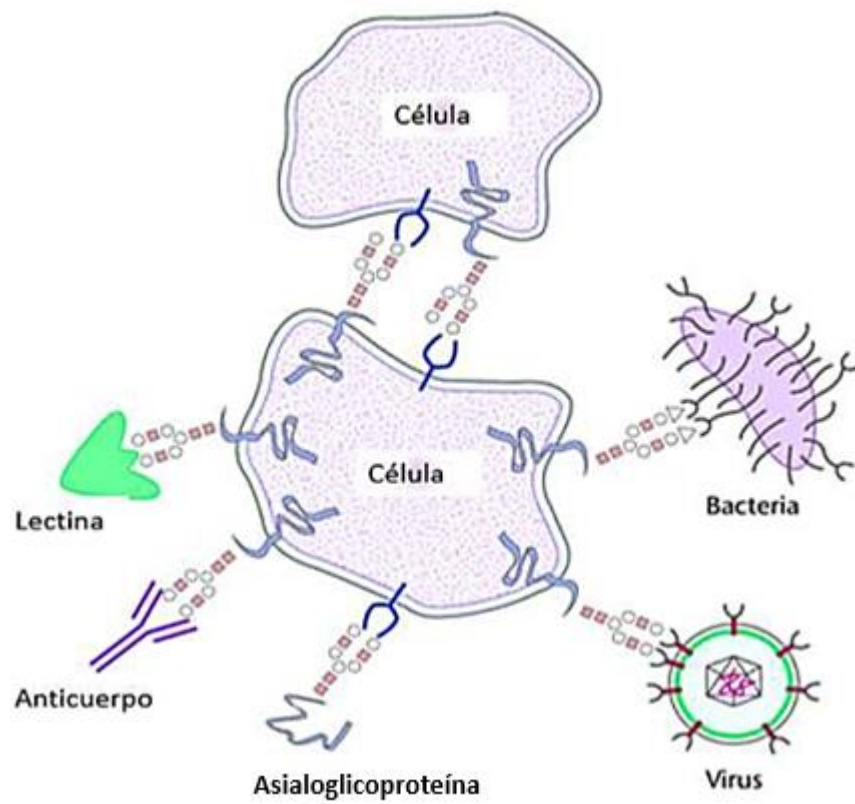


Figura 3. Funciones de los glicoconjugados en la superficie celular.  
Fuente: Verbert y Cacan, 2001.

## Lectinas y Adhesinas

En el reconocimiento entre células y patógenos, existen dos moléculas importantes que toman lugar para que este suceso se lleve a cabo, las moléculas también pueden ser denominadas ligando y receptor. Como receptores tenemos a las adhesinas o lectinas, siendo aquellas moléculas expuestas en la superficie de bacterias que interaccionan de manera específica con ligandos (Figura 4). En este caso en particular, los ligandos son carbohidratos, también llamados glicanos, presentes en los glicoconjugados de la superficie de las células de un hospedero (Cegelski, Smith y Hultgren, 2019; Nilsson, 2007).

Para un gran número de bacterias, la forma por la cual se da la adhesión es por medio de las fimbrias (apéndices formados por proteínas y tienen función de adhesión). En la parte final de las fimbrias se encuentran las adhesinas que son un tipo de lectinas que interaccionan con carbohidratos y otros componentes presentes en la superficie de la célula del hospedero (Douëllou, Montel y Sergentet, 2017; Saeedi *et al.*, 2017).

### Lectinas

Se les denominan lectinas a las proteínas o glicoproteínas con la capacidad de reconocer carbohidratos de una manera reversible y específica. Las lectinas son moléculas ubicuas, y hasta la fecha han sido identificadas en microorganismos, animales y plantas. Esta clase de moléculas son importantes en el reconocimiento de muchos patógenos. La gran diversidad de secuencias de carbohidratos presentes en las superficies celulares es un factor que permite evidenciar la importancia de las lectinas y que explica la gran diversidad que existe de las mismas (Kirmiz, Chu y Lebrilla, 2007; Nikitina, Loshchinina y Vetchinkina, 2017; Yang y Hancock, 2004).

Las lectinas son clasificadas de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que los componen, por la especificidad hacia carbohidratos, su ubicación y en las propiedades bioquímicas que poseen. Dentro de la clasificación de las lectinas presentes en

animales se encuentran las de tipo C, S y P. Las lectinas de tipo P están formadas por cinco unidades peptídicas que se unen a lipopolisacáridos de bacterias, e interaccionan con células del sistema inmune. Las lectinas de tipo S son conocidas por su capacidad de unión a galactósidos y ayudan en el proceso de inflamación. Las lectinas de tipo C son una clase abundante que se encuentra constituida por un gran número de subtipos, dentro de la cual se encuentra la lectina de unión a manosa. Las lectinas tipo C requieren de calcio para lograr unirse a carbohidratos y tienen en común un dominio homólogo de 120 aminoácidos el cual es responsable de la unión a ligandos (Berg, Tymoczko y Stryer, 2007; Coelho *et al.*, 2014; Tizard, 2009).

Las lectinas aún no están totalmente caracterizadas, aquellas que se encuentran en plantas son el grupo que ha sido mayormente estudiado, sin embargo, la elucidación estructural que se ha hecho a la fecha es solo de una fracción de la gran diversidad que se encuentra en la naturaleza (Nilsson, 2007). Desde el conocimiento de la existencia de las lectinas su estudio se ha centrado sobre su capacidad de reconocer carbohidratos, o secuencias de glicanos. Estudios sobre este tema se han llevado a cabo por ensayos de aglutinación, ya que la unión entre lectinas y carbohidratos se ve evidenciada por la formación de un precipitado (Irish, Maenz y Classen, 1999). Los estudios para evaluar la especificidad de las diferentes lectinas hacia carbohidratos específicos se han realizado desde dos perspectivas; una de ellas es evaluando la unión hacia monómeros, donde se ha observado que la unión es generalmente débil y la otra es hacia secuencias de carbohidratos lo que generalmente produce una mayor afinidad de reconocimiento. Esto indica que de manera general las lectinas presentan mayor capacidad de formar interacciones con glicanos complejos donde existe la posibilidad de un mayor número grupos químicos expuestos para interaccionar, como dímeros, trímeros, etc. (Nilsson, 2007).

Las lectinas son ubicuas en organismos vivos y se encuentran no solo en cantidades importantes sino también que existe gran diversidad de ellas. Se han utilizado como herramientas en investigación, siendo aquellas obtenidas de plantas las mayormente utilizadas para diferentes clases de estudios. Por ejemplo, se han utilizado para el

análisis estructural y fisiológico de células, tejidos, microorganismos patógenos, entre otros. Asimismo, se usan para estudiar glicoconjugados extracelulares y en técnicas más recientes para el estudio de microarreglos de carbohidratos (van Buul y Brouns, 2014; Coelho *et al.*, 2014; Mislovičová *et al.*, 2009)

Por otra parte, se ha estudiado el consumo de productos alimenticios con contenido de lectinas, aunque en mucha menor proporción en comparación al contenido de carbohidratos. Las lectinas se pueden encontrar en granos de cereales, diversas frutas, legumbres, etc., los cuales generalmente son parte de la dieta alimenticia. Se ha observado que el consumo ocasional de lectinas está relacionado con una protección hacia enfermedades como diabetes y cáncer, sin embargo, se ha planteado que la información disponible no es suficiente. Primeramente, no se conoce con exactitud la concentración de lectinas presentes en el alimento posterior al procesamiento y, por otro lado, algunas lectinas han demostrado afectan la absorción de algunos nutrientes, por lo que es necesario investigar estos aspectos mediante pruebas *in vivo* (Afrin y Ikai, 2014; van Buul y Brouns, 2014).

#### Lectina del germen de trigo

La lectina del germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés) está presente en la planta de trigo, *Triticum vulgare*. Al igual que todas las lectinas es de origen no inmunológico y es una proteína homodímera, esto es, dos subunidades iguales, cada una compuesta por 117 residuos de aminoácidos, en los cuales se encuentran los dominios de unión a carbohidratos. En cada subunidad se encuentran múltiples sitios de unión a N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico, de los cuales ocho corresponden a sitios específicos para unión de GlcNAc (Afrin y Ikai, 2014; Kumari *et al.*, 2016).

En la naturaleza, las lectinas tienen un papel importante en el fenómeno biológico de reconocimiento, y en las plantas esta función está relacionada con la capacidad de protegerla ante patógenos externos. Lo cual está asociado a interacciones con glicanos de superficie. Por lo que, en investigación, la lectina WGA se ha utilizado para evidenciar diferencias en la expresión de carbohidratos en la superficie celular de

distintos tejidos, como herramienta en el análisis de malformaciones o alteraciones morfológicas de células que indica la presencia de células malignas en el sitio de estudio, por ejemplo, en sangre (Afrin y Ikai, 2014; van Buul y Brouns, 2014).

## **Adhesinas**

Las adhesinas (lectinas bacterianas) son moléculas con estructuras complejas que se encuentran en la superficie bacteriana, comúnmente presentes en apéndices filamentosos denominados fimbrias o pili, aunque también puede haber adhesinas no fimbriales. Las fimbrias están conformadas por apéndices celulares que varían en su longitud y diámetro. En algunos casos, las adhesinas asociadas a un tipo de fimbrias pueden tener diferente especificidad de receptor (Soman *et al.*, 2015). Los tipos de adhesinas presentes también pueden variar dependiendo de la naturaleza de la bacteria, si es Gram positiva o Gram negativa. Por ejemplo, en el caso de bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* presentan adhesinas en forma de fimbria, donde la adhesina responsable de la unión a tejido de un hospedero se encuentra al final de esta estructura fimbrial (Patel, Mathivanan y Goyal, 2017).

Las adhesinas están asociadas al reconocimiento bacteriano, teniendo como función principal la de servir como lectina, es decir reconocer moléculas de carbohidratos de los glicoconjugados de la superficie celular de un hospedero, para la supervivencia de la bacteria. La adherencia es una de las primeras etapas para iniciar un proceso de infección, debido a ello, es considerada como un factor que facilita la invasión bacteriana. Las adhesinas además de ser determinantes en la patogenicidad también son de suma importancia en el proceso de reconocimiento inicial (Hallstrom y McCormick, 2015; Nash, Dalziel y Fitzgerald, 2015).

## **Bacterias patógenas y reconocimiento**

El reconocimiento de bacterias puede involucrar interacciones no específicas entre el receptor y la adhesina. Como primeras interacciones no específicas se pueden

encontrar las hidrofóbicas o de cargas, que se presentan entre las adhesinas de los patógenos y las moléculas de la superficie celular en las células blanco, sirviendo como primer contacto entre ambas partes. Después se continúa con la unión específica por medio del reconocimiento de los carbohidratos presentes en las superficies celulares del hospedero y las adhesinas de la bacteria, esto con la finalidad de permitir a la bacteria adherirse al tejido de tal manera que le permita sobrevivir y reproducirse (Soman *et al.*, 2015).

### Adherencia bacteriana

La unión de las bacterias a los receptores del hospedero es un mecanismo mediado por adhesinas fimbriales o adhesinas afimbriales. Las adhesinas se comportan como lectinas, reconociendo residuos oligosacáridos de glicoproteínas o glicolípidos. Las adhesinas presentes en la punta de la fimbria bacteriana son las que dirigen la alta afinidad de reconocimiento hacia los receptores de un hospedero (Bouguénec, 2005).

La capacidad de adherirse a los tejidos de un hospedero es una característica importante de *Escherichia coli*, y de otros patógenos, lo cual es debido al número y diversidad de adhesinas presentes en su superficie. La habilidad de adherencia es una determinante para que una bacteria logre colonizar, además de que le ayuda a su supervivencia ante la defensa mecánica del hospedero, es decir, la peristalsis, y resistencia en un ambiente de flujo (Bouguénec, 2005; Saeedi *et al.*, 2017; Westerlund-Wilsrtröm y Korhonen, 2005).

Si bien las fimbrias son morfológicamente indistinguibles, éstas son estructuras heteropoliméricas que pueden estar presentes cientos de copias de las mismas en las bacterias. Las estructuras proteicas a lo largo de la fimbria pueden presentar diferencias estructurales. Las subunidades proteicas a las que se atribuyen diferencias en reconocimiento son las adhesinas, pudiendo estar localizadas en la punta del filamento o a lo largo del mismo (Soman *et al.*, 2015; Westerlund-Wilsrtröm y Korhonen, 2005).



## Anti-adherencia

### El papel de glicanos

Como ya se mencionó, para que la adherencia se lleve a cabo es necesaria la presencia de glicanos de superficie celular para ser reconocidas por lectinas bacterianas. Se ha propuesto que moléculas con estructuras de oligosacáridos específicos, que puedan cumplir la función de molécula simuladora de superficie celular, de manera competitiva por sitios de unión (Asadi *et al.*, 2017; Douëllou *et al.*, 2017). Las estrategias de bloqueo de la adhesión pueden ser efectivas en la prevención de infecciones microbianas tanto en animales como en humanos (Soman *et al.*, 2015; Douëllou *et al.*, 2017). Aunque la mayoría de las bacterias y hongos patógenos tienen diferentes adhesinas, estudios sobre la adherencia demuestran que al intervenir con la interacción de un receptor específico es suficiente para prevenir la infección (Douëllou *et al.*, 2017).

En su mayoría, las glicoterapias utilizan proteínas N-glicosiladas e incluyen anticuerpos monoclonales, hormonas, factores de crecimiento y vacunas; por lo que se espera que la industria biofarmacéutica siga utilizando moléculas similares, tomando en consideración las grandes retribuciones económicas por la utilización de estas moléculas como un nuevo fármaco o suplemento competitivo, innovador y que pueda actuar como profiláctico. La importancia de la glicosilación en las proteínas es evidenciada por las enfermedades que se presentan a raíz de deficiencias en los patrones de glicosilación de las diferentes glicoproteínas. Como ejemplos de esto se encuentran diferentes tipos de cánceres, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, el envejecimiento y muchas más (Struwe y Robinson, 2019).

Para la implementación de glicoterapias, es importante incrementar el conocimiento que se tiene de los glicanos presentes en moléculas glicosiladas en los organismos vivos. Es decir, es necesario emplear la glicómica para el estudio y caracterización de este tipo de moléculas diversas, con la finalidad de obtener información sobre la

estructura de los glicoconjugados y poder relacionarla con la función para la cual se sintetizan (Sattin y Bernardi, 2016).

### **Componentes en los alimentos con propiedades de Anti-adherencia**

Existe evidencia científica de que algunos componentes presentes en alimentos tienen la capacidad de impedir la adherencia de bacterias a sus receptores. Está ampliamente documentado que el consumo de leche materna en recién nacidos presenta una capacidad protectora ante patógenos. Se investigó acerca de los componentes presentes que cumplían con esta función y se encontró que dentro de estos componentes se encuentran ciertos oligosacáridos, glicoproteínas y glicolípidos presentes en la leche (Sharon y Ofek, 2000; Douëllou, et al., 2017; Pereira y Giugliano, 2013). La protección ante organismos patógenos por la presencia de moléculas de la leche materna se da por competencia de unión y obstaculización del reconocimiento de los organismos patógenos, como se muestra en la Figura 5. La presencia de componentes naturales de tipo carbohidrato en los alimentos con propiedades anti-adherentes sugiere que esta clase de moléculas podrían cumplir con una función de competencia para bacterias y otros patógenos al adherirse a estas moléculas y no al sitio de reconocimiento en células blanco (Douëllou *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). De manera similar a la leche materna, diversas moléculas con estructuras de oligosacáridos que se encuentran presentes en los alimentos han sido aisladas y se ha demostrado su efecto en la protección contra infecciones bacterianas en estudios *in vitro*. Hasta hoy, se han encontrado compuestos con estos efectos preventivos en diferentes alimentos como arándanos, café, té, vino y plátano. De manera particular, los arándanos, se han estudiado ampliamente y se ha comprobado la eficacia del consumo de jugo de arándanos de manera regular en la prevención de infecciones en vías urinarias (Soman *et al.*, 2015; Asadi *et al.*, 2019; Struwe y Robinson, 2019).

Los suplementos dietarios pueden ser extraídos y utilizados como agentes de anti-adhesión, aunque la manera en la que actúan no está claramente elucidada, se piensa

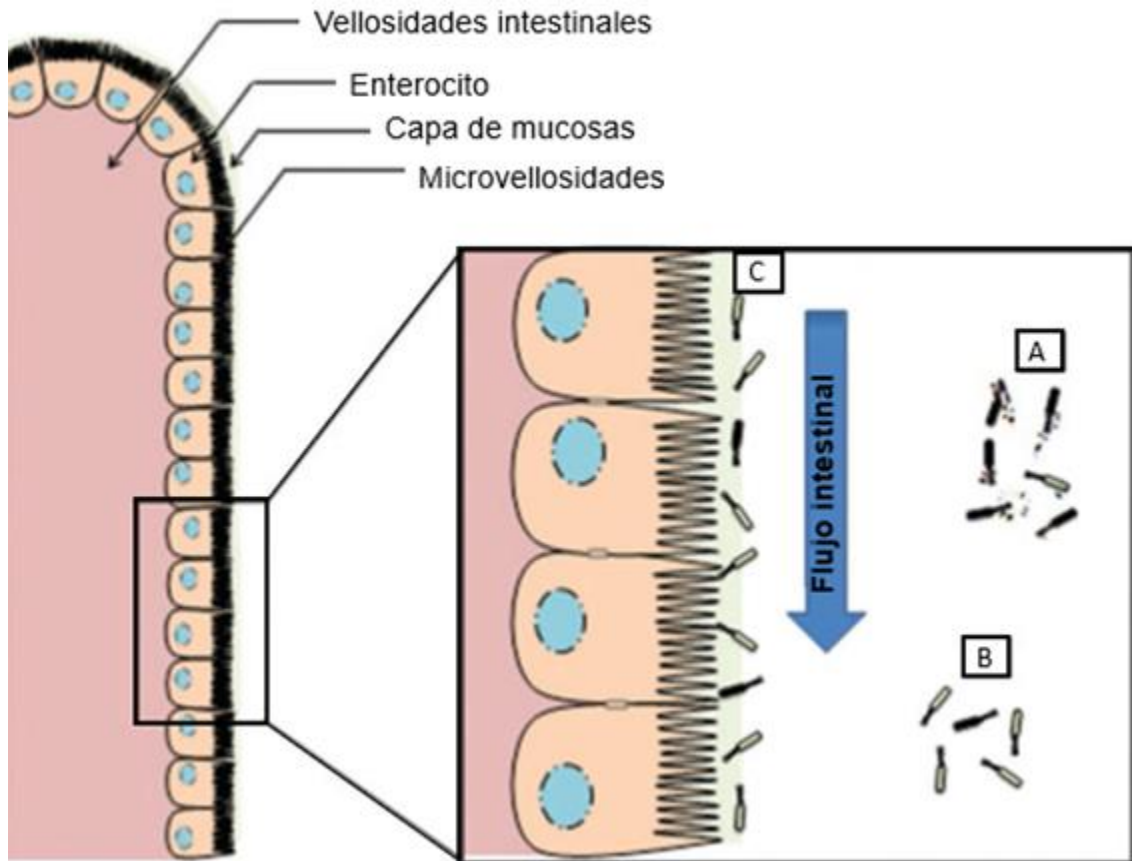


Figura 4. Esquema del efecto de moléculas protectoras de la leche materna. A) Bacterias con moléculas glicadas, B) Bacterias libres de moléculas glicadas siguen su ruta por el tracto gastrointestinal por efecto de peristalsis y C) Bacterias que se adhieren al tejido intestinal. Representación de microorganismos en negro corresponde a bacterias patógenas y en blanco a microbiota normal.

Fuente: Douëllou *et al.*, 2017

que su acción de inhibición es debido a una analogía estructural con los receptores. Sin embargo, existen alimentos que contienen mezclas de compuestos que pueden actuar como inhibidores de la adhesión para una amplia gama de microorganismos.

Estos candidatos dietarios deberían ser consumidos con moderación, ya que se ha observado que pueden presentar actividad bactericida o efectos bacteriostáticos que promueven resultados no deseados sobre la flora normal, lo cual debe ser evitado (Soman *et al.*, 2015; Asadi *et al.*, 2019).

### **Papel en el reconocimiento**

En las investigaciones realizadas sobre los mecanismos de infección de patógenos, donde se buscan maneras de impedir que el proceso infeccioso se lleve a cabo basándose en estrategias de reconocimiento, se han considerado distintos enfoques sobre el bloqueo del sitio de unión como posibles terapias profilácticas contra infecciones de patógenos. Dentro de estas estrategias se encuentran diversas formas de obstaculizar el reconocimiento de los receptores de superficie (Figura 6), donde las moléculas presentes en la bacteria o las células blanco, que están involucradas en este reconocimiento, pueden ser modificadas químicamente con el fin de impedir la infección. Esto se puede realizar al impedir el correcto ensamblaje tanto de las moléculas en los sitios de reconocimiento, como de las moléculas responsables del reconocimiento en la superficie bacteriana. Por modificación de las células blanco del hospedero para obstaculizar el reconocimiento, podría lograrse impidiendo el correcto ensamblaje de moléculas de superficie. También se ha planteado la interferencia del reconocimiento utilizando anticuerpos, o bien interfiriendo en su reconocimiento de manera competitiva por medio de moléculas con características estructurales similares a las que se encuentran en su superficie, es decir, utilizando moléculas análogas de gran tamaño molecular o microorganismos modificados con receptores específicos dirigidos a las bacterias, donde todas estas alternativas cumplirían la función de inhibir el reconocimiento entre la bacteria y el huésped (Soman *et al.*, 2015; Asadi *et al.*, 2019).

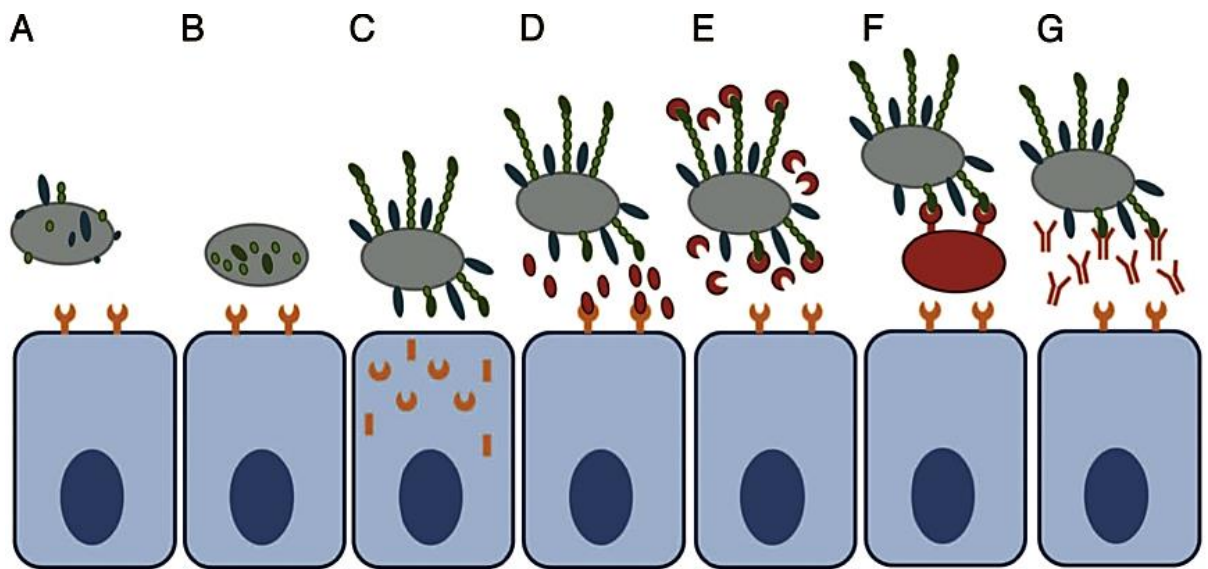


Figura 5. Estrategias de terapias de anti-adherencia. (A) Inhibir la adherencia al intervenir en la biosíntesis de adhesinas, (B) inhibir el correcto ensamblaje de adhesinas, (C) Inhibir el ensamblaje de receptores en células del hospedero, (D) Impedir la unión con moléculas sintéticas de manera competitiva dirigido a receptores en las células o, (E) en las bacterias, (F) uso de moléculas de gran peso molecular o microorganismos específicos o (G) uso de anticuerpos.

Fuente: Soman *et al.*, (2015)

## Investigación de glicoconjugados como moléculas de anti-adherencia

La albúmina, de fuentes porcina y bovina principalmente, ha sido ampliamente utilizada como proteína de anclaje para la síntesis de glicoproteínas (Hinton y Ames, 2006; Kim y Shin, 2015; Xia *et al.*, 2015). López y Figueroa (2015) sintetizaron neoglicoconjugados por glicación no enzimática utilizando manosa como carbohidrato. Estas investigaciones encontraron que los conjugados sintetizados fueron reconocidos por la lectina de Concanavalina A, cuyo reconocimiento es específico para manosas, demostrando que, por medio de esta glicación, el glicano está disponible para el reconocimiento.

Análogamente también se han realizado investigaciones de glicación utilizando lactosa y galactosa para la síntesis no enzimática de glicoproteínas. En estos estudios se logró observar el reconocimiento por bacterias *E. coli* hacia las glicoproteínas sintetizadas (Sarabia-Sainz *et al.*, 2009).

Rodríguez (2016) reportó la utilización de oligosacáridos de quitina (constituida por glucosaminas y n-acetilglucosaminas), obtenidos por hidrólisis química para la síntesis de los conjugados, los cuales demostraron reconocimiento por lectinas específicas hacia estos carbohidratos. La presencia de monómeros de quitina en las estructuras de glicoconjugados ha demostrado que estas estructuras pueden ser reconocidas por diferentes cepas bacterianas (Sharon, 2006), lo cual sugiere que la síntesis de este tipo de neoglicanos podría ser una opción capaz de tener interacción con diferentes microorganismos patógenos.

Por otra parte, existen pocos estudios sobre la terapia anti-adherencia en modelos *in vivo*. Krachler y Orth (2013), utilizaron la terapia de anti-adherencia con oligosacáridos de leche en un modelo murino, en el cual se logró evidenciar la prevención de la infección de enterocolitis necrosante. Sin embargo, es necesario continuar con estudios de reconocimiento de estas moléculas para poder asegurar que este reconocimiento que se presenta en estudios *in vitro* tenga la capacidad de reconocimiento competitivo similar en un sistema *in vivo*.

En el presente estudio se propone ampliar el conocimiento acerca del reconocimiento de patógenos hacia moléculas de N-acetilglucosamina y glucosamina, sintetizando neoglicanos por métodos no enzimáticos utilizando albúmina sérica bovina y oligosacáridos de quitosano, con la finalidad de evaluar el reconocimiento por las adhesinas de *Escherichia coli*, específicamente de las cepas *E. coli* K88+ y *E. coli* K88 ac.

Al tener conocimiento de la importancia que se ha atribuido a la problemática de la resistencia hacia antibióticos, la terapia de anti-adherencia que involucra el uso de agentes que interfieren en el reconocimiento de la bacteria con el tejido del hospedero, representa una opción que merece interés. A pesar de las investigaciones generadas en los últimos años, es imprescindible continuar con la investigación en esta área especialmente en un sistema *in vivo* para brindar fundamentos que impulsen su implementación en un futuro.

## **HIPÓTESIS**

Los neoglicanos sintetizados tendrán la capacidad de ser reconocidos por una lectina vegetal específica para N-acetilglucosamina y por adhesinas bacterianas pertenecientes a cepas de *E. coli* causantes de infecciones.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Sintetizar neoglicanos a partir de albúmina sérica bovina y oligosacáridos de quitosano para evaluar su capacidad para ser reconocidos por adhesinas bacterianas en modelos *in vitro*.

### **Objetivos particulares**

1. Sintetizar neoglicanos a partir de albúmina sérica bovina y oligosacáridos de quitosano por medio de la reacción de Maillard a diferentes condiciones de reacción.
2. Caracterizar los neoglicanos por medio de técnicas electroforéticas, espectroscopía de infrarrojo y espectroscopía de fluorescencia.
3. Evaluar el reconocimiento biológico de los neoglicanos obtenidos, por medio de lectinoensayos y ensayos con cepas *Escherichia coli*, específicamente de *E. coli* K88+ y *E. coli* K88 ac

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

Se utilizó albúmina de suero bovino (BSA), acrilamida, estreptavidina peroxidasa, dodecil sulfato de sodio (SDS), biotina (éster de biotinamidocaproate de n-hidroxisuccinamida) sulfato de potasio, cloruro de amonio, hidróxido de amonio y disulfato de potasio de la marca Sigma-Aldrich; anhídrido acético, glutaraldehído, lectina de germen de trigo (WGA), neoglicano BSA-quitotriosa de la compañía Vector Laboratories, México; reactivo de Bradford de BioRad; mezcla de oligosacáridos de quitosano de la empresa Qingdao Yuda Century Economy & Trade. Agar y caldo tripticasa soya (TSA) marca Becton. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### **Separación de Oligosacáridos de Quitosano por Ultrafiltración**

Para la separación de oligosacáridos de quitosano se partió de una solución al 1% del carbohidrato, en agua destilada. Se obtuvieron dos fracciones por medio de ultrafiltración utilizando una membrana millipore con límite de exclusión de 1000 Da. Las fracciones obtenidas fueron mayor y menor a 1000 Da. La fracción de exclusión mayor a 1000 Da fue liofilizada y almacenada en congelación para utilizarse posteriormente en los ensayos de conjugación.

### **Síntesis de Neoglicanos**

La síntesis de neoglicanos se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones de reacción reportadas por Sarabia-Sainz *et al.*, (2011), por medio de la reacción de Maillard (glicación). Ésta se presenta entre cadenas laterales de aminoácidos que conforman las proteínas y azúcares reductores, promovida por condiciones alcalinas y tratamiento

térmico. En este estudio se utilizaron soluciones de albúmina de suero bovino (BSA) y oligosacáridos de quitosano, debido a que éste presenta mayor solubilidad en medio acuoso. La proporción de proteína:carbohidrato usada fue 1:1 (p/p). Se obtuvieron tres tipos de neoglicanos: BSA con oligosacáridos sin ultrafiltrar (BSA-OSUF), BSA con oligosacáridos ultrafiltrado (BSA-OUF) y BSA con oligosacáridos ultrafiltrados y re-acetilados después de la síntesis (BSA-OUF<sub>Ac</sub>), los cuales fueron disueltos en buffer de carbonato de sodio a pH 9.0, liofilizados e incubadas a condiciones de humedad relativa de 43% a temperaturas de 50, 60 y 70 °C por 30 min. Después de la incubación, los tratamientos se dializaron en membranas de 10 kDa, para separar las sales y moléculas de oligosacáridos que no se conjugaron y obtener solamente los neoglicanos sintetizados. Para estimar el contenido de proteínas de los diferentes tratamientos se utilizó el método Bradford. Las muestras se almacenaron en viales a -20°C para análisis posteriores (Jackson y Gallagher, 2012). Las condiciones seleccionadas para la síntesis de neoglicanos fueron establecidas en base a pruebas preliminares.

### **Acetilación de Neoglicanos**

La acetilación se llevó a cabo con la finalidad de obtener la estructura análoga deseada y que es reconocida con mayor afinidad por lectinas y adhesinas bacterianas. Para la acetilación se utilizó una mezcla de 100 µL de solución buffer de amonio (pH 9.4) y 100 µL anhídrido acético por cada 1000 µg de neoglicanos, los cuales fueron previamente liofilizados; la reacción se desarrolló por 30 min. Se evaporó la solución residual a sequedad en un equipo de centrievaporación (Vacufuge® plus Eppendorf) por 2 horas a 30 °C. Posteriormente se suspendió utilizando un buffer de fosfato de potasio (pH 7.2 y 9 g de NaCl por cada litro de solución) y se realizó una diálisis con una membrana de 10kDa, y se almacenó a -20°C para las siguientes evaluaciones (Jackson y Gallagher, 2012).

## **Caracterización de Neoglicanos**

### **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE)**

La electroforesis (SDS-PAGE) se realizó con la finalidad evaluar la migración de los neoglicanos sintetizados según sus masas moleculares al aplicar un campo eléctrico, utilizando un gel de acrilamida al 8% de entrecruzamiento. Los cambios en los patrones de migración después de aplicar el tratamiento de glicación se compararon con los presentados por la proteína nativa (sin tratar) y se estimó la masa molecular de cada tratamiento utilizando la ecuación de regresión, la cual se obtuvo al graficar el logaritmo de los pesos moleculares de los estándares y su movilidad relativa (Laemmli, 1970).

### **Cuantificación de grupos amino disponibles**

Se determinó el contenido de grupos aminos disponibles en los diferentes tratamientos. Para esta prueba se empleó el reactivo o-ftaldialdehído (OPA) que se preparó utilizando una solución de 25 mL de borato de sodio 0.1 M, 100  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol con 40 mg de OPA (disuelto en 1 mL de metanol) y 2.5 mL de SDS al 20%, esta mezcla se llevó a 50 mL, con agua destilada. Este reactivo interacciona con todos los grupos amino libres presentes en el glicoconjugado formando un compuesto que presenta absorbancia a 340 nm (Frister *et al.*, 1988).

Para la medición de las muestras, éstas se ajustaron a 0.05 unidades de absorbancia medidas a 280 nm y para la determinación se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L y se adicionó 1 mL del reactivo de OPA, se incubaron por 2 minutos para posteriormente medir la absorbancia a 340 nm. Para el cálculo del número de grupos amino libres se tomaron en consideración las diferencias de densidad óptica entre los tratamientos y la albúmina nativa (López y Figueroa, 2015; Zoellner *et al.*, 2001).

### **Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).**

Este ensayo proporciona información acerca de las vibraciones de las moléculas debido a los enlaces y grupos funcionales presentes al atravesar la muestra con un rayo en la longitud de onda del espectro infrarrojo (0.78-15.0  $\mu$ m). Las señales

obtenidas se representan en forma de un gráfico, denominado espectro de infrarrojo, en el cual, se observan picos de absorción debidos a la vibración de los diferentes enlaces atómicos que corresponden a frecuencias específicas y particulares de cada tipo de muestra. Para llevar a cabo esta técnica se colocó la muestra sólida (liofilizada), en la base del equipo para su lectura utilizando un espectrómetro (marca Agilent) FT-IR Cary 630. Por medio de esta técnica se pudieron observar diferencias en las frecuencias de las vibraciones debido a la síntesis de neoglicanos, al ser comparados con el espectro de la proteína nativa (Snehalatha et al., 2009).

### **Patrones de emisión de fluorescencia.**

Las proteínas presentan la propiedad de fluorescencia debido a la presencia de residuos aromáticos, es decir, triptófano, fenilalanina y tirosina. Sin embargo, la emisión de fluorescencia suele estar dominada por los residuos de triptófano. La espectroscopía de fluorescencia proporciona información acerca de la estructura terciaria de las proteínas alrededor de sus residuos aromáticos, y permite el estudio de su plegamiento y conformación tridimensional analizando estos fluoróforos. Para este análisis se realizaron mediciones de los patrones de emisión de fluorescencia tanto de la BSA nativa como de los neoglicanos sintetizados. Los patrones de emisión de fluorescencia intrínseca se obtuvieron por excitación del triptófano a 295 nm, y se tomaron los espectros de 300 a 400 nm. Previo al análisis las muestras fueron disueltas en solución amortiguadora 100 mM de buffer fosfato de potasio a pH 7.2, NaCl 0.15 M (PBS) y ajustadas a 0.05 unidades de absorbancia a 280 nm (López y Figueroa, 2015; Zoellner *et al.*, 2001). El procesamiento de los datos y los gráficos se analizaron por medio del software OriginPro versión 8.

## **Ensayos de Biorreconocimiento**

### **Lectinoensayos**

En los ensayos de reconocimiento se utilizó la lectina de germen de trigo (WGA, por sus siglas en inglés). Esta técnica se realizó de acuerdo con el método utilizado por

Ledesma-Osuna et al., (2010), para la cual se disolvieron 500 ng de cada tratamiento (BSA nativa, neoglicanos y BSA conjugada con triacetilglucosamina, producto comercial, como control positivo) en 100  $\mu$ L de buffer de carbonato de sodio a pH 9.6 se inmovilizaron en microplacas de 96 pozos y fueron mantenidos a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron 4 lavados, con solución de T-TBS (buffer tris-salino con Tween<sup>TM</sup> 20). Y fue realizado un bloqueo con BSA diluida en T-TBS y se incubó por 1 h a 37 °C. Repitiendo los lavados con T-TBS y continuando con una incubación con 100  $\mu$ L por pozo de la lectina WGA (0.001  $\mu$ g/mL) en solución TBS (buffer tris-salino) por 2 h a 37°C. Se realizaron lavados y seguidos de la incubación con una solución de la enzima estreptavidina peroxidasa (dilución de 1:2000 en TBS) por 1 h a 37°C. Posteriormente se realizaron 4 lavados con TBS y se adicionó el reactivo revelador que consistió en tabletas de dihidrocloruro de *o*-fenilendiamina diclorhidrato (Sigma Fast OPD) y se incubó nuevamente en placa de agitación por 30 min a temperatura ambiente. El reactivo OPD funciona como un revelador ya que es el sustrato de la enzima estreptavidina peroxidasa, la cual se une a la lectina, la que a su vez reconoce a los glicanos presentes en los neoglicanos sintetizados. Esta unión genera un cambio de color de la solución a amarillo-café cuya absorbancia puede ser medida a 450 nm utilizando un lector de microplacas (BIORAD).

### **Ensayos de reconocimiento por bacterias**

Los ensayos con bacterias se realizaron de acuerdo con la técnica reportada por Sarabia-Sainz et al. (2013) utilizando las cepas de *E. coli*. K88 + y *E. coli*. K88 ac, ya que se ha reportado que las cepas de *E. coli* K88 tienen receptores que reconocen a diferentes monosacáridos y entre ellos se encuentra la acetilglucosamina (Grange, et al., 1999). Previo a este ensayo se realizó la biotilación de los neoglicanos. Para ello se pusieron en contacto 4 mg de biotina y 5 mg de cada tratamiento, previamente disueltos en 3 mL de PBS. Se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y se sometieron a diálisis contra PBS conteniendo 1 mM de CaCl<sub>2</sub> y 1mM de MgCl<sub>2</sub>. Se estimó el contenido de proteína en cada tratamiento usando el método de Bradford y

las muestras fueron separadas en alícuotas y congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  previo a los análisis posteriores de reconocimiento bacteriano.

Las cepas de *E. coli* fueron donadas por el laboratorio de bioquímica de proteínas y glicoconjugados del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo A.C. (CIAD A.C.). Con el fin de obtener las bacterias para el ensayo de reconocimiento, las cepas de *E. coli* se sembraron en agar tripticosa soya, que fomenta el desarrollo de fimbrias. Después de 24 h de incubación a  $37^{\circ}\text{C}$ , las colonias de bacterias se suspendieron en buffer PBS, ajustando el número de bacterias a 0.250 unidades de densidad óptica a 600 nm lo que es equivalente a  $2.0 \times 10^8$  UFC/mL. Se inmovilizaron las bacterias en microplaca utilizando 100  $\mu\text{L}$  de esta solución de bacterias, con 1% de glutaraldehído, e incubando por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 4 lavados con T-PBS (buffer PBS con Tween™ 20) y se bloqueó por toda la noche con 300  $\mu\text{L}$  de solución de al 1.5% BSA T-PBS. Después se realizaron 4 lavados, con T-PBS antes de incubar con 100  $\mu\text{L}$  conteniendo 1  $\mu\text{g}$  de cada tratamiento biotinilado a temperatura ambiente por 1.5 horas. Se realizaron 4 lavados con T-TBS y se incubó con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de estreptavidina peroxidasa previamente diluida 1:2000 e incubando por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron nuevamente 4 lavados y finalmente se agregó el revelador *o*-fenilendiamina diclorhidrato (Sigma Fast OPD) y se tomó la lectura después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente se tomó la lectura de absorbancia a 450 nm en un lector de placas (BIORAD).

### **Diseño de Experimental y Análisis Estadístico**

Se utilizó un diseño completamente al azar, además se realizó un análisis estadístico de varianza con un grado de confianza del 95%, para evaluar diferencias entre tratamientos específicos se compraron las medias por medio de prueba de Tukey. Para esto se utilizó el programa estadístico InfoStat (Versión 2019).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Síntesis de Neoglicanos

Se logró obtener tres grupos de neoglicanos a partir de la conjugación de albúmina sérica bovina y oligosacáridos de quitosano. El primer grupo de neoglicanos fue sintetizado con albumina sérica bovina y oligosacáridos de quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF), el segundo grupo con oligosacáridos de quitosano obtenidos por ultrafiltración separados con una membrana con límite de exclusión utilizando la fracción mayor a 1000 Da (BSA-OUF) y el tercer grupo fue obtenido con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados con el límite de exclusión mayor a 1000 Da y posteriormente re-acetilados (BSA-OUFAC); la re-acetilación se realizó con la finalidad de obtener moléculas de N-acetilglucosamina, estructuras sacáridas que son reconocidas por adhesinas bacterianas (Erickson *et al.*, 1994, Sharon, 2006).

Todos los tratamientos fueron incubados por 30 minutos a las tres diferentes temperaturas mencionadas en la metodología. Las condiciones de temperatura durante la síntesis por reacción de Maillard fueron las establecidas en base a los ensayos preliminares donde se seleccionaron aquellas en las que se observó una menor pérdida por agregación de proteína y el mayor grado de conjugación.

Dentro de las características evaluadas después de la etapa de síntesis se encuentra el contenido proteico de los neoglicanos el cual se muestra en la Tabla 1. En el caso de los neoglicanos ultrafiltrados y re-acetilados (BSA-OUFAC) se puede ver una concentración menor al comparar con los otros dos grupos de neoglicanos obtenidos, esto es, por una parte, debido al bajo rendimiento a la hora de realizar la ultrafiltración, aunado a esto, el proceso de re-acetilación limitó la cantidad máxima que se podía utilizar para su síntesis. Es decir, se trabajó con una limitante sobre la cantidad de neoglicano utilizado por microtubo para llevar a cabo la re-acetilación bajo las condiciones disponibles. En el caso de neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados



Tabla 1. Concentración proteica obtenida por método de Bradford de neoglicanos obtenidos

Tratamiento	Contenido ( $\mu\text{g/mL}$ )
Neoglicanos I	
BSA-OSUF <sup>1</sup> 50 °C	10419.89 c
BSA-OSUF <sup>1</sup> 60 °C	9339.24 b
BSA-OSUF <sup>1</sup> 70 °C	8468.27 a
Neoglicanos II	
BSA-OUF <sup>2</sup> 50 °C	2403.44 a
BSA-OUF <sup>2</sup> 60 °C	4016.34 c
BSA-OUF <sup>2</sup> 70 °C	2901.97 b
Neoglicanos III	
BSA-OUFAC <sup>3</sup> 50 °C	97.07 a
BSA-OUFAC <sup>3</sup> 60 °C	100.74 b
BSA-OUFAC <sup>3</sup> 70 °C	97.17 b

<sup>1</sup>BSA-OUFAC: neoglicano con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y re-acetilados

<sup>2</sup>BSA-OUF: neoglicano con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados

<sup>3</sup>BSA-OSUF: Albumina sérica bovina y oligosacáridos de quitosano sin ultrafiltrar

Resultado es el promedio de 3 repeticiones

Resultados con distinta letra son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

(BSA-OUF) se puede observar que el contenido proteico es menor que el grupo sin ultrafiltrar, (BSA-OSUF), esto es debido a que no se inició la reacción con el mismo contenido de proteína y carbohidratos en estos tratamientos, aunque si se mantuvieron las proporciones proteína:carbohidrato (1:1) previamente establecida. Por otra parte, los neoglicanos obtenidos con oligosacáridos sin filtrar (BSA-OSUF) se observa una disminución en el contenido de proteína conforme aumentó la temperatura de reacción, este comportamiento fue igual en el grupo de neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados. Este comportamiento está relacionado a la agregación de las proteínas por efecto de la temperatura usada para la síntesis. No obstante, también se ha observado una protección térmica por parte de los carbohidratos que se unen a la proteína brindándole estabilidad estructural. Esto ha sido estudiado con otros carbohidratos, como en el caso de Liu et al., (2020) donde utilizaron xilosa para estudiar la estabilidad de albúmina sérica bovina al evitar su agregación durante la reacción de glicación por efecto de la unión del carbohidrato a la estructura proteica.

### **Electroforesis (SDS-PAGE)**

La electroforesis SDS-PAGE se llevó a cabo para determinar diferencias de peso molecular después de la glicación y que se pueden atribuir a la unión de las unidades de oligosacáridos a la proteína por efecto del tratamiento térmico. Para esto, se compararon los tratamientos obtenidos con respecto a la proteína nativa, es decir, la proteína albúmina sérica bovina en ausencia del carbohidrato.

En la Figura 7 se muestran los geles de SDS-PAGE para los tratamientos obtenidos a 50, 60 y 70 °C usando oligosacáridos sin ultrafiltrar BSA-OSUF(A), los oligosacáridos ultrafiltrados BSA-OUF(B) y oligosacáridos separados por ultrafiltración y re-acetilados BSA-OUFAC (C). Primeramente, se observa en todos los grupos de neoglicanos una menor migración de las bandas de cada uno de los tratamientos en comparación con la proteína nativa (BSA). Los tratamientos sometidos a mayor temperatura (70 °C) presentaron una menor migración, lo que se atribuye al aumento de peso molecular como resultado de la unión de moléculas de oligosacáridos a la proteína, exceptuando el grupo BSA-OUFAC donde no se ve diferencia entre aquellos obtenidos a 60 y 70 °C.

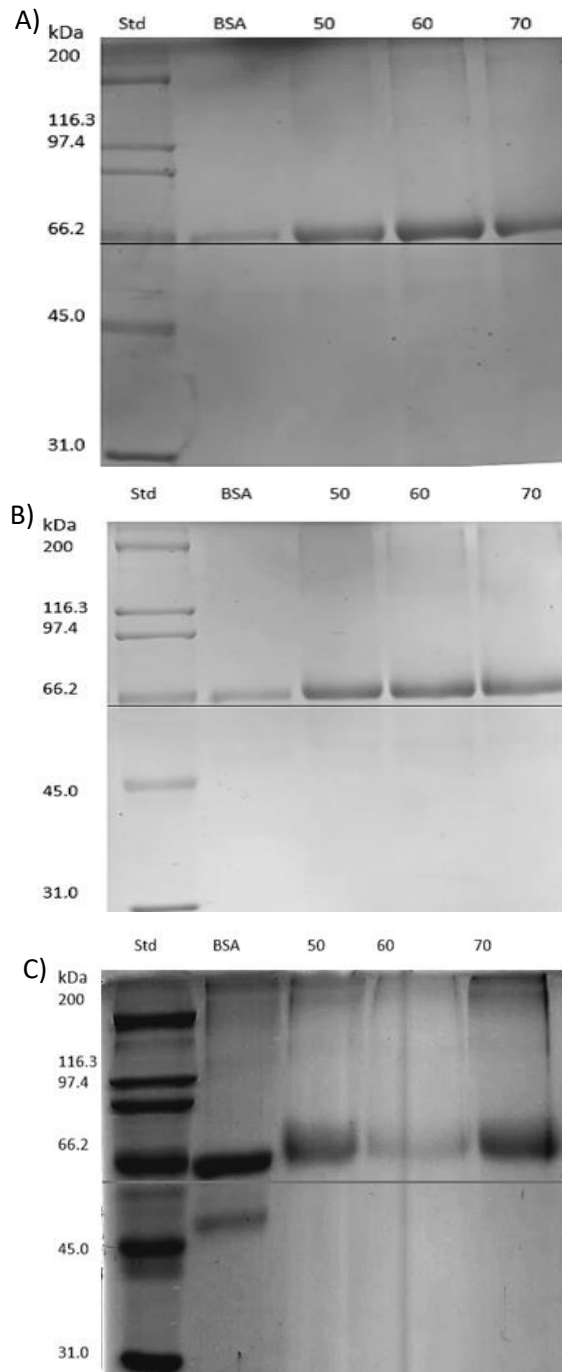


Figura 6. Geles de electroforesis SDS-PAGE, en donde se encuentran A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos sin filtrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C en B) BSA-OUF los neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, y en C) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados a 50, 60 y 70°C.

Estudios reportados (Laroque *et al.*, 2008) han mostrado que la unión de carbohidratos a la estructura de la proteína se lleva a cabo en múltiples sitios, lo cual depende de las condiciones de glicación, reactividad de los carbohidratos involucrados y disponibilidad de las cadenas laterales de la proteína, entre otros.

De manera análoga, estudios de glicación realizados (Sarabia-Sainz *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2015) han mostrado que por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras es posible evidenciar los cambios estructurales que se están dando en la proteína al estimar el aumento en la masa molar.

En la Tabla 2, se muestran las masas moleculares estimadas en base a la ecuación de regresión generada a partir de los estándares de masa molecular de amplio rango utilizados en la electroforesis SDS-PAGE. Los cambios en la masa molecular se atribuyen a la glicación de la proteína. Al comparar los tratamientos obtenidos con la proteína nativa (BSA) se puede inferir que la glicación se llevó a cabo, ya que en todos los tratamientos se puede observar un aumento en la masa molecular. Se observó que los tratamientos de los grupos BSA-OSUF y BSA-OUF obtenidos a mayor temperatura (70 °C) aumentaron en mayor medida la masa molecular, siendo un aumento de 5 kDa, mientras que en el caso de BSA-OUF<sub>Ac</sub> tanto a temperatura de 60 y 70 °C el aumento fue de 6.62 kDa, esto se observó por un menor desplazamiento en el gel de SDS-PAGE.

El grado de glicación obtenido, está relacionado con el número de sitios disponibles para la glicación y la reactividad de los carbohidratos participantes en la síntesis. Se ha reportado (Nabi *et al.*, 2020; Mao *et al.*, 2020) que la albúmina sérica bovina contiene 59 residuos de lisina y 23 residuos de arginina, ambos aminoácidos han sido reportados como los que presentan la mayor reactividad para la glicación, lo cual muestra que es una proteína altamente reactiva para este tipo de reacción (Anguizola *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2018). Los oligosacáridos empleados para la síntesis de los neoglicanos del grupo I, podrían estar constituidos por hasta 15 unidades monoméricas (3000 Da); para el grupo II, debido a la ultrafiltración entre 5 y 15 unidades, al igual que para el grupo III. Cabe señalar que las estructuras de menor

Tabla 1. Masas moleculares calculadas a partir de la migración en electroforesis SDS-PAGE

Neoglicanos I	Peso (kDa)	Neoglicanos II	Peso (kDa)	Neoglicanos III	Peso (kDa)
BSA <sup>1</sup>	67.89	BSA <sup>1</sup>	68.09	BSA <sup>1</sup>	68.4
BSA-OSUF <sup>2</sup> 50 °C	69.59	BSA-OUF <sup>3</sup> 50 °C	69.98	BSA-OUFac <sup>4</sup> 50 °C	71.71
BSA-OSUF <sup>2</sup> 60 °C	71.29	BSA-OUF <sup>3</sup> 60 °C	71.87	BSA-OUFac <sup>4</sup> 60 °C	75.02
BSA-OSUF <sup>2</sup> 70 °C	72.98	BSA-OUF <sup>3</sup> 70 °C	73.76	BSA-OUFac <sup>4</sup> 70 °C	75.02

<sup>1</sup>BSA: Albúmina sérica bovina

<sup>2</sup>BSA-OSUF: neoglicanos con oligosacáridos de quitosanos sin ultrafiltrar

<sup>3</sup>BSA-OUF: neoglicanos con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados

<sup>4</sup>BSA-OUFac: neoglicanos con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados re-acetilados

tamaño presentan mayor reactividad (Lund y Ray, 2017) y por lo tanto las que más probablemente quedaron unidas a la proteína.

### **Cuantificación de grupos amino disponibles**

Se evaluó el cambio de grupos amino disponibles por efecto del tratamiento aplicado en comparación con la proteína nativa (BSA). En la Tabla 3 se puede observar la intensidad de la señal para cada uno de los neoglicanos sintetizados. Solo el tratamiento de neoglicanos obtenidos usando oligosacáridos ultrafiltrados (BSA-OUF) e incubados a 70 °C, presentó una disminución de esta señal. Por otra parte, en el caso de los tres grupos de neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar (BSA-OSUF) se observa una mayor intensidad en comparación con la proteína nativa (BSA). Sin embargo, en ambos grupos de neoglicanos la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Estudios realizados para evaluar el comportamiento de los grupos amino disponibles durante la glicación han mostrado una disminución de los mismos a medida que el grado de glicación es mayor (Laborín, 2017; Fu *et al.*, 2019). Sin embargo, para este estudio es necesario mencionar que dentro de la estructura del oligosacárido utilizado para la obtención de estos neoglicanos se encuentran grupos amino, que pueden estar interfiriendo en el análisis. Una de las dos estructuras monoméricas del quitosano, la glucosamina, tiene disponible el grupo amino (Peniche *et al.*, 2001) estos grupos, en conjunto con los grupos amino libres de la proteína, son los responsables de la intensidad de la señal obtenida, ya que también pueden unirse al reactivo o-ftaldialdehído. Debido a lo anterior, se pudo concluir que la técnica para la medición de grupos aminos disponibles no es adecuada para evaluar el grado de glicación en proteínas cuando se usan carbohidratos aminados para la síntesis, ya que los grupos amino de los carbohidratos también son cuantificados en dicho análisis. En base a lo anterior, y a la escasa disponibilidad de muestra de los tratamientos de neoglicanos ultrafiltrados y re-acetilados no se recomienda esta técnica para la dicha caracterización.

Tabla 2. Grupos amino disponibles de los neoglicanos a obtenidos a diferentes temperaturas

Neoglicanos I	Absorbancia a 340 nm	Neoglicanos II	Absorbancia a 340 nm
BSA <sup>1</sup>	0.0581 a	BSA <sup>1</sup>	0.0581 a
BSA-OSUF <sup>2</sup> 50	0.0647 a	BSA-OUF <sup>3</sup> 50	0.0586 a
BSA-OSUF <sup>2</sup> 60	0.0649 a	BSA-OUF <sup>3</sup> 60	0.0586 a
BSA-OSUF <sup>2</sup> 70	0.0639 a	BSA-OUF <sup>3</sup> 70	0.0544 a

<sup>1</sup>BSA: Albúmina sérica bovina

<sup>2</sup>BSA-OSUF: Albúmina sérica bovina con oligosacáridos sin ultrafiltrar

<sup>3</sup>BSA-OUF: Albúmina sérica bovina con oligosacáridos ultrafiltrados

Resultados con distinta letra son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## Patrones de Emisión de Fluorescencia

Los patrones de emisión de fluorescencia producidos debido a la presencia de aminoácidos aromáticos en proteínas proporcionan información de la estructura terciaria de las mismas (Callis, 2014). En la secuencia de aminoácidos de la BSA se encuentran tres residuos de triptófano que poseen la capacidad de generar emisión de fluorescencia y pueden ser utilizados para demostrar cambios en la conformación tridimensional de la proteína, ya que alteraciones en el microambiente que rodea a los triptófanos presentes también producirá variaciones en el espectro de fluorescencia (Sindrewicz *et al.*, 2019). Los cambios en los patrones de emisión de fluorescencia pueden ser atribuidos a la glicación (Kim y Shin, 2015). Los cambios que se pueden observar debido a la glicación pueden ser de dos tipos, por un lado, en la intensidad de la emisión de fluorescencia, que puede aumentar o disminuir y también en el desplazamiento del patrón de emisión, que puede desplazarse hacia la derecha también descrito como corrimiento hacia el color rojo del espectro electromagnético o hacia la izquierda denominado desplazamiento al azul.

En el caso de los neoglicanos obtenidos (Figura 8), se pudo observar en dos grupos de neoglicanos una mayor intensidad de señal que el patrón de emisión de la proteína nativa. Tanto en el grupo de neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados (BSA-OUF) como en el grupo de neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar (BSA-OSUF) mantuvieron este comportamiento. De manera similar, en estudios realizados sobre interacciones de carvedilol con proteína albúmina sérica bovina (BSA), se encontró un incremento en la emisión lo cual se atribuyó a modificaciones de la estructura terciaria de la proteína BSA a causa de la unión de carvedilol (Safarnejad *et al.*, 2016), podemos decir que la unión de los oligosacáridos a la estructura de la proteína provocó que se abriera, exponiendo los residuos de triptófano hacia al medio acuoso por lo que la intensidad de la señal fue mayor.

En el caso del grupo de neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados y re-acetilados (BSA-OUFAC), la intensidad de señal se vio disminuida. Podemos inferir que en estos tratamientos la glicación y posterior re-acetilación ocasionó que los residuos de triptófano quedaran más ocluidos dentro de la estructura de la proteína ocasionando



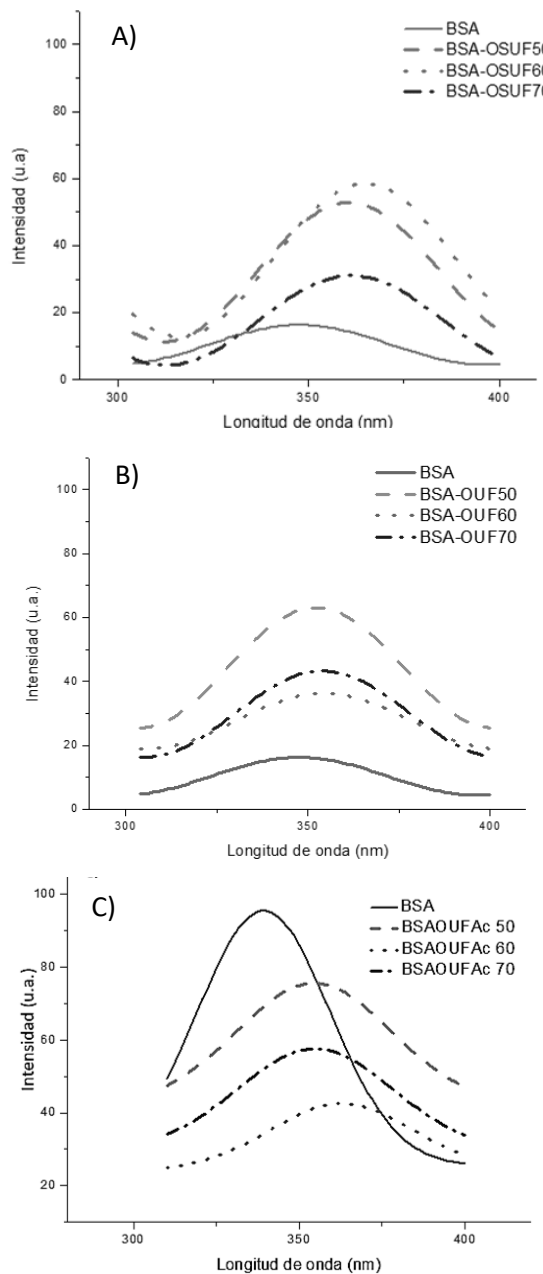


Figura 7. Patrones de emisión de fluorescencia de neoglicanos obtenidos. Espectros de A) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos-ultrafiltrados y re-acetilados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a 50, 60 y 70°C y C) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos sin filtrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C.

una menor intensidad en la señal. Estudios realizados por Kim y Shin en 2015 muestran una disminución de la señal de fluorescencia al unir covalentemente fucoidan a la proteína BSA, en donde se considera como indicio de una interferencia de la señal de los triptófanos por la cercanía de unión de las cadenas largas de carbohidrato sulfatado, que constituyen la estructura de fucoidan, a la proteína.

En la Tabla 4, se muestran las longitudes de onda a las cuales se presenta la máxima emisión de fluorescencia para los diferentes neoglicanos sintetizados. De manera general se observa en todos los tipos de tratamientos un desplazamiento de la señal hacia la derecha, hacia el rojo. Estudios reportados por Martineau (1990) explican los cambios en los patrones de emisión de fluorescencia en la proteína (WA158) unida a maltosa donde se observa este desplazamiento el cual es atribuido a un ambiente más hidrofílico a consecuencia de la unión de maltosa. Este desplazamiento implica un desdoblamiento de la proteína por efecto de un tratamiento térmico, y por consiguiente un cambio en la posición del triptófano, fuera del núcleo hidrofóbico (Tan *et al.*, 2013; Uversky y Permiakov, 2007). Se ha reportado que uno de los triptófanos en la BSA se ubica dentro de un núcleo no-polar, llamado también bolsillo (Kim y Shin, 2015), por lo que este desplazamiento puede hacer alusión al cambio en la orientación de este triptófano.

El triptófano ha demostrado ser sensible a su microambiente, lo cual contribuye a la propiedad de emisión de fluorescencia. Esto se ha estudiado con anterioridad por Dashnau et al., (2005), donde evidenciaron el comportamiento de la señal de N-acetil-L-triptófano amida (NATA) por la presencia de glicerol y sacarosa, resultando en un cambio hacia el espectro rojo, lo que fue correlacionado con una mayor exposición del residuo triptófano hacia el exterior, dando a entender que entre mayor sea el desplazamiento hacia el rojo mayormente expuesto está este residuo. Este comportamiento es relevante en el presente estudio, ya que la mayoría de los tratamientos sintetizados presentaron un desplazamiento hacia la derecha, siendo el tratamiento de BSA-OSUF a 50 °C el de mayor desplazamiento.

Tabla 3. Cambios en la intensidad de fluorescencia de neoglicanos con oligosacáridos de quitosano

Neoglicanos I	Longitud de onda (nm) de máxima emisión	de Neoglicanos II	Longitud de onda (nm) de máxima	de Neoglicanos III	Longitud de onda (nm) de máxima emisión
BSA <sup>1</sup>	346	BSA <sup>1</sup>	346	BSA <sup>1</sup>	340
BSA-OSUF <sup>2</sup> 50 °C	358	BSA-OUF <sup>3</sup> 50 °C	353	BSA-OUFAC <sup>4</sup> 50 °C	355
BSA-OSUF <sup>2</sup> 60 °C	357	BSA-OUF <sup>3</sup> 60 °C	353	BSA-OUFAC <sup>4</sup> 60 °C	364
BSA-OSUF <sup>2</sup> 70 °C	350	BSA-OUF <sup>3</sup> 70 °C	346	BSA-OUFAC <sup>4</sup> 70 °C	355

<sup>1</sup>BSA: Albumina sérica bovina

<sup>2</sup>BSA-OSUF: Albumina sérica bovina con oligosacáridos sin ultrafiltrar

<sup>3</sup>BSA-OUF: neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados

<sup>4</sup>BSA-OUFAC: neoglicano con oligosacárido ultrafiltrados y re-acetilados

## **Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)**

Esta técnica nos permite identificar grupos funcionales presentes en una muestra, al pasar luz infrarroja, obteniendo un espectro característico en el que se pueden identificar las vibraciones de los enlaces presentes en la muestra de interés.

El espectro de infrarrojo (Figura 9) nos permitió observar las señales emitidas por enlaces presentes en los grupos funcionales en las muestras analizadas. En la BSA nativa se observan bandas asociadas a los grupos hidroxilo y amino a 3282.8 cm<sup>-1</sup> (traslapadas); a 1655 cm<sup>-1</sup> se observa la banda correspondiente al grupo carbonilo, además de las vibraciones de los enlaces entre carbonos simétricos y asimétricos en 2939 cm<sup>-1</sup> y 1653 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. A 1650 cm<sup>-1</sup>, se observa la señal correspondiente a las vibraciones de los grupos acetilos del quitosano (Li *et al.*, 2018). En los Neoglicanos sintetizados, a diferencia del espectro de la proteína nativa, la presencia de la banda correspondiente a las vibraciones del esqueleto de la estructura piranósica entre 1080 y 1030 cm<sup>-1</sup> (Peniche *et al.*, 2001), lo que puede ser observado en los espectros de neoglicanos a los 1064-1067 cm<sup>-1</sup>. Este comportamiento en los tres tipos de neoglicanos es una evidencia de que los oligosacáridos se unieron químicamente a la estructura de la proteína. Esto ya ha sido reportado en estudios previos donde se ha considerado esta señal emitida como la huella típica de la presencia de carbohidratos (Li *et al.*, 2018; Pérez, 2019).

## **Ensayos de Biorreconocimiento**

### **Lectinoensayos**

Los ensayos de biorreconocimiento tienen la finalidad de demostrar que los neoglicanos sintetizados pudieron ser reconocidos por la lectina WGA (aglutinina de germen de trigo, por sus siglas en inglés), que reconoce específicamente secuencias de acetyl-glucosamina y glucosamina (Goldstein *et al.*, 1997), que son las estructuras presentes en los oligosacáridos usados para la síntesis de los neoglicanos.

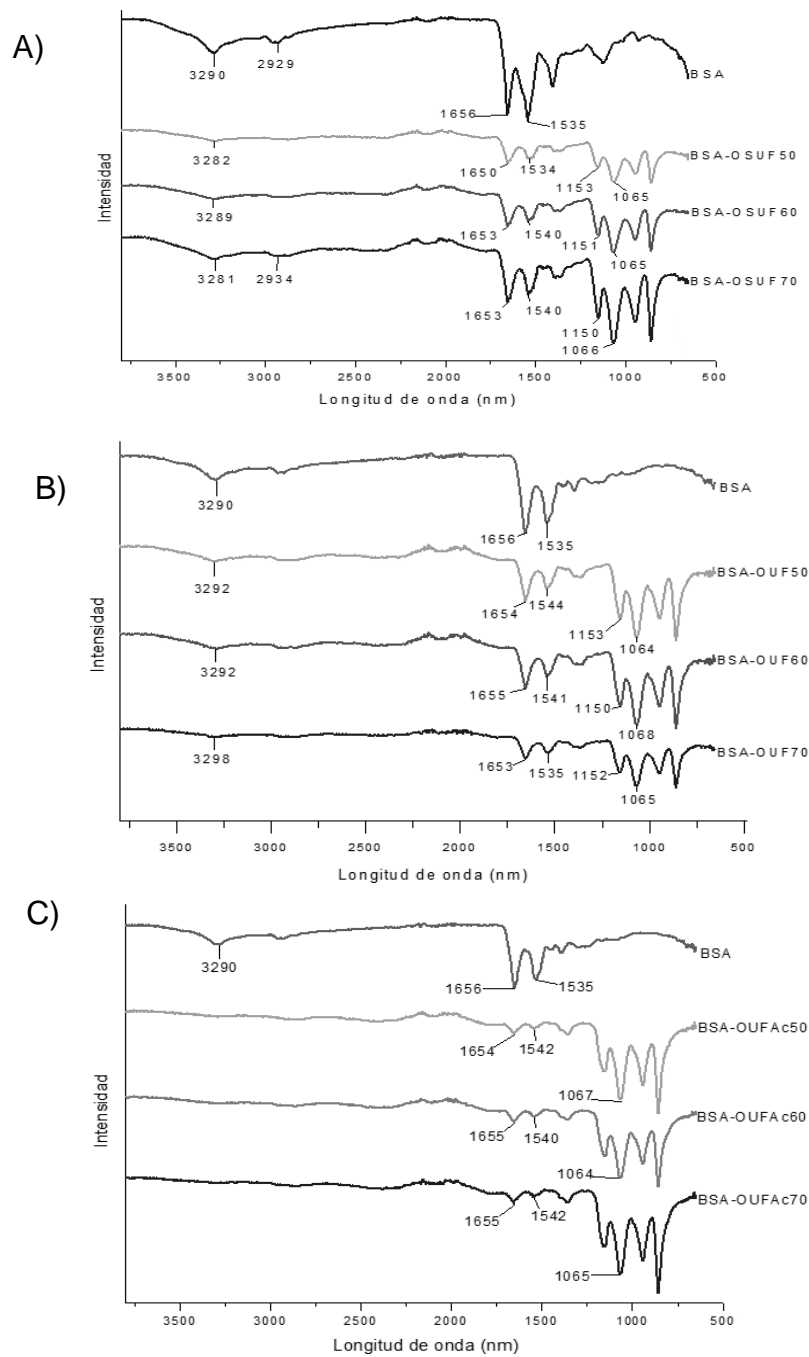


Figura 8. Espectros de Infrarrojo correspondientes a A) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrado y re-acetilados obtenidos a 50, 60 y 70 °C y B) BSA-OUF, neoglicano con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrado obtenido a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFAC, neoglicano con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados.

De acuerdo con los ensayos de reconocimiento por la lectina WGA, en la Figura 10 se observa que todos los neoglicanos fueron susceptibles de ser reconocidos por la lectina WGA, principalmente los neoglicanos sintetizados a mayor temperatura (70 °C) principalmente en los grupos BSA-OUF y BSA-OUFAC. Esto puede ser explicado por la relación entre el mayor grado de glicación observado a temperaturas más elevadas y evidenciado por electroforesis SDS-PAGE, donde el aumento en masa molecular se pudo atribuir a un mayor grado de glicación y por consiguiente un mayor reconocimiento por parte de la lectina.

También dentro del ensayo de reconocimiento cabe destacar la diferencia sobre el comportamiento de cada grupo de neoglicanos obtenidos. En el caso del grupo de oligosacáridos sin ultrafiltrar, se observó que, si bien todos los tratamientos son significativamente diferentes a la proteína nativa, solo el obtenido a 70°C fue significativamente diferente al control positivo. Mientras que, en el caso del grupo de neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados cada uno de los neoglicanos fue significativamente diferentes tanto de la proteína nativa como del control positivo. En el caso de los neoglicanos BSA-OUFAC se observó que entre las temperaturas no existió una diferencia significativa, pero si al compararlos con la proteína nativa y el control positivo. Este tipo de tratamientos fue mayormente reconocido por la lectina de WGA.

Por un lado, lo observado en el estudio de patrones de emisión de fluorescencia, podemos decir que los cambios de la estructura terciaria de la proteína no generaron un impedimento estérico para que el reconocimiento de los oligosacáridos se llevara a cabo. Además, estudios previos sobre el reconocimiento de glicoproteínas por lectinas han sido reportados por Laborín (2017), Palomo (2018) y Pérez (2019), en los cuales se ha observado una relación entre el reconocimiento de carbohidratos por lectinas con relación al grado de glicación, lo que coincide con lo observado en este trabajo.

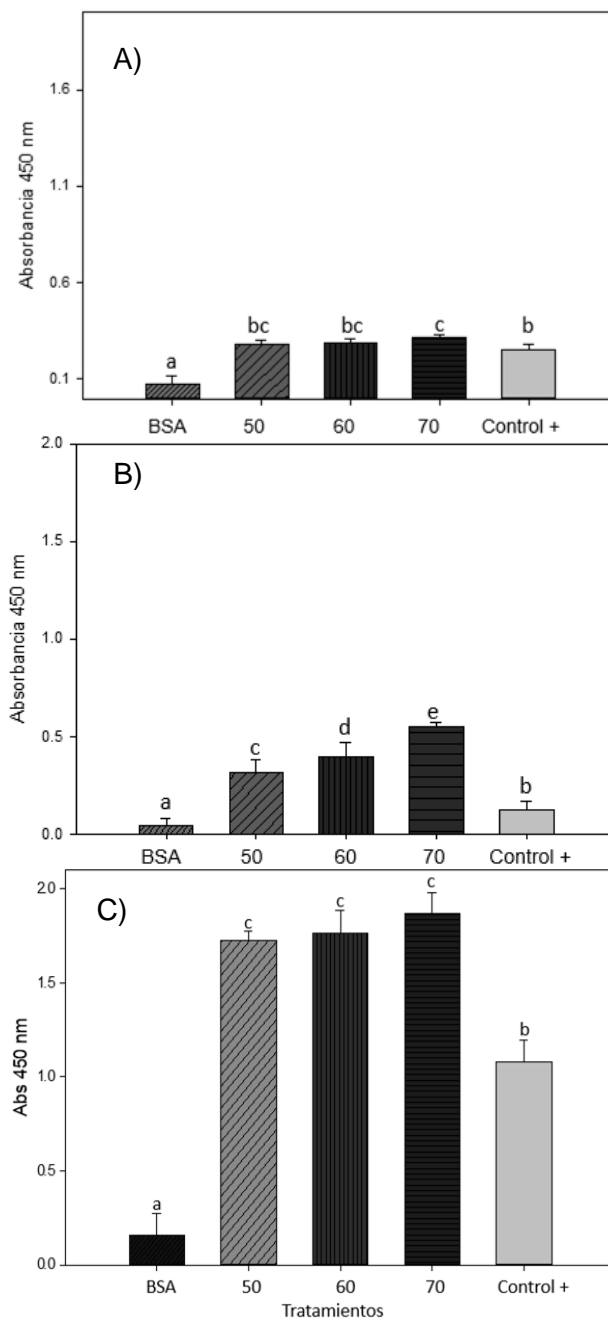


Figura 10. Ensayos de reconocimiento por la lectina de germe de trigo (WGA). Los tratamientos se encuentran como A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFAC neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados y como control positivo el neoglicano comercial de albumina sérica bovina con triacetilglucosamina.

### **Ensayos de reconocimiento por bacterias.**

El objetivo del ensayo con bacterias fue evidenciar que los neoglicanos obtenidos pueden ser reconocidos por adhesinas bacterianas. De acuerdo con Garner et al. (2002), las adhesinas de *Escherichia coli* K88 (F4), tienen la capacidad de reconocer moléculas de N-acetilglucosamina dentro de la secuencia de carbohidratos presentes en superficies celulares, por lo que al realizar este estudio las bacterias seleccionadas fueron: *E. coli* K88 ac y *E. coli* K88+. En la figura 13 se representa el ensayo de reconocimiento con la bacteria *E. coli* K88 ac, en donde los tres grupos de neoglicanos fueron reconocidos significativamente mayor que la proteína (BSA) y el control en ambas bacterias.

Los neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados (BSA-OUFAC) y con oligosacáridos ultrafiltrados (BSA-OUF) mostraron un comportamiento similar al presentado en los lectinoensayos, es decir, un aumento del reconocimiento conforme aumenta la temperatura de síntesis.

En el caso del grupo de neoglicanos obtenidos con oligosacáridos sin ultrafiltrar (BSA-OSUF) se observa que, además de no mantener el comportamiento de reconocimiento visto en los ensayos con lectina, el sintetizado a 50 °C fue el tratamiento mayormente reconocido por todos los neoglicanos para el caso de la cepa de *E. coli* K88 ac. Esta diferencia entre el reconocimiento por las adhesinas bacterianas de *E. coli* K88 ac se podría atribuir a una mayor exposición de los carbohidratos a la superficie de la proteína, ya que la diferencia en masa molecular por unión de carbohidratos no es mayor a temperatura de síntesis de 50 °C, si no a 70 °C.

Asimismo, este comportamiento pudiera ser debido a que los neoglicanos están menos glicosados y hay un menor impedimento estérico permitiendo que se dé el reconocimiento con las bacterias. Por otra parte, en la Figura 12, se puede observar el reconocimiento por las adhesinas de la bacteria *E. coli* K88+ donde el único grupo de neoglicanos que mantiene el comportamiento observado en lectinoensayos fue el grupo de neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados (BSA-OUF), mientras que en el



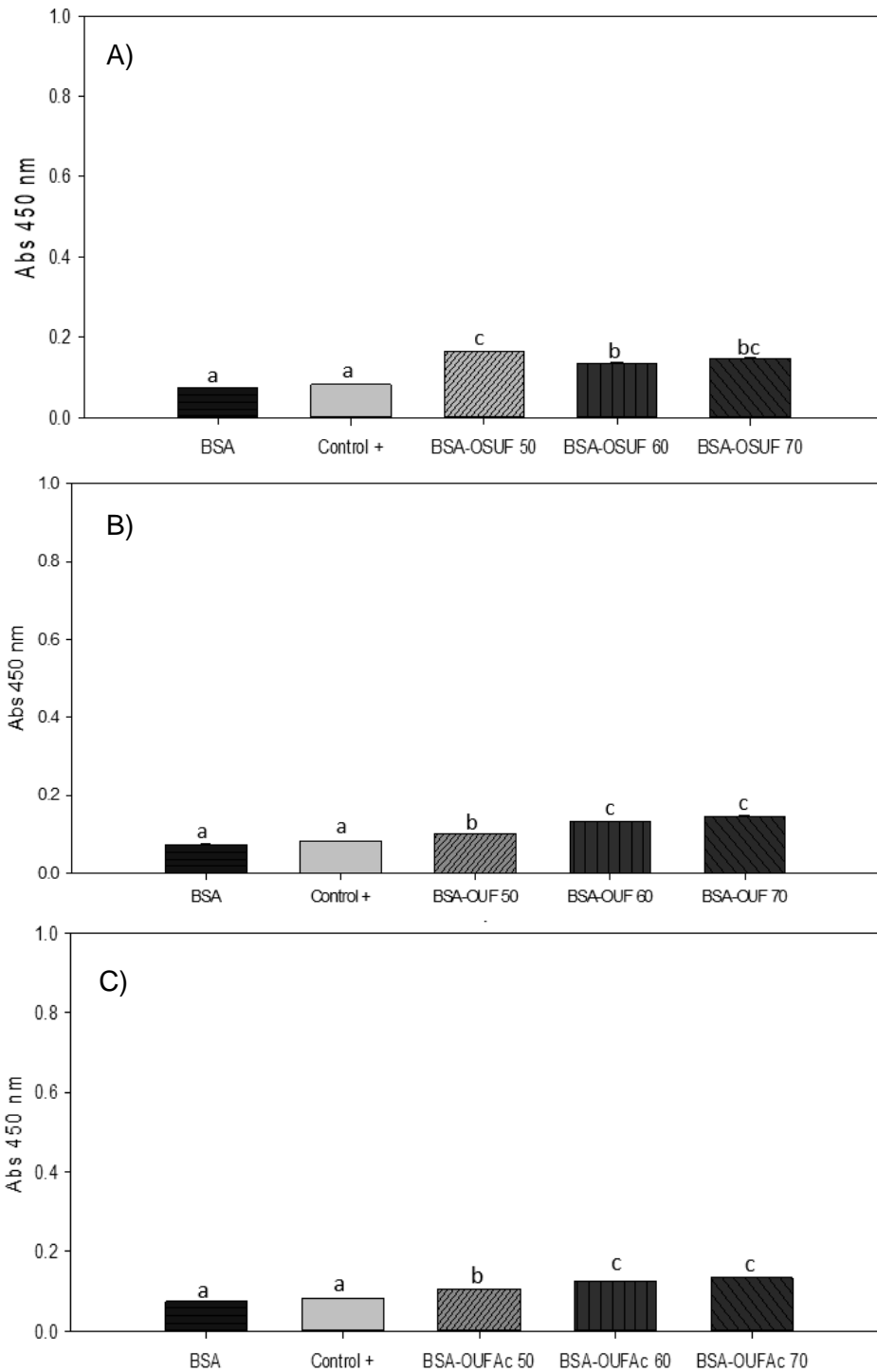


Figura 11. Ensayos de reconocimiento de A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFac neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados con *Escherichia coli* K88 ac.

grupo de neoglicanos ultrafiltrados y re-acetilados (BSA-OUFAC) el tratamiento mayormente reconocido es el sintetizado a 70 °C y en el grupo de neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar el tratamiento sintetizado a 50 °C es el que se reconoce mayormente por las adhesinas bacterianas.

Cabe resaltar que en la interacción con ambas bacterias el neoglicano que se reconoció mayormente fue el sintetizado con oligosacáridos sin ultrafiltrar a 50 °C. De acuerdo con la caracterización realizada sobre este neoglicano en específico, no es el que mostró un mayor cambio en masa molar o mayor reconocimiento en los ensayos con lectina (WGA). Lo que sugiere que el cambio conformacional de la molécula puede ser tal que facilite a las adhesinas bacterianas reconocer las moléculas de carbohidratos.

En el estudio por Pérez (2019), el reconocimiento de neoglicanos de BSA y triacetilglucosamina por cepas de *Escherichia coli* (K88+, K88 ac, K88 ab y K88 ad), presentaron un comportamiento similar a lo observado en el presente estudio para la cepa de *E. coli* K88 ac. Los tratamientos con bacterias muestran un comportamiento similar a los tratamientos con lectinas, pero en menor intensidad, esto posiblemente debido, al menor número de receptores disponibles en las bacterias.

De manera similar, estudios realizados por Sarabia-Sainz et al., (2013), donde al utilizar albúmina sérica bovina (BSA) glicada con galactooligosacáridos el comportamiento observado por reconocimiento por lectinas fue diferente al observado por las cepas de *Escherichia coli*.

Este comportamiento puede ser debido a las características específicas de cada bacteria, además de la posición, acceso y disponibilidad de los carbohidratos en la superficie de la proteína.

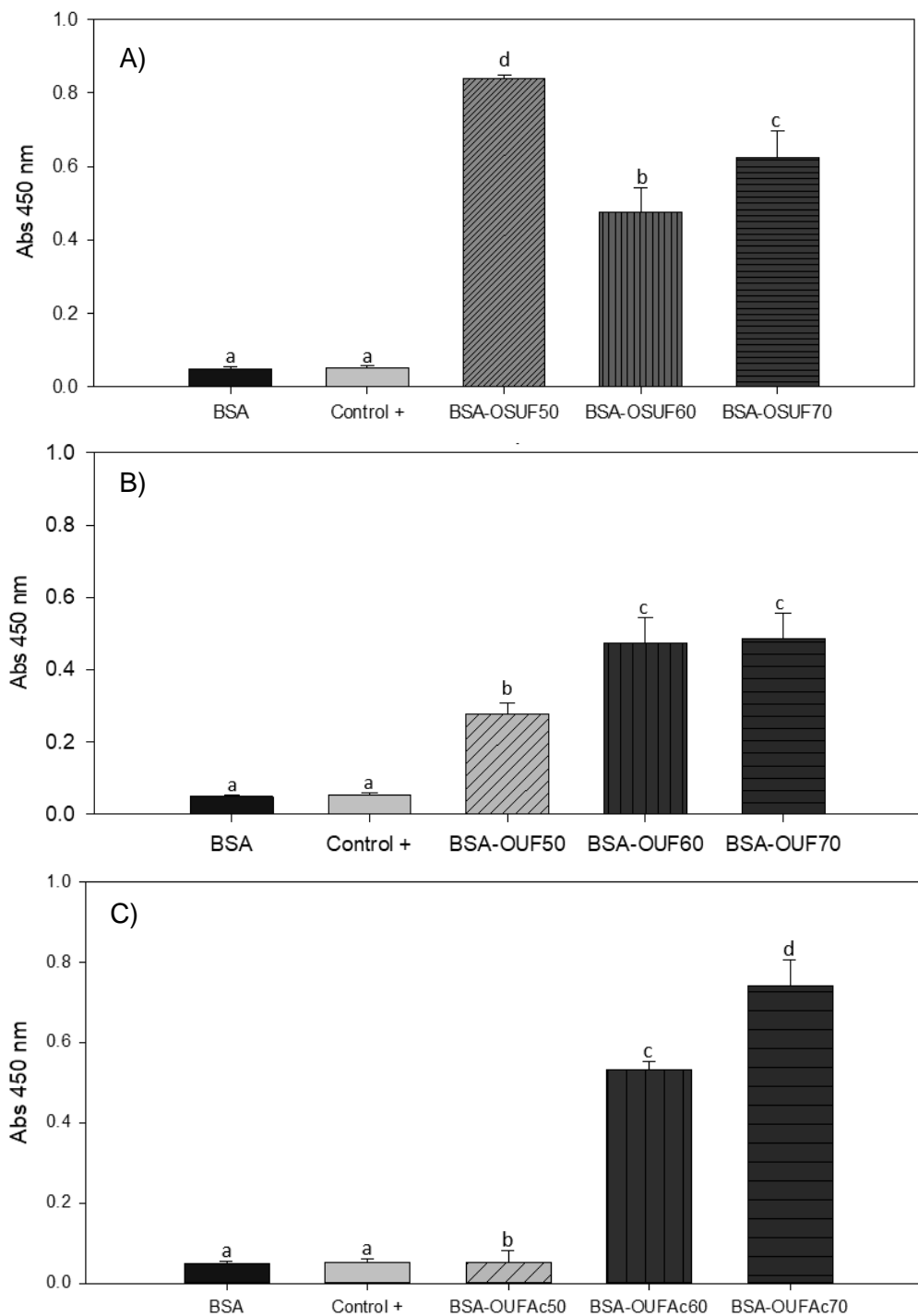


Figura 12. Ensayos de reconocimiento de A) BSA-OSUF neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados obtenidos a 50, 60 y 70 °C, B) BSA-OUF neoglicanos con oligosacáridos sin ultrafiltrar obtenidos a 50, 60 y 70 °C y C) BSA-OUFAc neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados re-acetilados con *Escherichia coli* K88+.

## CONCLUSIONES

Se logró sintetizar tres tipos de neoglicanos a tres condiciones de temperaturas durante la reacción de Maillard, utilizando oligosacáridos de quitosano, oligosacáridos de quitosano separados por ultrafiltración y neoglicanos con oligosacáridos ultrafiltrados y posteriormente re-acetilados.

Por medio de electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras se evidenció un cambio en masa molecular dependiente de la temperatura de glicación, para los tres tipos de oligosacáridos, pudiéndose atribuir este aumento en masa a la adición de los oligosacáridos a la proteína.

Se evidenciaron cambios conformacionales en la estructura terciaria de la proteína, por medio de espectrometría de fluorescencia, atribuidos a los tratamientos de glicación aplicados

Por medio de Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier se identificaron señales típicas de las estructuras oligosacáridas empleadas, lo que permitió demostrar que la conjugación se llevó a cabo.

Los neoglicanos fueron reconocidos por la lectina de germen de trigo (WGA), específica para N-acetilglucosamina y glucosamina. Los tratamientos mayormente reconocidos fueron los obtenidos por glicación a 70°C, en los tres grupos de neoglicanos sintetizados.

La glicación de BSA con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y re-acetilados fue la que mostró mayor reconocimiento por parte de la lectina WGA.

El reconocimiento por las bacterias fue mayor hacia el neoglicano con oligosacáridos sin ultrafiltrar (BSA-OSUF) sintetizado a 50 °C, tanto para *E. coli* K88 ac como para *E. coli* K88+. Las diferencias entre el biorreconocimiento de bacterias y lectinas pueden deberse a interferencias por el tamaño de las mismas.

*E. coli* K88+ presentó adhesinas con mayor afinidad que *E. coli* K88 ac hacia los neoglicanos sintetizados

Se obtuvieron neoglicanos con capacidad de biorreconocimiento por adhesinas bacterianas.

## RECOMENDACIONES

Continuar desarrollando moléculas con potencial profiláctico. Se recomienda buscar una manera de mejorar la síntesis de la estructura de N-acetilglucosamina, y otras estructuras de carbohidratos de interés, de tal forma que estén disponible en la superficie de la molécula proteica.

Utilizar la bioinformática como herramienta para establecer modelos tridimensionales para un mayor estudio de las moléculas glicadas y la forma en la que el reconocimiento se lleva a cabo, y así elucidar la conformación que propicia el reconocimiento por parte de las adhesinas bacterianas.

Se recomienda evaluar el reconocimiento de las estructuras sintetizadas por otros géneros de bacterias que han mostrado reconocimiento hacia esas estructuras.

Continuar con estudios *in-vivo*, para evidenciar la anti-adherencia dentro de un organismo con las diferentes bacterias patógenas que se han estudiado.

## REFERENCIAS

- Afrin, R., y Ikai, A. (2014). Subunit unbinding mechanics of dimeric wheat germ agglutinin (WGA) studied by atomic force microscopy. *FEBS Letters*, 588(23), 4472-4477.
- Anguizola, J., Matsuda, R., Barnaby, O. S., Hoy, K. S., Wa, C., DeBolt, E., Koke, M., y Hage, D. S. (2013). Review: Glycation of human serum albumin. *Clinica Chimica Acta*, 425, 64-76.
- Arnaud, J., Audfray, A., y Imberty, A. (2013). Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. *Chemical Society Reviews*, 42(11), 4798.
- Asadi, A., Razavi, S., Talebi, M., y Gholami, M. (2019). A review on anti-adhesion therapies of bacterial diseases. *Infection*, 47(1), 13-23.
- Berg, J. M., Stryer, L., y Tymoczko, J. L. (2007). Bioquímica. España. Reverté.
- Bhagavan, N., y Ha, C. (2015). *Essentials of Medical Biochemistry: With Clinical Cases*. Maarsen, Países Bajos: Academic Press.
- Bouguéneq, C. L. (2005). Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 471-478.
- Callis, P. R. (2014). Binding phenomena and fluorescence quenching. II: Photophysics of aromatic residues and dependence of fluorescence spectra on protein conformation. *Journal of Molecular Structure*, 1077, 22-29.
- Cao, L., Diedrich, J. K., Ma, Y., Wang, N., Pauthner, M., Park, S.-K. R., Delahunty C. M., McLellan, J. S., Burton, SD R., Yates, J. R., y Paulson, J. C. (2018). Global site-specific analysis of glycoprotein N-glycan processing. *Nature Protocols*, 13(6), 1196-1212.
- Cardoso, H. B., Wierenga, P. A., Gruppen, H., y Schols, H. A. (2018). Maillard induced glycation behaviour of individual milk proteins. *Food Chemistry*, 252, 311-317.
- Cegelski, L., Smith, C. L., & Hultgren, S. J. (2017). Microbial Adhesion. *Encyclopedia of microbiology*, (pp. 93-102). Maarsen, Países Bajos: *Reference Module in Biomedical Sciences*

- Cohen, M., y Varki, A. (2014). Modulation of Glycan Recognition by Clustered Saccharide Patches. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 308, 75-125.
- Colombo, C., Pitirollo, O., y Lay, L. (2018). Recent Advances in the Synthesis of Glycoconjugates for Vaccine Development. *Molecules*, 23(7), 1712.
- Costa, J. (2017). Glycoconjugates from extracellular vesicles: Structures, functions, and emerging potential as cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica, Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1868(1), 157-166.
- Cozens, D., y Read, R. C. (2012). Anti-adhesion methods as novel therapeutics for bacterial infections. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(12), 1457-1468.
- Dashnau, J. L., Zelent, B., y Vanderkooi, J. M. (2005). Tryptophan interactions with glycerol/water and trehalose/sucrose cryosolvents: infrared and fluorescence spectroscopy and ab initio calculations. *Biophysical Chemistry*, 114(1), 71-83.
- Douëllou, T., Montel, M. C., y Thevenot Sergentet, D. (2017). Invited review: Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. *Journal of Dairy Science*, 100(5), 3348-3359.
- Fayle, S. E., J. A. Gerrard, (2002). *The Maillard Reaction*. (Vol. 5) Great Britain. Royal Society of Chemistry.
- Frister, H., Meisel, H., y Schlimme, E. (1988). OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chloride as thiol component. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 330(7), 631-633.
- Fu, X., Liu, Q., Tang, C., Luo, J., Wu, X., Lu, L., y Cai, Z. (2019). Study on structural, rheological and foaming properties of ovalbumin by ultrasound-assisted glycation with xylose. *Ultrasonics sonochemistry*, 58, 104644.
- Goldstein, I. J., Winter, H. C., y Poretz, R. D. (1997). Plant lectins: tools for the study of complex carbohydrates. (1ra ed.) *Glycoproteins II*, (pp. 403-474). Amsterdam, Países Bajos. Elsevier
- Grange, P. A., Erickson, A. K., Levery, S. B., y Francis, D. H. (1999). Identification of an Intestinal Neutral Glycosphingolipid as a Phenotype-Specific Receptor for the K88ad Fimbrial Adhesin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 67(1), 165-172.

- Hinton, D. J. S., y Ames, J. M. (2006). Site specificity of glycation and carboxymethylation of bovine serum albumin by fructose. *Amino Acids*, 30(4), 425-434.
- Huttunen, S., Toivanen, M., Liu, C., y Tikkanen-Kaukanen, C. (2016). Novel anti-infective potential of salvianolic acid B against human serious pathogen *Neisseria meningitidis*. *BMC Research Notes*, 9(1), 1-6.
- Irish, Geoffrey G., David D. Maenz, y Henry L. Classen. (1999). A New Assay for Functional Lectins: The Brush Border Lectin Agglutination Assay (BBLAA). *Animal Feed Science and Technology* 76(3):321–33.
- Jackson, P., y Gallagher, J. T. (1997). *A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis* (1997 ed.). Basel, Switzerland: Birkhauser.
- Kim, D.-Y., y Shin, W.-S. (2015). Characterisation of bovine serum albumin–fucoidan conjugates prepared via the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 173, 1-6.
- Kirmiz, C., Chu, C. S., y Lebrilla, C. B. (2007). The Use of Lectins in Bioaffinity MALDI Probes. *Lectins*. Amsterdam. Elsevier Science B.V.
- Krachler, A. M., y Orth, K. (2013). Targeting the bacteria–host interface. *Virulence*, 4(4), 284-294.
- Kumari, A., Koyama, T., Hatano, K., y Matsuoka, K. (2016). Synthetic assembly of novel avidin-biotin-GlcNAc (ABG) complex as an attractive bio-probe and its interaction with wheat germ agglutinin (WGA). *Bioorganic Chemistry*, 68, 219-225.
- Laborín Antúnez, A. (2017). *Síntesis y caracterización de neoglicanos obtenidos por conjugación de albúmina sérica bovina y oligosacáridos de goma de algarroba*. (Tesis de maestría) Universidad de Sonora. Sonora, México.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Laroque, D., Inisan, C., Berger, C., Vouland, É., Dufossé, L., y Guérard, F. (2008). Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chemistry*, 111(4), 1032–1042.
- Ledesma-Osuna, A. I., Ramos-Clamont, G., Guzman-Partida, A. M., y Vazquez-Moreno, L. (2010). Conjugates of bovine serum albumin with chitin oligosaccharides prepared through the Maillard reaction. *J Agric Food Chem*, 58(22), 12000–12005.



- Li, Y., Song, H., Xiong, S., Tian, T., Liu, T., y Sun, Y. (2018). Chitosan-stablized bovine serum albumin nanoparticles having ability to control the release of NELL-1 protein. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 672–680.
- Liu, X., Liu, J., Zhang, W., Pearce, R., Chen, M., Zhang, T., y Liu, B. (2020). Effect of the degree of glycation on the stability and aggregation of bovine serum albumin. *Food Hydrocolloids*, 106, 105892.
- López Vázquez, E. Gpe, y Villalobos Figueroa, J. I. (2015). *Reconocimiento y Caracterización de Neoglicanos de Albúmina Sérica Bovina y Manosas Obtenidos a Través de La Reacción de Maillard*. (Tesis de Licenciatura) Universidad de Sonora. Sonora, México.
- Lund, M. N., & Ray, C. A. (2017). Control of Maillard Reactions in Foods: Strategies and Chemical Mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(23), 4537–4552.
- Mao, Y., Daly, T. J., y Li, N. (2020). Lys-Sequencer: An algorithm for de novo sequencing of peptides by paired single residue transposed Lys-C and Lys-N digestion coupled with high-resolution mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(3), 1-13.
- Martineau, P. (1990). Analysis of the role of tryptophan residues in the Fluorescence of the maltose-binding protein according to a simple model. *Journal of Molecular Biology*, 214(1), 350–352.
- Meng, C., Sasmal, A., Zhang, Y., Gao, T., Liu, C.-C., Khan, N., Varki, A., Wang, F., y Cao, H. (2018). Chemoenzymatic Assembly of Mammalian O-Mannose Glycans. *Angewandte Chemie International Edition*, 57(29), 9003-9007.
- Mislovičová, D., Gemeiner, P., Kozarova, A., y Kožár, T. (2009). Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. *Biologia*, 64(1), 1-19.
- Nabi, R., Alvi, S. S., Shah, M. S., Ahmad, S., Faisal, M., Alatar, A. A., y Khan, M. S. (2020). A biochemical & biophysical study on in-vitro anti-glycating potential of iridin against d-Ribose modified BSA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 686, 108373.
- Nash, A. A., Dalziel, R. G., y Fitzgerald, J. R. (2015). Recovery from Infection. *Mims' Pathogenesis of Infectious Disease*, Escocia, Gran Bretaña. Elsevier.
- Nikitina, Valentina E., Ekaterina A. Loshchinina, y Elena P. Vetchinkina. (2017). Lectins from Mycelia of Basidiomycetes. *International Journal of Molecular Sciences* 18(7), 1334.

- Nilsson, Carol L. (2007). Lectins: analytical tools from nature. *Lectins*, Amsterdam, Países Bajos. Elsevier Science B.V.
- Oteo, J., y Belén Aracil, M. (2015). Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: Staphylococcus aureus resistente a meticilina,  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(S2), 27-33.
- Palaniappan, K. K., y Bertozzi, C. R. (2016). Chemical Glycoproteomics. *Chemical Reviews* 116(23), 14277–306.
- Patel, Seema, Nithya Mathivanan, y Arun Goyal. (2017). Bacterial Adhesins, the Pathogenic Weapons to Trick Host Defense Arsenal. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93, 763–71.
- Palomo, V., Cistrone, P. A., Zhan, N., Palui, G., Mattoussi, H., y Dawson, P. E. (2018). Efficient Assembly of Quantum Dots with Homogenous Glycans Derived from Natural N-linked Glycoproteins. *Bioconjugate Chemistry*. 29(9), 3144-3153
- Peniche, C., Elvira Pujalte, Carlos., Gallardo, A., y San Roman, J. (2001). Quitosano: un polisacárido natural biodegradable y biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. *Revista de Plásticos Modernos: Ciencia y Tecnología de Polímeros*, 535, 81–91.
- Pereira, A. L., y Loreny G. G. (2013). Adhesion of Diarrheagenic Escherichia Coli and Inhibition by Glycocompounds Engaged in the Mucosal Innate Immunity. *Biology* 2(2), 810–31.
- Perez Chenoweth, G. (2019). *Síntesis de Glicoconjugados a partir de Albúmina Sérica Bovina y Triacetilglucosamina para el Análisis de Unión a Lectinas Asociadas al Reconocimiento Bacteriano*. (Tesis de Licenciatura) Universidad de Sonora. Sonora, México.
- Rodriguez Romero, C. I. (2016). *Caracterización de Neoglicanos de Albúmina Sérica Bovina y Oligosacáridos de Quitina Obtenidos Por Aminación Reductiva*. (Tesis de Licenciatura) Universidad de Sonora. Sonora, México.
- Saarela, S., Taira, S., Nurmiaho-Lassila, E. L., Makkonen, A., y Rhen, M. (1995). The Escherichia coli G-fimbrial lectin protein participates both in fimbrial biogenesis and in recognition of the receptor N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of bacteriology*, 177(6), 1477-1484.
- Saeedi, P., Yazdanparast, M., Behzadi, E., Salmanian, A. H., Mousavi, S. L., Nazarian, S., S y Amani, J. (2017). A Review on Strategies for Decreasing *Escherichia coli* O157:H7 risk in Animals. *Microbial Pathogenesis* 103, 186–95.

- Sharon, N. (2006). Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1760(4), 527-537.
- Santos, A. F., Da Silva, M. D. C., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Correia, M. D. S., y Coelho, L. C. B. B. (2014). Lectins: Function, Structure, Biological Properties and Potential Applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research* (15) 41-62.
- Sarabia-Sainz, H. M., Armenta-Ruiz, C., Sarabia-Sainz, J. A., Guzmán-Partida, A. M., Ledesma-Osuna, A. I., Vázquez-Moreno, L., y Montfort, G. R. C. (2013). Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to neoglycans synthesised with prebiotic galactooligosaccharides. *Food Chemistry*, 141(3), 2727–2734.
- Sarabia-Sainz, A. I., Ramos-Clamont, G., Winzerling, J., & Vazquez-Moreno, L. (2011). Bacterial recognition of thermal glycation products derived from porcine serum albumin with lactose. *Acta Biochim Pol*, 58(1), 95–100
- Sarabia-Sainz, A. I., Ramos-Clamont, G., Candia-Plata, M.C., y Vazquez-Moreno, L. (2009). Biorecognition of *Escherichia Coli* K88 Adhesin for Glycated Porcine Albumin. *International Journal of Biological Macromolecules* 44(2), 175–81.
- Saraswathy, N., y Ramalingam, P. (2011). *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* (1.<sup>a</sup> ed.). New York, NY: Woodhead Publishing.
- Sattin, S., y Bernardi, A. (2016). Glycoconjugates and Glycomimetics as Microbial Anti-Adhesives. *Trends in Biotechnology* 34(6):483–495.
- Sharon, N., y Ofek, I. (2000). Safe as Mother's Milk: Carbohydrates as Future Anti-Adhesion Drugs for Bacterial Diseases. *Glycoconjugate Journal*, 17(7), 659–664.
- Sharon, N. (2006). Carbohydrates as Future Anti-Adhesion Drugs for Infectious Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760(4), 527–537.
- Sindrewicz, P., Li, X., Yates, E. A., Turnbull, J. E., Lian, L.-Y., y Yu, L.-G. (2019). Intrinsic tryptophan fluorescence spectroscopy reliably determines galectin-ligand interactions. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Snehalatha, M., Ravikumar, C., Hubert Joe, I., Sekar, N., y Jayakumar, V. S. (2009). Spectroscopic analysis and DFT calculations of a food additive carmoisine. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 72(3), 654–662.
- Soman, A. N., Sharon, N., Ofek, I., y Schwartzman, J. D. (2015). Adhesion and Colonization. *Molecular Medical Microbiology*, 1(2), 409-421.

- Stein, D. C., y Briken, V. (2010). Antigenic Variation of Microbial Surface Glycosylated Molecules. *Microbial Glycobiology*. San Diego, USA. Elsevier.
- Struwe, W. B., y Robinson, C. V. (2019). Relating Glycoprotein Structural Heterogeneity to function – insights from Native Mass Spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology*, 58, 241-248.
- Sun, X., y Wu, J., (2017). Food Derived Anti-Adhesive Components against Bacterial Adhesion: Current Progresses and Future Perspectives. *Trends in Food Science & Technology* 69(A),148–156.
- Tan, M., Liang, W., Luo, C., y Gu, Y. (2013). Fluorescence Spectroscopy Study on the Interaction between Evodiamine and Bovine Serum Albumin. *Journal of Chemistry*, 2013, 1-6.
- Tang, R., Faisal, M., Alatar, A. A., Alsaleh, A. N., Saeed, M., y Ahmad, S. (2020). Glycation of heme-protein, “Myoglobin” by 3-Deoxyglucosone: Implications in Immunogenicity. *Journal of King Saud University - Science*. 32(5), 2598-2602
- Tang, Y. W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I., Schwartzman, J., y Sails, A. (2014). *Molecular Medical Microbiology* (2.<sup>a</sup> ed., Vol. 1). Maarsen, Países Bajos: Elsevier Gezondheidszorg.
- Tizard, I. R., y Gómez-Lucia, M. E. (2009). *Inmunología Veterinaria:8a edición*. Elsevier Science Health Science Division.
- Uversky, V. N. (2007). *Methods in Protein Structure and Stability Analysis: Luminescence spectroscopy and circular dichroism*. Nueva York, USA. Nova Publishers.
- Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Marth, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Marth, J. D., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., y Etzler, M. E. (2009). Symbol nomenclature for glycan representation. *Proteomics*, 9(24), 5398-5399.
- Varki, A., Cummings, R. D., Aebi, M., Cumming, S. R., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, Markus., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R.L., y Seeberger. P. H. (2015). *Essential of Glycobiology*, 3<sup>rd</sup> edition. New York: Cold Spring Harbor.
- van Buul, V. J., y Brouns, F. J. P. H. (2014). Health effects of wheat lectins: A review. *Journal of Cereal Science*, 59(2), 112-117.
- Verbert, A., y Cacan, R. (2001). Cell Surface Glycoconjugates. eLS John Wiley & Sons, Ltd. 1-6.

- Voet, D., Voet, J. G., y Pratt, C. W. (2007). *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry*. Ed.Médica Madrid, España. Panamericana
- von der Lieth, C. W., Lütteke, T., y Frank, M., (2006). The Role of Informatics in Glycobiology Research with Special Emphasis on Automatic Interpretation of MS Spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1760(4), 568–577.
- Westerlund-Wikström, B., y Korhonen, T. K. (2005). Molecular Structure of Adhesin Domains in *Escherichia coli* fimbriae. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6–7), 479–86.
- Xia, S., Li, Y., Zhao, Q., Li, J., Xia, Q., Zhang, X., y Huang, Q. (2015). Probing Conformational Change of Bovine Serum Albumin–Dextran Conjugates under Controlled Dry Heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(16), 4080–86.
- Yang, Z., y Hancock, W. S. (2004). Approach to the Comprehensive Analysis of Glycoproteins Isolated from Human Serum Using a Multi-Lectin Affinity Column. *Journal of Chromatography A* 1053(1), 79–88.
- York, W. S., Kochut, K. J., y Miller, J. A. (2010). Integration of Glycomics Knowledge and Data. *Handbook of Glycomics*. Academic Press, San Diego, USA. Elsevier.
- Zhang, Q., Ames, J. M., Smith, R. D., Baynes, J. W., y Metz, T. O. (2009). A Perspective on the Maillard Reaction and the Analysis of Protein Glycation by Mass Spectrometry: Probing the Pathogenesis of Chronic Disease. *Journal of Proteome Research* 8(2), 754–769
- Zoellner, H., Hou, J. Y., Hochgrebe, T., Poljak, A., Duncan, M. W., Golding, J., Henderson, T., & Lynch, G. (2001). Fluorometric and mass spectrometric analysis of nonenzymatic glycosylated albumin. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(1), 83–89.