



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Estudio del efecto de lectinas vegetales sobre los procesos de migración y proliferación celular en queratinocitos epidérmicos**

Tania Milena Cortázar Hernández

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C.  
2019





UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Study of the effect of plant lectins on the processes of migration and cell proliferation in epidermal keratinocytes**

Tania Milena Cortázar Hernández

National University of Colombia  
Science Faculty  
Chemistry Department  
Bogotá D.C.

**2019**

# **Estudio del efecto de lectinas vegetales sobre los procesos de migración y proliferación celular en queratinocitos epidérmicos**

Tania Milena Cortázar Hernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias - Bioquímica

Directora:

Nohora Angélica Vega Castro, Dr Sci  
Línea de Investigación: Lectinas de Leguminosas  
Grupo de Investigación en Proteínas, GRIP

Codirectora:

Yadi Adriana Umaña Pérez, Dr. Sci  
Línea de Investigación: Mecanismos de Señalización Celular  
Grupo de Investigación en Hormonas, GIH

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias  
Departamento de Química  
Bogotá D.C.  
2019

## **Dedicatoria**

Consagro este trabajo a mis amados progenitores, Luz Myriam Hernández Parra (q.e.p.d) y Diego Lisandro Cortázar Gutiérrez, quienes me hicieron ver la Armonía entre la Ciencia, el Arte y la Vida, de manera Librepensadora.

## **Lemas**

*“...Para crear caos de manera eficiente hace falta un poco de orden...”*

Jeremy England, Físico Estadístico, MIT.

*“...Estamos a expensas de la armonía cambiante de las subestructuras...”*

Charles Sherrington, Neurofisiólogo, Cambridge



## Agradecimientos

A mis amados padres Luz Myriam Hernández Parra y Diego Lisandro Cortázar Gutiérrez, quienes se llevan mi mayor admiración por su forma holística de ver la vida y por su fortaleza emergida en los momentos inesperadamente más difíciles.

A mis hermanos, Layla y Diego, por toda la alegría, el apoyo y el cariño.

A Mauricio Guzmán Alonso, por estar siempre ahí, incondicionalmente.

A COLCIENCIAS por brindarme la oportunidad de ser beneficiaria de un crédito educativo condonable bajo la Convocatoria 6172 (617-0656) para Doctorados Nacionales.

A la Profesora Nohora Angélica Vega Castro por permitirme realizar mi trabajo de tesis en el Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP) que ella dirige; de igual manera a la Profesora Yadi Adriana Umaña Pérez, directora del Grupo de Investigación en Hormonas GIH, por aceptar y llevar a cabo la codirección del presente trabajo.

A los integrantes del Grupo de Investigación GRIP por su compañía y amistad.

A los investigadores Iain B.H. Wilson y Johannes Grillari, y a sus equipos de trabajo en el Laboratorio de Glicobiología Molecular y en el Instituto de Biotecnología de la Universidad BOKU (*Universität für Bodenkultur*), por brindarme capacitación y apoyo durante mi estancia de investigación.

A los Profesores Blanca Laura Ortiz, Martha Lucía Serrano, Edgar Antonio Reyes Montaña, Mauricio Urquiza y Martha Nancy Calderón Ozuna, quienes evaluaron los avances de mi tesis en alguna de sus etapas, gracias por aquellos comentarios y aportes que fueron edificadores y proporcionaron valor.

Al profesor Jose Luis Fernandez Alonso del Real Jardín Botánico - CSIC, Madrid (España) e investigador del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia por la identificación y la colaboración en la obtención del contrato de acceso a recurso genético de la especie *Galactia lindenni*.

Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible por otorgar el Contrato de Acceso a Recurso Genético RGE246 para desarrollar las actividades de investigación con la especie *Galactia lindennii*.

A los Profesores Carlos Yesid Soto Ospina, Harold Duban Ardila Barrantes y Coralia Osorio Roa, por el amable préstamo de equipos y reactivos.

## Resumen

Se estudiaron tres lectinas de la familia *Fabacea* (LDG-I y LDG-II de *D. grandiflora*, y LGL-II de *G. lindenii*), y se determinó su especificidad de unión y la influencia de ciertos glicotopes, así como de algunos residuos de azúcares circundantes en el reconocimiento de cada lectina, usando distintas glicoformas de O/N-glicoproteínas, eritrocitos de diferente perfil glicómico y a través del acople molecular *in silico* para la LGL-II. Se evaluó el efecto de las lectinas sobre los procesos de proliferación y migración celular en queratinocitos epidérmicos humanos; y se propuso un modelo de interacciones moleculares promovidas por las mismas. Las lectinas tipo II, *i.e.*, LDG-II y LGL-II (con especificidades por cierto tipo de galactósidos y determinados glicotopes) mostraron efectos positivos sobre la proliferación y la migración en queratinocitos epidérmicos humanos; mientras que la lectina LDG-I (con especificidad por manósidos y otros glicotopes) mostró efecto positivo sobre la proliferación solo en la menor concentración usada e inhibió la migración en todas las condiciones probadas.

La expresión del receptor de crecimiento epidérmico EGFR fosforilado se vió incrementada en lisados de queratinocitos cultivados en presencia de las lectinas tipo II; y se detectó un aumento en la concentración del factor EGF en los sobrenadantes de células cultivadas en presencia de LGL-II. Se observaron algunas similitudes en la especificidad de las lectinas tipo II hacia ligandos conocidos de la galectina-3 (LGALS3), lectina que tiene un papel en la reepitelización de la piel en mamíferos, y se plantean algunas semejanzas en los modelos propuestos de interacciones moleculares de las lectinas LDG-II y LGL-II, con las interacciones conocidas y predichas de la galectina LGALS3 con glicoconjugados celulares encontradas en bases de datos y en artículos publicados. Los resultados obtenidos, nos permiten tener como perspectiva la realización de estudios enfocadas a evaluar el efecto de las lectinas vegetales tipo II, en heridas de piel en modelo mamífero, y el uso potencial de alguna(s) de estas en tratamientos de curación de lesiones cutáneas en humanos, teniendo en cuenta sus efectos y sus especificidades de ligando.

**Palabras clave:** Lectina, *Diocleae*, glicotope, proliferación celular, migración celular, queratinocitos epidérmicos, lesión cutánea.

## Abstract

Three plant lectins from Fabacea family were studied (LDG-I and LDG-II from *D. grandiflora*, and LGL-II from *G. lindenii*); their binding specificity was evaluated and the influence of certain glycotopes as well as some residues of surrounding sugars in the recognition of each lectin was determined using different glycoforms of O/N-glycoproteins, erythrocytes of different glycomic profile and through the in silico molecular docking for LGL-II. Lectins effect on the proliferation and cell migration processes in human epidermal keratinocytes was accessed; and a model of molecular interactions promoted by them was proposed. LDG-II and LGL-II (with specificities for a certain type of galactosides and certain glycotopes) showed proliferative and migration effects in human epidermal keratinocytes; while LDG-I lectin (with specificity for mannosides and other glycotopes) produced positive effect on proliferation only at the lowest concentration used and inhibited migration under all conditions tested.

The expression of the epidermal growth receptor EGFR phosphorylated was increased in lysates of keratinocytes cultured in the presence of the lectins type II; and an increase in the concentration of EGF factor was detected in supernatants of cells cultured in the presence of LGL-II. Some similarities were observed in the specificity of lectins type II towards known ligands of galectin-3 (LGALS3), lectin that has a role in re-epithelialization of the skin in mammals; and some similarities are suggested in the proposed models of molecular interactions of lectins LDG-II and LGL-II, with the known and predicted interactions of galectin-3 LGALS3 with cellular glycoconjugates, found in databases and published articles. The results in the present work allow us to have the prospect of carrying out studies of the effect of plant lectins type II on skin wounds in a mammalian model, and the potential use of some of said lectin (s) in healing treatments of skin lesions in humans, considering their effects and their ligand specificities.

**Keywords:** Lectin, *Diocleae*, glycotope, cell proliferation, cell migration, epidermal keratinocyte, skin lesion.

# Contenido

pág

<b>1. Marco teórico</b>	15
1.1. Lectinas de la Familia <i>Fabaceae</i>	15
1.2. Similitud estructural y diversidad funcional en proteínas con <i>plegamiento tipo lectina de leguminosa</i>	15
1.3. Complementariedad estructural lectina – carbohidrato	18
1.4. Lectinas de la Tribu <i>Diocleae</i>	21
1.4.1. Lectinas de tipo I	22
1.4.2. Lectinas de tipo II	25
1.4.3. Inhibición de las lectinas tipo I y tipo II de la tribu <i>Diocleae</i> por mono-, di- o trisacáridos	26
1.5. Lectinas de <i>Dioclea grandiflora</i> y <i>Galactia lindenii</i>	27
1.5.1. Lectina tipo I de <i>D. grandiflora</i> (LDG-I)	27
1.5.2. Lectinas tipo II de <i>D. grandiflora</i> y <i>G. lindenii</i> .	30
<b>2. Purificación de lectinas de la familia Fabaceae</b>	32
2.1. Introducción	33
2.2. Marco teórico	33
2.2.1. Tioúrea en el buffer de extracción	33
2.2.2. El pH y la actividad lectina	34
2.3. Metodología	34
2.3.1. Extracción y purificación de las lectinas de <i>Dioclea grandiflora</i> (LDG-I y LDG-II)	34
2.3.1.1. Preparación del extracto salino	34
2.3.1.2. Cromatografía de intercambio iónico	35
2.3.1.3. Cromatografía de afinidad	35
2.3.2. Purificación de la lectina LGL-II de <i>Galactia lindenii</i>	35
2.3.3. Cuantificación de proteína	36
2.3.4. Electroforesis de las fracciones de purificación de las lectinas	36
2.3.5. Ensayos de eritroaglutinación	36
2.4. Resultados	37
2.5. Discusión	41
<b>3. Especificidad de las lectinas hacia diferentes glicotopes</b>	43
3.1. Introducción	43
3.2. Marco teórico	44
3.2.1. Glicotopes	44
3.2.2. Glicanos que presentan los grupos histo-sanguíneos	47
3.3. Metodología	50
3.3.1. Evaluación de la especificidad de las lectinas usando glicofomas remodeladas a partir de glicoproteínas	50
3.3.1.1. Biotinilación de las lectinas.	51
3.3.1.2. Preparación de neoglicofomas de glicoproteínas	51
3.3.1.3. <i>Dot-blot</i> con glicofomas de transferrina y fetuina	54
3.3.2. Modelamiento molecular y acople de la lectina LGL-II con diferentes carbohidratos	55
3.3.2.1. Análisis de la secuencia y modelo tridimensional	55
3.3.2.2. Acople molecular	56
3.3.3. Actividad aglutinante de las lectinas sobre eritrocitos con diferente perfil glicómico	56
3.4. Resultados	57
3.4.1. Interacción con glicoproteínas remodeladas	57
3.4.2. Modelamiento de la lectina LGL-II y de su acople molecular con diferentes carbohidratos	58

3.4.2.1.	Modelamiento molecular de la lectina LGL-II	58
3.4.2.2.	Acople molecular de la lectina LGL-II con carbohidratos que representan diferentes glicotopes	60
3.4.3.	Interacción de las lectinas con la superficie de eritrocitos de diferente tipo.	69
3.5.	Discusión	71
3.5.1.	Especificidad de las lectinas	71
3.5.2.	Esquemas funcionales propuestos a partir del refinamiento de la especificidad de las lectinas	84
3.5.3.	Consideraciones del reconocimiento lectina – glicotope propio o foráneo	85
<b>4.</b>	<b>Efecto de las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II sobre los procesos de migración y proliferación de queratinocitos epidérmicos</b>	<b>89</b>
4.1.	Hallazgos	89
4.2.	LGALS3 como modulador de la proliferación y migración celular	89
4.3.	Metodología	95
4.3.1.	Evaluación del efecto de las lectinas LDG-I y LDG-II de <i>Dioclea grandiflora</i> , y LGL-II de <i>Galactia lindenii</i> sobre los procesos de proliferación y migración en queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat	95
4.3.1.1.	Cultivos de queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat	96
4.3.1.2.	Evaluación de la viabilidad y proliferación celular en presencia de las lectinas	97
4.3.1.3.	Evaluación de la proliferación celular usando azul de tripán	98
4.3.1.4.	Evaluación de la migración celular ( <i>Scratch assay</i> )	99
4.3.1.5.	Expresión endógena del factor de crecimiento epidérmico	99
4.3.1.6.	Expresión y activación de quinasas en presencia de las lectinas	100
4.4.	Resultados	100
4.4.1.	Viabilidad y proliferación de queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat en presencia de las lectinas	101
4.4.2.	Migración celular en presencia de lectinas	105
4.4.3.	Secreción endógena del factor EGF en presencia de las lectinas	110
4.4.4.	Expresión o activación de quinasas en presencia de las lectinas	111
4.5.	Discusión de resultados de los efectos de las lectinas LDG-I y LDG-II de <i>D. grandiflora</i> , y LGL-II de <i>G. lindenii</i> sobre los procesos de migración y proliferación de queratinocitos epidérmicos	114
4.5.1.	Generalidades	114
4.5.2.	Proliferación y migración celular – relación con la especificidad de las lectinas	115
4.5.2.1.	Proliferación celular	116
4.5.2.2.	Migración celular	129
<b>5.</b>	<b>Discusión general</b>	<b>134</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos</b>	<b>142</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>157</b>

# Lista de Figuras

---

## Figura Título de la figura

- Figura 1-1. Localización inmunocitoquímica de una lectina de *Dioclea lehmanni* en las semillas
- Figura 1-2. Estructura general de proteína con *plegamiento tipo lectina de leguminosa*.
- Figura 1-3. Esquemas del *plegamiento tipo lectina de leguminosa*.
- Figura 1-4. 1-4. Estructura terciaria y cuaternaria de lectinas
- Figura 1-5. Esquemas de complejos multivalentes lectina - ligando.
- Figura 1-6. Perfiles de interacción lectina – carbohidrato.
- Figura 1-7. Motivos de aminoácidos en el sitio de reconocimiento
- Figura 1-8. Clados de plantas de la tribu *Diocleae*.
- Figura 1-9. Plantas fuentes de las lectinas.
- Figura 1-10. Estructura de la lectina LDG-I de *D. grandiflora*.
- Figura 1-11. Contactos interdiméricos en la LDG-I.
- Figura 1-12. Estructuras de oligomanósidos que interactúan con lectinas tipo I.
- Figura 1-13. Carbohidratos que pueden ser reconocidos por lectinas tipo II de la Tribu Diocleae
- Figura 2-1. Uso de tiourea en la extracción de semillas.
- Figura 2-2. Purificación de las lectinas de *Dioclea grandiflora*.
- Figura 2-3. Purificación de la lectina LGL-II de *Galactia lindenii*.
- Figura 3-1. Microheterogeneidad de los glicoconjugados.
- Figura 3-2. Biotinilación de las lectinas.
- Figura 3-3. Estructuras de N-glicanos en las glicofomas de transferrina humana *post remodelamiento enzimático in vitro*.
- Figura 3-4. Estructuras de O/N-glicanos en las glicofomas de fetuina bovina *post remodelamiento enzimático in vitro*.
- Figura 3-5. Comparación de las secuencias de las lectinas *Dioclea lehmanni II* y *Camptosema ellipticum*
- Figura. 3-6. Estructura de LGL-II propuesta por Quintero, 2014 y Carreño *et al*, 2016.
- Figura 3-7. Dotblot del reconocimiento de glicofomas de transferrina humana y fetuina bovina por las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II.
- Figura 3-8. Estructura tridimensional de LGL-II
- Figura 3-9. Sitio de unión a ligando.
- Figura 3-10. Diagrama Ramachandran para el modelo de LGL-II
- Figura 3-11. Interacción de LGL-II con el determinante H-tipo II
- Figura 3-12. Interacciones de LGL-II con el disacárido Fuca $\alpha$ 1,2Gal.
- Figura 3-13. Interacciones de LGL-II con el disacárido sialilado NeuAca $\alpha$ 2,3Gal.
- Figura 3-14. Interacciones de LGL-II con el trisacárido sialilado NeuAca $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc
- Figura 3-15. Interacciones de LGL-II con el glicotipe disacárido Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (LacNAc).
- Figura 3-16. Interacción de LGL-II con el monosacárido GalNAc
- Figura 3-17. Unidades estructurales de carbohidratos presentes en mucinas salivares.
- Figura 3-18. Representación esquemática de la mucina submaxilar porcina nativa (MSP) y la asialo-MSP solo con residuos  $\alpha$ -GalNAc (Tn-MSP)

---

**Figura      Título de la figura**

- Figura 3-19. Representación esquemática de lectinas que se unen a glicoproteínas vía el mecanismo de difusión interna.
- Figura 3-20. Esquema de interacción de lectinas con glicoesfingolípidos que presentan Fuc $\alpha$ 1,2 expuesta o el núcleo  $\alpha$ 1,3-Fuc menos expuesto
- Figura 3-21. Estructuras de grupos histo-sanguíneos presentes en glicoesfingolípidos (GELs) de membrana de células epiteliales
- Figura 3-22. Esquemas funcionales de la especificidad de las lectinas.
- Figura. 3-23.Reconocimiento de glicanos propios o foráneos, dependiente de densidad.
- Figura. 3-24.Interacción de las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II con el anticuerpo anti-peroxidasa de rábano.
- Figura 4-1. Interacción de galectina-3 polimérica con glicanos de receptores transmembranales.
- Figura 4-2. Secuestro de EGFR en redes con LGALS3.
- Figura 4-3. Cascadas de señalización por proteína quinasa regulada por señal extracelular ERK
- Figura 4-4. Cascadas de señalización PI3K-PKB/Akt.
- Figura 4-5. Componentes del proceso de migración.
- Figura 4-6. Complejo Lm332-integrinas-EGFR promovido por LGALS3 induce la migración celular.
- Figura 4-7. Ensayo “cierre de rasguño”.
- Figura 4.8. Análisis de imagen de rasguño de monocapa.
- Figura 4-9. Ensayo ELISA para EGF humano
- Figura 4-10. Cultivo de queratinocitos epidérmicos humanos HaCat
- Figura 4-11. Concentración CI50 de las lectinas sobre queratinocitos epidérmicos HaCat.
- Figura 4-12. Proliferación relativa de queratinocitos HaCat en presencia de lectinas a 1.5  $\mu$ g/mL.
- Figura 4-13. Efecto de las lectinas sobre la migración de queratinocitos epidérmicos humanos HaCat.
- Figura 4-14. Porcentaje de ancho del rasguño
- Figura 4-15. Migración de queratinocitos en presencia de las lectinas LDG-II y LGL-II preincubadas o no con lactosa.
- Figura 4-16. Protuberancias en la membrana celular de queratinocitos HaCat cultivados en presencia de las lectinas LDG-II y LGL-II.
- Figura 4-17. Inmunodetección con anticuerpos contra EGFR total y contra tirosina fosforilada.
- Figura 4-18. Inmunodetección con anticuerpos contra serina/treonina fosforilada y  $\alpha$ -tubulina.
- Figura 4-19. Ilustración estructural del receptor EGFR.
- Figura 4-20. Glicoformas en el receptor EGFR.
- Figura 4-21. N-glicano oligomanósido en la estructura del receptor EGFR
- Figura 4-22. N-glicanos del receptor EGFR que presentan núcleo  $\alpha$ 1,6-fucosa.
- Figura 4-23. N-glicanos del receptor EGFR que presentan sialilación  $\alpha$ 2,3.
- Figura 4-24. Estructura de ramificaciones producidas por la actividad de glicosiltransferasas en N-glicanos.
- Figura 4-25. N-glicano en la estructura del receptor EGFR que presenta GlcNAc $\beta$  terminal.
- Figura 4-26. Estructura típica de un N-glicano que contiene poli-LacNAc
- Figura 4-27. Efecto de gangliósidos sobre la actividad del receptor tirosina quinasa EGFR.
- Figura 4-28. Representación esquemática de la membrana plasmática con dos tipos de receptores de crecimiento y su interacción con una lectina con especificidad por LacNAc.
- Figura 4-29. Influencia de la estructura de los glicanos de las integrinas sobre la unión de

---

**Figura**    **Título de la figura**

lectinas con afinidad por LacNAc.

Figura 4-30. Vías de señalización proliferativa en mamíferos.

Figura 4-31. Mayores centros de actividad (hubs) y sus funciones principales en queratinocitos.

Figura 4-32. Redes de interacciones según localización, dependientes de las lectinas

Figura 4-33. Red de interacciones funcionales en queratinocitos cultivados en presencia de LGL-II

# Lista de Abreviaturas

---

Abreviatura	Término
BCA	Ácido bicinconínico
CK1	Proteína quinasa de caseína
CMI	Concentración mínima inhibitoria
ConA	Concanavalina A
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DEAE	Dietilaminoetanol
DMEM	Medio de cultivo celular modificado del medio Eagle (MEM).
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPT	Dermatopontina
DRC	Dominio de reconocimiento de carbohidrato
DTT	Ditiotreitol
ECA	Aglutinina de <i>Erythrina cristagalli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
ESCRT	Complejo endosomal requerido para la maquinaria de transporte
ESM	Error estándar de la media
ET	Extracto total
FAK	Proteína quinasa de adhesiones focales
<i>Fibronectina</i>	Fibronectina con dominio A extra
EDA	
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FNC	Matriz de fibronectina y colágeno
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil-galactosamina
Glc	Glucosa
GlcNac	N-acetil-glucosamina
GnT-III	N-acetilglucosaminiltransferasa III
GRIP	Grupo de Investigación en Proteínas de la Universidad Nacional
GSH	Glutación
GST	Glutación S transferasa
ASB	Albúmina de suero bovino
EGF	Factor de crecimiento epidérmico

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>H -Tipo II</i>	Antígeno histo-sanguíneo H tipo II
<i>HaCat</i>	Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizada espontáneamente
<i>kDa</i>	kiloDalton
<i>Lac</i>	Lactosa
<i>LacNAc</i>	N-acetil-lactosamina
<i>LCE</i>	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
<i>LDL</i>	Lectina de <i>Diocleae lehmanni</i>
<i>LDS</i>	Lectina de <i>Diocleae sericea</i>
<i>LDG</i>	Lectina de <i>Diocleae grandiflora</i>
<i>LfDB</i>	Base de datos <i>Lectin frontier DataBase</i>
<i>LGL</i>	Lectina de <i>Galactia lindenii</i>
<i>LGALS3</i>	Galectina 3 de origen mamífero
<i>Lm111</i>	Laminina 111
<i>Lm332</i>	Laminina 332
<i>Man</i>	Manosa
<i>MAPK</i>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
<i>MEC</i>	Matriz extracelular
<i>MMPs</i>	Metaloproteasas de matriz extracelular
<i>MTT</i>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<i>NMWL</i>	Límite de peso molecular nominal.
<i>NR</i>	No reportado
<i>PAK1</i>	Serina/treonina proteína quinasa 1
<i>PBS</i>	<i>Buffer</i> fosfato salino
<i>PDB</i>	Base de datos <i>Protein Data Bank</i>
<i>p-EGFR</i>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico fosforilado
<i>p-ERK</i>	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares fosforilada
<i>pI</i>	Punto isoeléctrico
<i>RIPA</i>	<i>Buffer</i> usado para lisar y extraer proteínas de extractos celulares
<i>RPMI</i>	Medio de cultivo celular del <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>Rac1 GTPasa</i>	Proteína G, miembro de la familia de GTPasas <i>Rho</i>
<i>RCA</i>	Agglutinina de <i>Ricinus communis</i>
<i>Sac</i>	sacarosa
<i>SDS</i>	Lauril sulfato de sodio
<i>SDS-PAGE</i>	Electroforesis en gel de poliacrilamida realizada en presencia de lauril sulfato de sodio
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>Src</i>	Tirosina quinasa con gen similar al gen v-Src del virus de sarcoma Rous.
<i>STRING</i>	Base de datos de redes de interacción proteína-proteína

---

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
<i>T</i>	Epítoto T presente en carcinomas
<i>TGF-β</i>	Factor de crecimiento transformante β
<i>Tn</i>	Epítoto Tn presente en carcinomas
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<i>WB</i>	<i>Western blott</i>

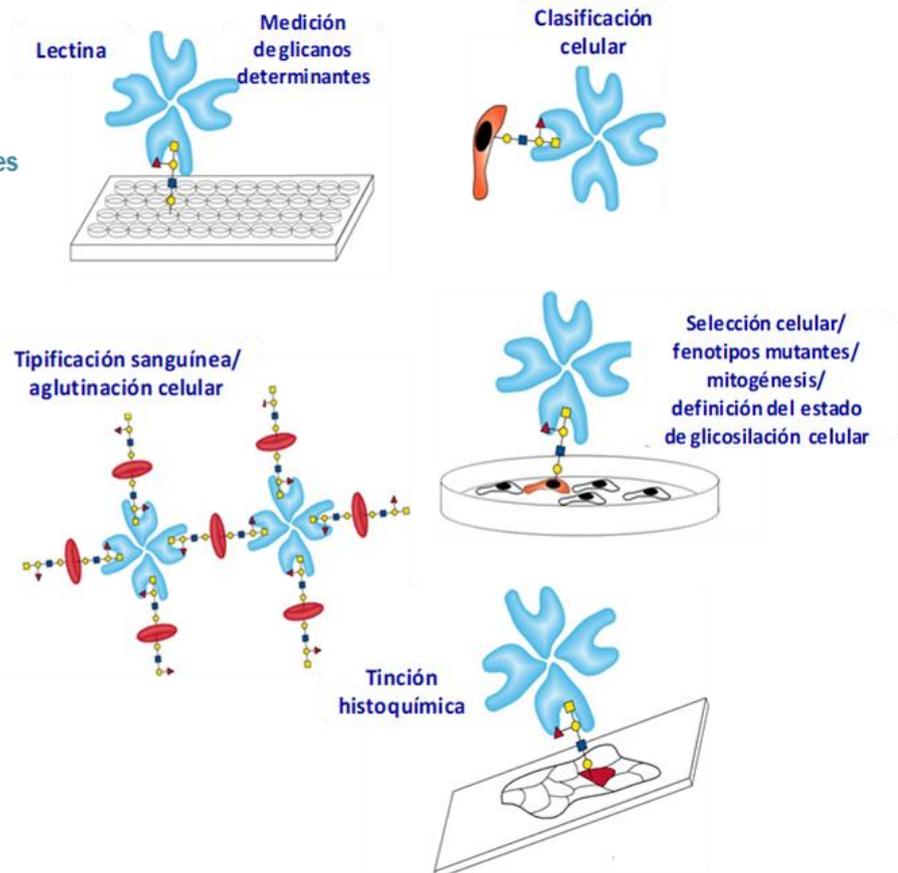
---

# Introducción

La palabra “lectina” proviene del vocablo latino “*legere*”, que significa *seleccionar*; originalmente el término fue acuñado para referirse a un grupo de proteínas encontradas en las semillas de plantas y que poseen la propiedad de aglutinar eritrocitos (Boyd & Shapleigh, 1954). Con el descubrimiento de la presencia de lectinas en diversas fuentes, el término fue ampliado para incluir proteínas de cualquier origen biológico, con la capacidad de unirse a carbohidratos y que pueden permanecer solubles o unidas a la membrana (Ashwell & Morell, 1977). En la actualidad, el término “lectina” representa a un grupo heterogéneo de proteínas que se producen de forma ubicua en los organismos vivos; que poseen dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRC) con un amplio espectro de arquitecturas que les brindan la capacidad de interactuar de manera selectiva, reversible y no covalente con estructuras específicas de carbohidratos y glicoconjugados solubles o integrales de membrana, mediando así una variedad de eventos de reconocimiento biológico en superficies celulares y fluidos fisiológicos, incluyendo comunicación celular, metástasis, inmunidad innata, recambio de glicoproteínas de suero, reconocimiento espermatozoides-óvulo, interacción hospedero-patógeno y protección vegetal contra fitopatógenos, entre otros (André *et al.*, 2015; Dam *et al.*, 2016; Gabius *et al.*, 2011a; Pérez S *et al.*, 2014; Vijayan & Chandra, 1999). Por otro lado, las lectinas carecen de actividad enzimática sobre su ligando, son diferentes de los anticuerpos y de las proteínas sensoras de carbohidratos durante las reacciones de defensa y quimiotaxis de las plantas, y de las proteínas de transporte de mono y oligosacáridos libres (André *et al.*, 2015; Gabius *et al.*, 2011a; Murphy *et al.*, 2013).

Las lectinas aisladas de plantas se han encontrado en semillas, raíces, bulbos, corteza y hojas (Goldstein & Poretz, 1986); en donde desempeñan papeles esenciales, siendo reservas moleculares de iones metálicos y de aminoácidos para el crecimiento y mantenimiento celular (Cândido *et al.*, 2011); estando involucradas en mecanismos de defensa por sus propiedades insecticidas, antifúngicas y antimicrobianas (De Schutter *et al.*, 2015); o manteniendo, a través de sus dominios DRC, la simbiosis de las raíces de la planta con bacterias fijadoras de nitrógeno para aumentar la productividad de la planta (de Vasconcelos *et al.*, 2013). Debido a su potencial biotecnológico y a la investigación cada vez más detallada de su especificidad de unión a ligandos particulares, las lectinas vegetales han sido utilizadas con varias aplicaciones en investigación biomédica (Melnykova *et al.*, 2013), incluyendo análisis de glicanos (Hirabayashi *et al.*, 2013; Iskratsch *et al.*, 2009; Kuno *et al.*, 2005), estudios de expresión y modificación de carbohidratos en glicoconjugados presentes en las superficies de células normales y de aquellas que experimentan estados patológicos (Lima *et al.*, 2013; Maresca *et al.*, 2012; Méhul *et al.*, 2003; Naeem *et al.*, 2007), determinación de cambios en la glicosilación de marcadores tumorales (Amorim *et al.*, 2013; Madariaga *et al.*, 2015;), inhibición de adherencia microbiana (Cavalcante *et al.*, 2011), reconocimiento de antígenos superficiales que caracterizan los diferentes grupos histo-sanguíneos (Matsui *et al.*, 2001) y direccionamiento de fármacos (Ahmed *et al.*, 2015).

- Análisis bioquímicos
- Diagnóstico y
- Tratamiento de enfermedades

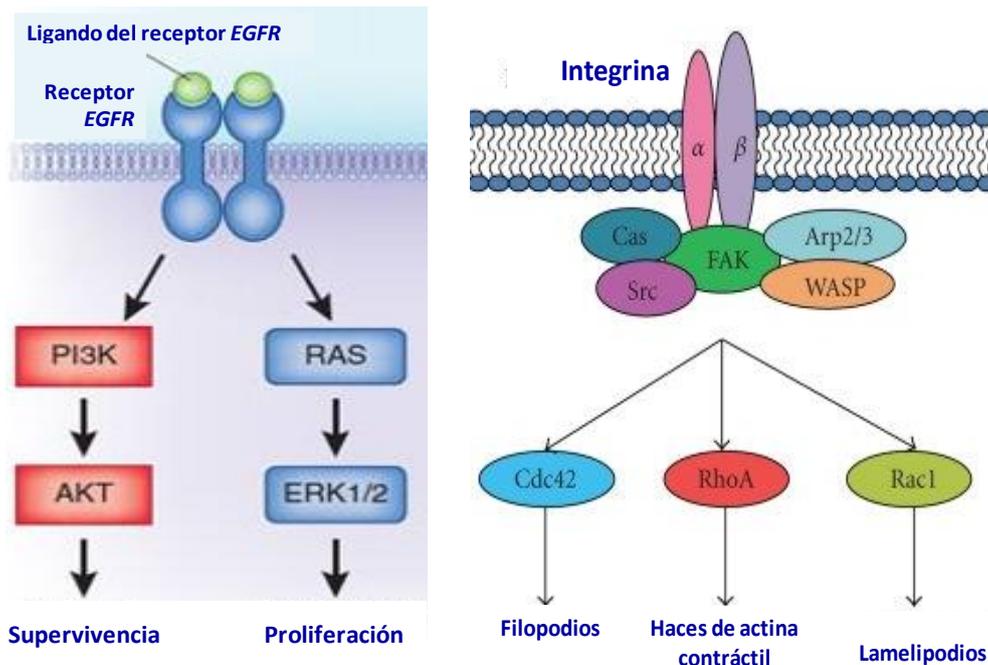


**Aplicaciones de las lectinas.** Cummings, R.D. & E Etzler, M.E. (2009). Capítulo 45: Antibodies and Lectins in Glycan Analysis. En: Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., *et al.*, editors, Segunda Edición, *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Recuperado y adaptado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1919/>. [Fig. 45.7].

Hasta la fecha, han sido publicadas cinco investigaciones acerca del efecto de cuatro lectinas vegetales y una lectina de alga, sobre aspectos clínicos e histológicos en heridas cutáneas realizadas experimentalmente en modelo murino. Dichos estudios muestran resultados a partir de pruebas *in vivo* en lesiones de piel tratadas con las lectinas de manera tópica, y se refieren a evidencia histológica de reepitelización, deposición nueva de colágeno, desarrollo de nuevos brotes de anexos de la piel (glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas), así como a la ocurrencia de signos inflamatorios necesarios para la inducción de la curación de las lesiones (edema, hiperemia y migración de células polimorfonucleares hacia el sitio de la herida), y a una mayor tasa en el cierre y recuperación de la lesión en comparación con los grupos control (Coriolano *et al.*, 2014; Brustein *et al.*, 2012; do Nascimento-Neto *et al.*, 2012; Neto *et al.*, 2011; de Melo *et al.*, 2011). Aun no se han establecido los mecanismos moleculares por los cuales algunas lectinas vegetales promueven y ejercen una acción cicatrizante de lesiones cutáneas; por otra parte, estas moléculas se convierten en proteínas potenciales que pueden promover los procesos de migración y proliferación celular en queratinocitos epidérmicos.

La lectina de origen mamífero galectina 3 (LGALS3) promueve la reepitelización de la piel (Panjwani *et al.*, 2014.). LGALS3 se sobreexpresa en el borde de las heridas (Liu, W *et al.*, 2012) y reconoce estructuras de carbohidratos presentes en glicoproteínas transmembranales tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*, **E**pidermal **G**rowth **F**actor **R**eceptor), influyendo así en las vías de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (*MAPK*,

*Mitogen-Activated Protein Kinase*) y proteína quinasa B (Akt) (Kariya *et al.*, 2010; Larsen *et al.*, 2011; Liu, W *et al.*, 2012); vías que desencadenan la proliferación y supervivencia celular (Roskoski, 2012). Igualmente, LGALS3 interactúa con la integrina  $\alpha\beta 1$ , promoviendo la activación de enzimas efectoras como la quinasa de adhesiones focales (FAK, *Focal Adhesión Kinase*) y la proteína G miembro de la familia de GTPasas *Rho* (Rac1 GTPasa), las cuales participan en la modulación de la adhesión celular a glicoproteínas de la matriz extracelular (MEC), la formación de lamelipodios y la migración celular (Friedrichs *et al.*, 2008; Saravanan *et al.*, 2009). También, se ha observado que LGALS3 puede estimular la producción de algunos factores de crecimiento en células normales y cancerosas (MacKinnon *et al.*, 2012; Timoshenko *et al.*, 2010).



**Vías de señalización inductoras de proliferación, supervivencia y migración celular.** Izquierda: Factores ligandos del receptor del factor de crecimiento epidérmico *EGFR* se unen al dominio extracelular del receptor, induciendo su dimerización y activando vías de señalización cruciales para la proliferación y supervivencia celular. Recuperado y adaptado de Bardelli & Jänne, 2012 [Fig.1]. Derecha: La interacción de integrinas con moléculas de la matriz extracelular induce cambios en el citoesqueleto y regula la migración celular a través de vías dependientes de la quinasa de adhesiones focales *FAK*. Recuperado de Zhong *et al.*, 2010 [Fig. 3].

Los queratinocitos epidérmicos representan el principal tipo celular de la *epidermis*, capa más externa de la piel y estructura primordial en la formación de la barrera cutánea contra las agresiones ambientales (Proksch *et al.*, 2008). La migración y proliferación de queratinocitos son los eventos más relevantes en la reepitelización de la piel, la cual ocurre reconstituyendo la epidermis durante la fase proliferativa de la cicatrización (Guo *et al.*, 2010). Dado que LGALS3 juega un papel primordial en los procesos de proliferación y migración celular durante la reepitelización (Pastar *et al.*, 2014), su actividad es relevante en la cicatrización de heridas cutáneas. Por otro lado, se ha observado el efecto de algunas lectinas vegetales y de hongos sobre el proceso de migración de neutrófilos hacia las heridas epiteliales, donde estas células pueden cumplir su función protectora al eliminar agentes infecciosos y tejido muerto (Chahud *et al.*, 2009; Ganiko *et al.*, 2005; Santos-de-Oliveira *et al.*, 1994); y en la modulación del sistema inmune al promover la liberación de citoquinas proinflamatorias por macrófagos (Ditamo *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2015).

En el presente trabajo de tesis se determinó el efecto de las lectinas vegetales con especificidad por galactosidos o manosidos, sobre los procesos de migración y proliferación en queratinocitos epidérmicos humanos. Las lectinas usadas en la presente investigación provienen de semillas de plantas de la familia *Fabaceae*: Lectinas de *Dioclea grandiflora* (LDG-I y LDG-II), y lectina de *Galactia lindenii* (LGL-II). Con las lectinas se llevaron a cabo ensayos de interacción con glicoproteínas remodeladas, las cuales presentan estructuras definidas de glicanos; y también se usaron en ambientes de membrana celular por medio de ensayos de aglutinación de eritrocitos de diferente origen que expresan perfiles glicómicos distintos. Los resultados permitieron ahondar en el conocimiento de la especificidad de las tres lectinas, estudiar sus efectos sobre la migración y proliferación en queratinocitos (línea celular HaCat), y sobre la expresión de proteínas que hacen parte de las cascadas de señalización de estos dos procesos.

La lectina de *D. grandiflora* (LDG-I) con especificidad por manósidos y otros glicotopes, solo tuvo un efecto positivo sobre la proliferación a la menor concentración usada (1.5 µg/mL) e inhibió la migración de los queratinocitos epidérmicos en todas las condiciones probadas, mientras que las lectinas con especificidad por galactósidos y otros glicotopes (LDG-II y LGL-II), promovieron los procesos de migración y proliferación celular, dentro de un rango de concentración dependiente del proceso y de la lectina (1.5 – 25 µg/mL); y también tuvieron un efecto sobre la expresión del receptor EGFR, involucrado en las vías de señalización de éstos dos procesos. Se observaron similitudes entre las especificidades de las lectinas tipo II ensayadas (LDG-II y LGL-II) con la de la lectina mamífera, galectina (LGALS3), involucrada en la cicatrización de lesiones. Los resultados obtenidos contribuyen a la profundización en el conocimiento de la especificidad de las tres lectinas vegetales ensayadas. También son un punto de partida para la elucidación de los mecanismos moleculares y bioquímicos involucrados en los procesos de recuperación de lesiones cutáneas mediados por lectinas vegetales, dado que hasta la fecha dicho efecto se había caracterizado solamente en términos clínicos e histológicos.

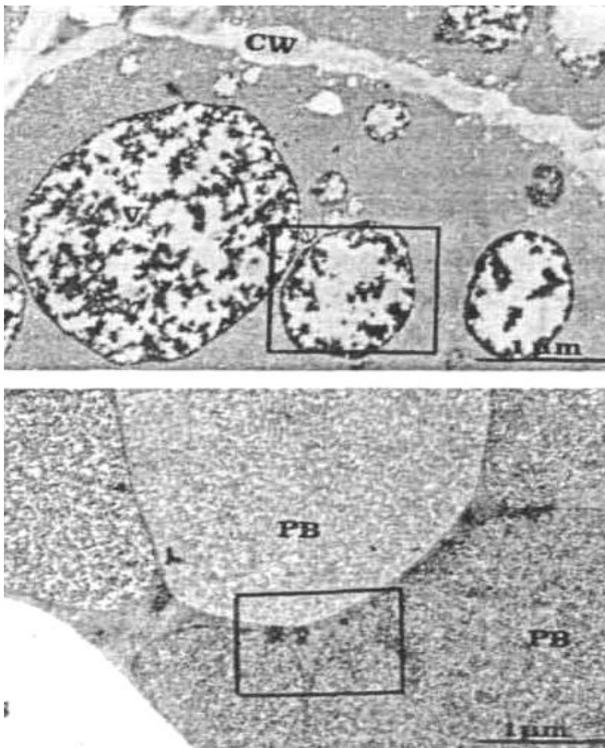
Uno de los objetivos del Grupo de Investigación en Proteínas (GRIP), busca explorar los usos potenciales de las lectinas vegetales, teniendo en cuenta que se han aislado y caracterizado varias lectinas aisladas de plantas endémicas y de algas marinas (Almanza *et al.*, 2004; Hidalgo, 2017; Melgarejo *et al.*, 2005; Pérez G, 1993; Pérez G, 1995; Pérez G, 1998; Quintero, 2014; Sierra & Pérez G., 1999; Vega *et al.*, 2006; Wilches *et al.*, 2017). Por otro lado, el Grupo de Investigación en Hormonas centra su interés en el área de bioquímica, biología molecular de hormonas y factores de crecimiento entre otros; moléculas cuya presencia conlleva a la organización de estructuras macromoleculares generando cascadas de señalización (Adak *et al.*, 2011); que muchas veces se ven incrementadas en células de la piel por la interacción de receptores transmembranales con la galectina LGALS3 (Kariya *et al.*, 2010; Liu W *et al.*, 2012). En el presente trabajo y con la experiencia de cada uno grupos de investigación, se determinaron parcialmente las vías de señalización por las cuales las lectinas LDG-II y LGL-II de la tribu Diocleae, promovieron los procesos de migración y proliferación en queratinocitos epidérmicos. Como perspectivas se propone evaluar el efecto de las lectinas tipo II en otros tipos celulares encontrados en la piel (vg. fibroblastos, entre otros), así como pruebas *in vivo* sobre lesiones cutáneas en modelo mamífero y evaluar el uso potencial de alguna(s) lectina(s) tipo II en tratamientos de curación de lesiones cutáneas en humanos, teniendo en cuenta sus efectos y sus especificidades de ligando.



# 1. Marco Teórico

## 1.1. Lectinas de la Familia *Fabaceae*

Las lectinas se encuentran en todos los reinos de la vida. Debido a su gran abundancia en los granos de uso alimenticio para humanos y animales, históricamente se han purificado muchas lectinas presentes en plantas leguminosas (Familia *Fabaceae*), las cuales son sintetizadas durante el desarrollo de la semilla varias semanas después de la floración (Melgarejo & Pérez G, 1997; Wenzel *et al*, 1993), y transportadas a las vacuolas donde se comienzan a condensar en vesículas especializadas llamadas cuerpos protéicos (Fig.1-1). Las lectinas purificadas y usadas en este trabajo se aislaron de semillas de especies de la Familia *Fabaceae*, y dentro de ésta, a la tribu *Diocleae*.

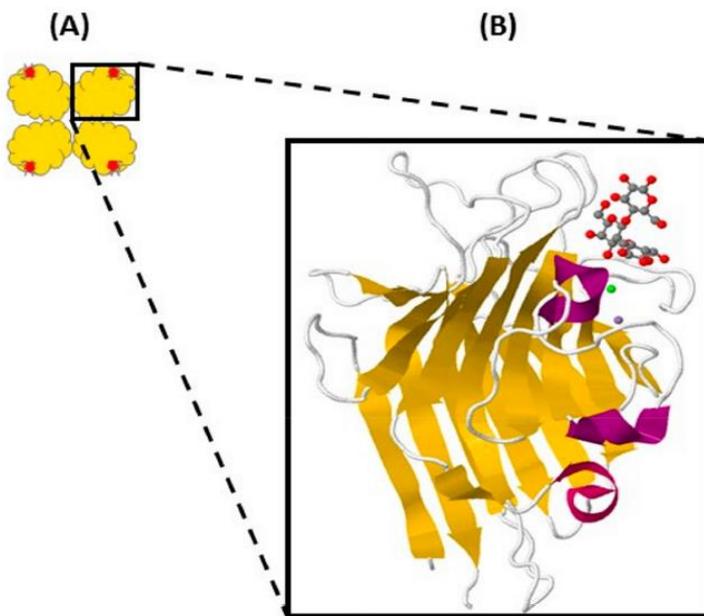


**Figura 1-1. Localización inmunocitoquímica de una lectina de *Dioclea lehmanni* en las semillas.** La lectina se detectó en vacuolas (V) del eje embrionario y en cuerpos protéicos (PB) de células de parénquima en cotiledones de semillas maduras. CW: pared celular. Recuperado de Melgarejo & Pérez G, 1997.

## 1.2. Similitud estructural y diversidad funcional en proteínas con *plegamiento tipo lectina de leguminosa*

Las lectinas son proteínas que varían en su masa molecular, estructura, organización molecular y composición de aminoácidos en sus dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRC); además, pertenecen a distintas familias de proteínas, clasificadas según sus propiedades bioquímicas, funcionales o estructurales. La identidad de secuencia entre lectinas de diferentes familias puede ser tan baja como del 2% (Chandra *et al*, 2001). Por otro lado, lectinas estructuralmente similares pueden mediar diferentes funciones biológicas, *vg.*, las galectinas median interacciones

intermoleculares tanto en la superficie como en el citoplasma de células animales (Liu *et al.*, 2012; Saravanan *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2015; Zhuo *et al.*, 2008), las cuales desencadenan diferentes procesos celulares (proliferación, adhesión, migración, apoptosis, inflamación, entre otros); mientras que la Arcelina-1, lectina de *Phaseolus vulgaris*, posee propiedades insecticidas y protege a la semilla de larvas de coleópteros depredadoras (Mourey *et al.*, 1998).

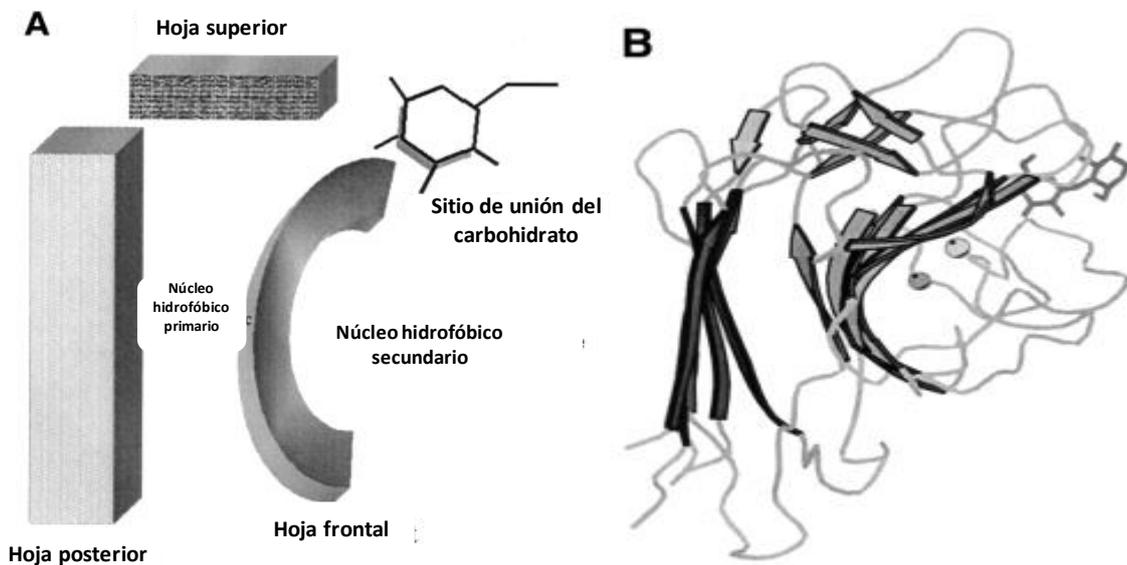


**Figura 1-2. Estructura general de proteína con plegamiento tipo lectina de leguminosa.** (A) Lectina tetramérica con dominios DRC en rojo. (B) Ampliación de un monómero mostrando hojas  $\beta$  (amarillo), vueltas  $\alpha$  (púrpura), sitios de unión a metales (esferas verde y gris) y dominio de reconocimiento de carbohidrato DRC (área que interactúa con carbohidrato en gris y rojo). Recuperado de Lagarda-Díaz *et al.*, 2017.

Estructuralmente, un dominio específico es el andamio para los diferentes grupos de lectinas con secuencias no relacionadas (Fig. 1-2). Las lectinas de leguminosas están compuestas por dos o cuatro subunidades idénticas o casi idénticas, con pesos moleculares entre 25-30 kDa cada una; y cada subunidad contiene un dominio DRC (André *et al.*, 2015; Loris *et al.*, 1998). Las subunidades muestran un alto grado de conservación del plegamiento, siendo la arquitectura prototipo del protómero el “*plegamiento tipo de lectina de leguminosa*”, característico tanto en las lectinas de leguminosas (Familia *Fabaceae*), así como también en galectinas y pentraxinas mamíferas (André *et al.*, 2015; Loris, 2002). Lo anterior podría indicar la ocurrencia de una evolución convergente entre estructuras de proteínas con secuencias no relacionadas que poseen retos funcionales similares (reconocimiento de moléculas que contengan carbohidratos en su estructura).

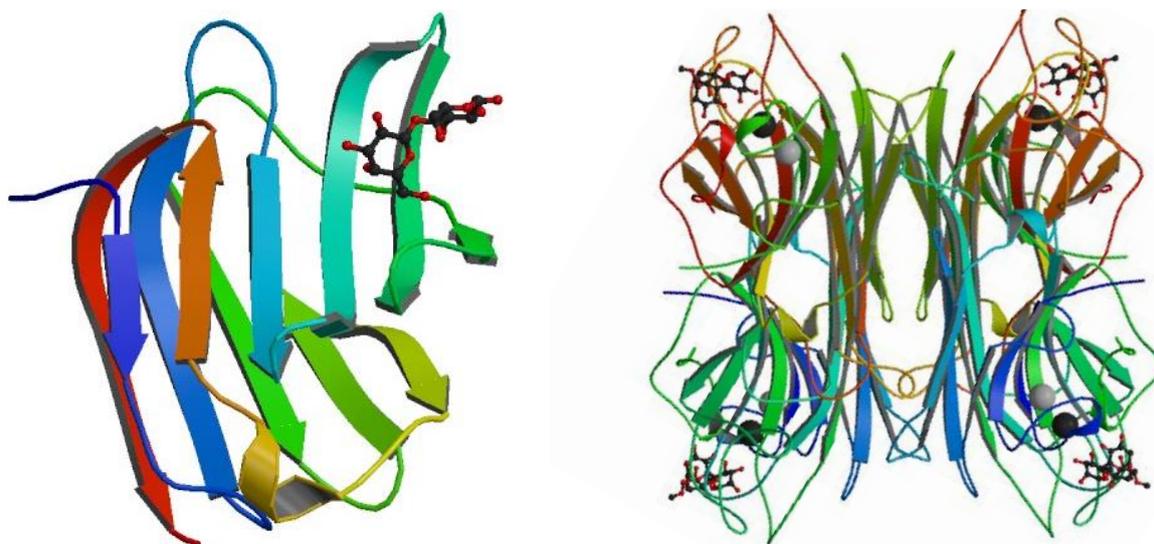
El *plegamiento tipo lectina de leguminosa* esta representado por hojas  $\beta$  empaquetadas entre ellas formando un  $\beta$ -sándwich antiparalelo (Fig. 1-3). El número de hebras  $\beta$  que conforman las hojas  $\beta$  puede variar entre tipos de lectinas (Fig. 1-4; André *et al.*, 2015; Lagarda-Díaz *et al.*, 2017; Loris, 2002). El  $\beta$ -sándwich está formado por una hoja  $\beta$  frontal curva compuesta por 5-7 hebras  $\beta$ , otra plana posterior de 4-6 hebras  $\beta$ ; conectadas en uno de los lados por otra hoja antiparalela superior de 5 hebras  $\beta$  (Chandra *et al.*, 2001; Loris *et al.*, 1998). Las hojas frontal y posterior son casi paralelas y se pueden encontrar a una distancia cercana a 13 Å, según se ha calculado determinando las distancias entre los centroides de los átomos C $\alpha$  de cada hoja, en alrededor de 300 estructuras de proteínas que contienen el *plegamiento tipo lectina de leguminosa* (Chandra *et al.*, 2001); dicha distancia es requerida para la formación de un *cluster* de residuos hidrofóbicos

cuyas cadenas laterales aromáticas están posicionadas entre las hojas frontal y posterior brindando estabilidad al plegamiento (Lagarda-Díaz *et al*, 2017). Las hebras de las hojas frontal y posterior pueden estar compuestas por 5-7 residuos, mientras que la hoja superior por hebras de 2-4 residuos. Las hebras  $\beta$  están conectadas por bucles (Chandra *et al.*, 2001; Lagarda-Díaz *et al*, 2017).



**Figura 1-3. Esquemas del plegamiento tipo lectina de leguminosa.** A. Posición de las 3 hojas  $\beta$  y del carbohidrato en el monómero de la lectina. B. Diagrama de cintas de subunidad de lectina de *Arachis hypogaea* (maní). Recuperado de Chandra *et al.*, 2001.

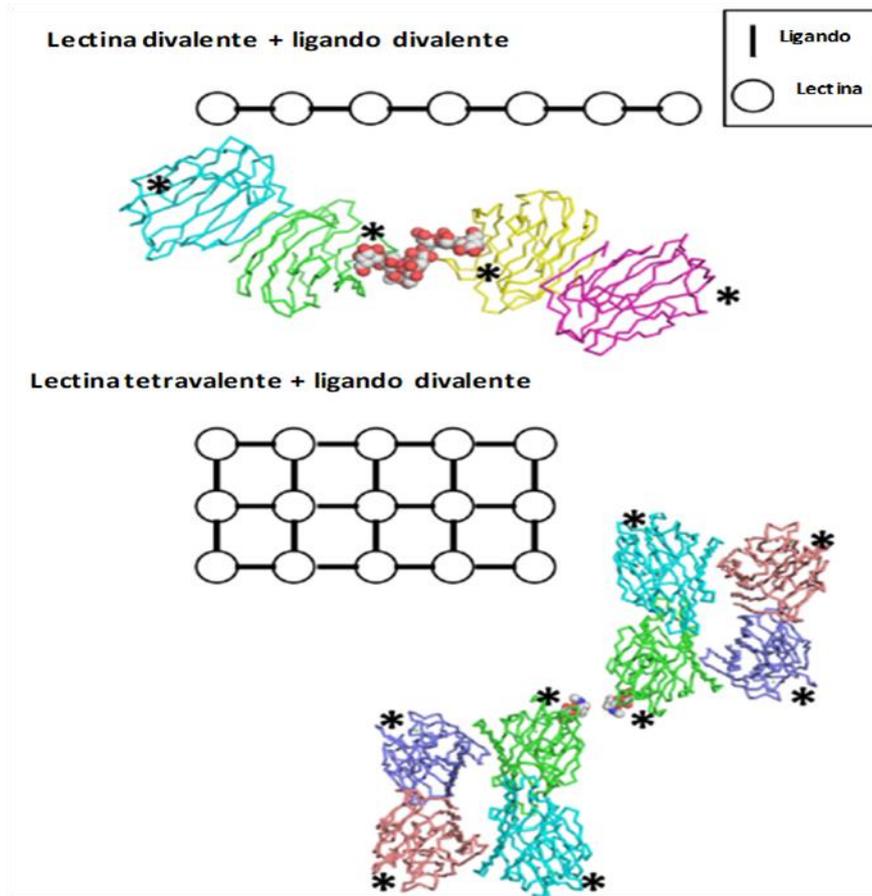
Análisis comparativos condujeron a determinar que la presencia de las 3 hojas en aquella geometría particular y sus conectividades topológicas son primordiales para la formación y estabilidad del plegamiento; mientras que la curvatura de la hoja frontal, la presencia de núcleos hidrofóbicos y los bucles del sitio de unión se requieren para generar diversidad y especificidad a carbohidratos particulares (Chandra *et al*, 2001). El ensamble en formas tetraméricas que muestran algunas lectinas (Fig. 1-4), implica la asociación de dos dímeros alineados de forma antiparalela por la hoja posterior (Lagarda-Díaz *et al*, 2017; Loris *et al.*, 1998).



**Figura 1-4. Estructura terciaria y cuaternaria de lectinas.** *Izquierda:* Monómero de galectina-3 humana (LGALS3) en complejo con lactosa (Lac) (PBD: 4RL7). *Derecha:* Tetrámero de lectina LDG-I de *D. grandiflora*. Cada subunidad de LDG-I interactuando con una molécula de trimanósido (PBD: 1DGL). Esferas grises y negras representan iones metálicos divalentes.

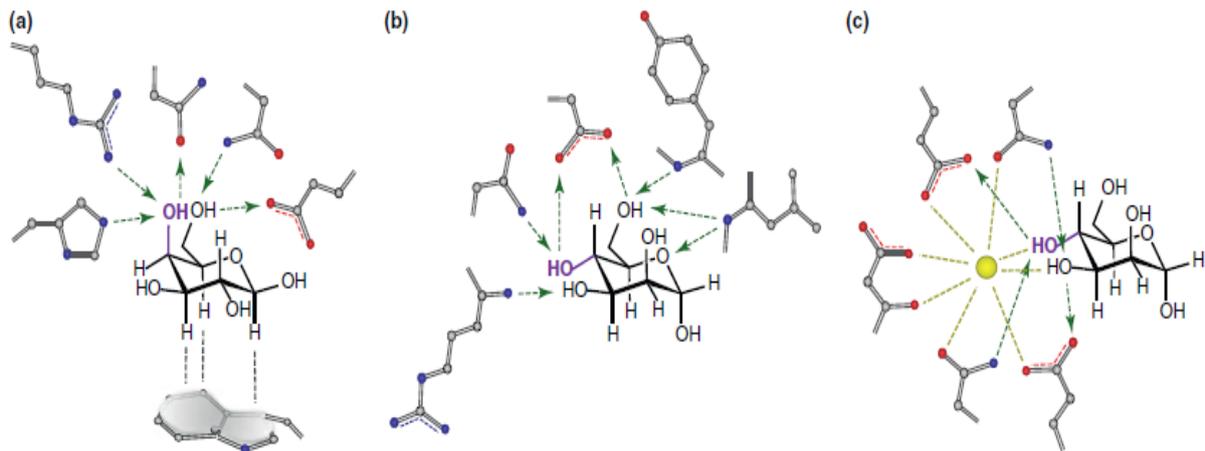
### 1.3. Complementariedad estructural lectina – carbohidrato

En comparación con las interacciones proteína - proteína, aquellas existentes entre las lectinas y los carbohidratos individuales es débil (rango mM), y requieren de un incremento en la afinidad para alcanzar el significado biológico de la interacción. La afinidad de unión aumenta a través de uniones multivalentes en varios sitios de unión, incluyendo residuos internos (encriptados) o residuos terminales (externos) de los oligosacáridos, y por el reconocimiento de estructuras de polisacáridos altamente organizadas (Nagae *et al.*, 2014); de igual forma, la multimerización de las lectinas puede incrementar su avidéz de unión a ligandos multivalentes o agrupados (Fig.1-5).

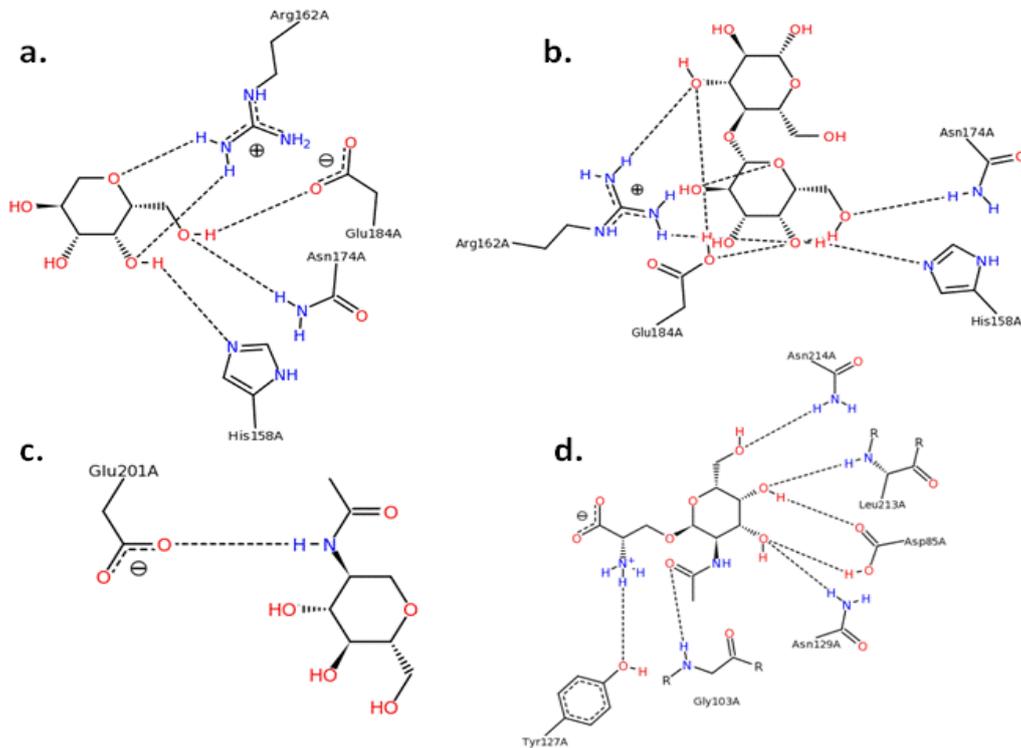


**Figura 1-5. Esquemas de complejos multivalentes lectina - ligando.** Arriba: Dímero de galectina 1 en complejo con glicano biantenarario (PDB: 1SLB). Abajo: lectina vegetal tetramérica tetraivalente de *Glycine max* (soya) en complejo con glicano biantenarario (PDB: 1SBE). Los sitios de unión a carbohidrato están señalados con asteriscos. Recuperado de Nagae *et al.*, 2014.

La especificidad de reconocimiento de las lectinas se basa en la complementariedad estructural lectina – carbohidrato. Los grupos hidroxilo de los carbohidratos promueven la formación de puentes de hidrógeno y, en algunos casos, la coordinación de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 1-6). La diferencia en la posición de un solo grupo hidroxilo en los carbohidratos constituyentes de los glicanos puede tener consecuencias durante el bioreconocimiento (Gabius *et al.*, 2011a). Los puentes de hidrógeno (con o sin la participación de moléculas de agua), las interacciones entre los enlaces C-H y la carga negativa de la nube de electrones en el orbital  $\Pi$  presente en residuos Trp específicos, pueden cooperar para brindar ajustes moleculares más precisos (André *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2013; Nagae *et al.*, 2014). En algunos casos, la parte aniónica en los glicanos sialilados también promueve enlaces iónicos (Murphy *et al.*, 2013). Las características de reconocimiento de carbohidratos mencionadas pueden ser observadas en diferentes combinaciones entre las lectinas (Gabius *et al.*, 2011a; Murphy *et al.*, 2013), y los motivos de secuencia de aminoácidos dentro del dominio DRC (Fig. 1-7), pueden variar entre tipos de lectinas (André *et al.*, 2015; Lagarda-Díaz *et al.*, 2017; Loris, 2002).



**Figura 1-6. Perfiles de interacción lectina – carbohidrato.** (a) Acople entre residuo de galactosa y galectina 1 humana a través de tres puentes de hidrogeno cooperativos (donor azul/aceptor rojo) y de la interacción C-H con la nube de  $\pi$  del residuo Trp central del sitio de unión de la lectina (PDB: 1GZW). (b) Lectina vegetal ConA en complejo con manósido por medio de puentes de hidrógeno (PDB: 1I3H). (c) Lectina del tipo C de suero en la cual el ion  $\text{Ca}^{2+}$  (esfera amarilla) es esencial para una organización óptima del sitio de unión a manosa. Recuperado de Gabius *et al.*, 2011b.



**Figura 1-7. Motivos de aminoácidos en el sitio de reconocimiento (a-b).** Galectina LGALS3 interactúa con  $\beta$ -galactosa (PDB: 1KJL) y lactosa (PDB: 3ZSJ) a través de residuos H158, R162, N174 y E184. (c). E201 en isolectina B4 de *Vicia villosa* interactúa con N-acetil-D-glucosamina (PDB: 1N47). (d). Motivo en isolectina B4 de *V. villosa* (D45, G103, Y127, N129, L213, N214) que interactúa con antígeno Tn (GalNAc-O-Ser) sobreexpresado en carcinomas (PDB: 1N47).

## 1.4. Lectinas de la Tribu *Diocleae*

Dentro de la familia de plantas *Fabaceae*, la subtribu denominada *Diocleinae* estaba clasificada como una de las subdivisiones de la tribu Phaseoleae (Varela *et al.*, 2004). Un análisis filogenético molecular basado en marcadores nucleares y de cloroplasto, cuyos resultados fueron publicados en el año 2015, soporta fuertemente el restablecimiento de la subtribu *Diocleinae* a nivel de tribu *Diocleae*, con tres linajes o clados principales: *Canavalia*, *Dioclea* y *Galactia* (Fig.1-8). Los miembros de esta tribu son en su mayoría del Nuevo Mundo, representan plantas leñosas o gruesas, de flores grandes con discos prominentes sobre el ovario, y con hilia largos donde se insertan los funículos que mantienen las semillas unidas al fruto (Queiroz *et al.*, 2015).

Lectinas de varias especies de la tribu *Diocleae* han sido aisladas e identificadas en términos de sus características fisicoquímicas y de su inhibición (Almanza *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2011; Azevedo *et al.* 2011, 2012; Batista *et al.*, 2010; Cavada *et al.*, 1996, 2006, 2018; Correia *et al.*, 1995; Dam *et al.*, 1998, 2000, 2005, 2011; De Souza *et al.*, 2003; Fukuda *et al.*, 1994; Goldstein *et al.*, 1986; Grangeiro *et al.* 1997; Gupta *et al.*, 1996; Lependu *et al.* 1986; Melgarejo *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 1983, 1996, 1997; Pérez G *et al.*, 1990, 1991; Pérez G, 1998; Quintero, 2014; Ramos *et al.*, 1996; Reynolds & Pérez S, 2011; Rocha *et al.*, 2009; Sierra & Pérez, 1999; Silva *et al.*, 2014; Sumner & Howell, 1936), así como de la de la estructura de sus cristales y la termodinámica de su unión a carbohidratos (Barbosa *et al.*, 2013; Dam *et al.*, 1998, 2005; 2011; Rozwarski *et al.*, 1998; Wah *et al.*, 2001; Zamora-Caballero *et al.*, 2015). Algunas de estas lectinas han mostrado ser estables a diferentes rangos de pH (4 - 10) y temperatura (20 - 40°C), además, un aspecto interesante de la tribu *Diocleae* es el hecho de que en sus semillas se han encontrado dos tipos de lectinas (lectinas tipo I y lectinas tipo II) con propiedades fisicoquímicas y de especificidad diferentes. En este trabajo se aislaron las lectinas de las semillas de *Dioclea grandiflora* y *Galactia lindenii* (Fig. 1-9), plantas de la tribu *Diocleae*, endémicas de Brasil y Colombia, respectivamente (Andrade-Lima, 1954; Burkart, 1971).

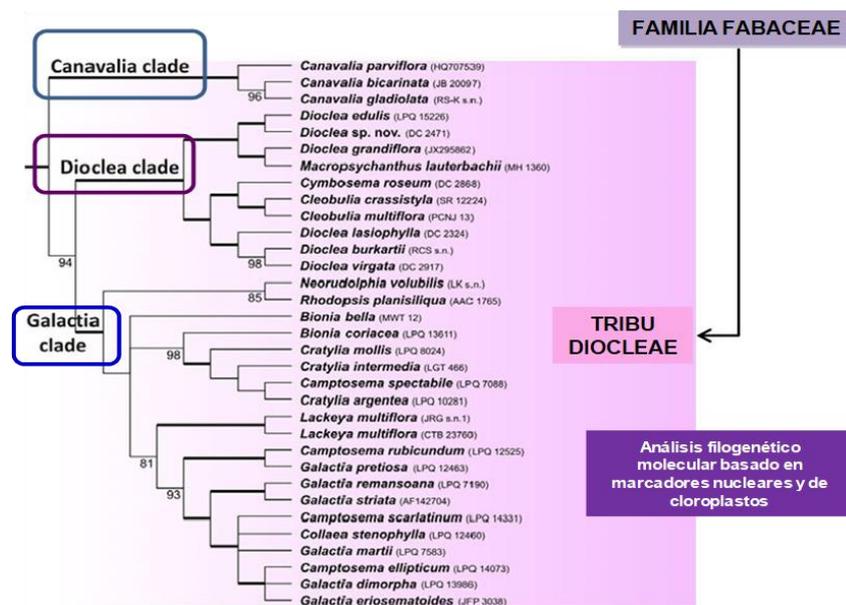


Figura 1-8. Clados de plantas de la tribu *Diocleae*. Adaptado de Queiroz *et al.*, 2015.



**Figura 1-9. Plantas fuentes de las lectinas.** Arriba: Semilla y flor de *D. grandiflora*. Recuperado de <http://www.colecionandofrutas.org/fabaceae.htm>. Abajo: Planta del género *Galactia* y espécimen de *G. lindenii* del Herbario del Jardín Botánico de Bogotá. Recuperados de Queiroz *et al*, 2015 y de <http://coleccion.es.jbb.gov.co/herbario/especimen/11213>, respectivamente.

#### 1.4.1. Lectinas de tipo I

En varias especies de plantas de la tribu *Diocleae* se han caracterizado lectinas que muestran especificidad hacia manosa/glucosa (Man/Glc), las cuales han sido purificadas por afinidad usando resinas basadas en dextrano, y su actividad aglutinante sobre eritrocitos puede ser inhibida por manósidos o glucósidos. Estas lectinas Man/Glc son denominadas lectinas de tipo I y muestran entre sí altos porcentajes de identidad de sus secuencias (80-99%), en comparación con lectinas Man/Glc de otras plantas *Fabaceae* de diferente tribu, como aquella de *P. vulgaris* de la tribu *Phaseolinae* (Tabla 1-1).

**Tabla 1-1. Comparación de la secuencia de lectina tipo I de *Dioclea grandiflora* (LDG-I) con secuencias de otras lectinas tipo I de la tribu *Diocleae***

Lectina	Max score	Total score	% Cobertura	E-value	% Identidad	Acceso
<i>D. violacea</i>	475	475	100	1e-174	99	2GDF A
<i>D. guianensis</i>	460	460	100	9e-169	96	1H9W A
<i>D. lasiophylla</i>	453	453	100	5e-166	94	6CJ9 A
<i>D. lasiocarpa</i>	452	452	100	8e-166	94	5UUYA
<i>D. lehmannii</i>	429	429	100	2e-156	89	A45587
<i>C. roseum</i>	426	426	100	2e-155	94	3A0K A
<i>C. bonariensis</i>	417	417	100	1e-151	86	5U3E A
<i>C. floribunda</i>	406	406	100	2e-147	84	2D3P A
<i>C. mollis</i>	406	406	100	2e-147	84	1MVQ A
<i>C. ensiformis</i>	402	402	100	6e-146	83	P81461.1
<i>C. gladiata</i>	402	402	100	6e-146	83	1WUV A
<i>C. virosa</i>	400	400	100	7e-145	82	AAB28242.1

<i>C. maritima</i>	399	399	100	2e-144	82	2OW4 A
<i>C. brasiliensis</i>	395	395	100	3e-143	81	P55915.1
<i>P. vulgaris</i> *	141	246	96	1e-42	57	AAF28739.1

Secuencias de lectinas tipo I de la tribu *Diocleae* de los géneros *Dioclea*; *Cymbosema* (*C. roseum*); *Canavalia* (*C. bonariensis*; *C. ensiformis*; *C. gladiata*; *C. virosa*, *C. maritima*; *C. brasiliensis*); *Cratylia* (*C. floribunda*; *C. mollis*); y de \* *Phaseolus vulgaris* de la tribu *Phaseolinae*, Método Smartblast: [blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/smartBlast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/smartblast/smartBlast.cgi), realizado el 01.05.2018.

En la Tabla 1-2 se muestran propiedades fisicoquímicas (punto isoeléctrico, y masa molecular de la lectina nativa o de sus subunidades) y actividad eritroaglutinante de lectinas tipo I conocidas de diferentes especies de la tribu *Diocleae*, incluyendo datos de concentración mínima aglutinante (CMA) de la lectina I de *D. grandiflora* (LDG-I) obtenidos en el presente trabajo. Para muchas lectinas I, por *SDS-PAGE* se han observado tres bandas: una correspondiente al monómero de la lectina ( $\alpha$ ), y las denominadas  $\beta$  y  $\gamma$ , que son fragmentos originados del procesamiento proteolítico parcial *post*-traduccional realizado por una asparaginil endopeptidasa que escinde el enlace Asn118-Ser119 durante el desarrollo de la semilla, y corresponden a los extremos N- y C-terminal de la lectina (Ainouz *et al.*, 1987; Carrington *et al.*, 1985). Por otro lado, no hay una uniformidad en la manera como se reporta la actividad aglutinante en los diferentes estudios; algunos la describen en términos CMA, otros como título específico o en escalas cualitativas (+1: aglutinación débil, +4: aglutinación fuerte). Sin embargo, a partir de los diferentes tipos de datos se puede obtener un orden de potencia de aglutinación en los casos en que se usan eritrocitos de diferente origen.

Tabla 1-2. Características fisicoquímicas y actividad eritroaglutinante de lectinas I de plantas de la tribu Diocleae

Tipo de Lectina	Clado	Genero	Especie	Propiedades Fisicoquímicas			Tipo de eritrocito que aglutina o datos de aglutinación	Referencias	
				Mr nativa (kDa)	Mr subunidad ( $\alpha$ ) o fragmentos $\beta$ y $\gamma$ (kDa)	pl			
Tipo I (especificidad por manósidos/ glucósidos)	Canavalia	Canavalia	<i>C. bonariensis</i>	/	$\alpha$ :25.5; $\beta$ :13; $\gamma$ :12.5	/	Conejo	Cavada et al, 2018; Dam et al, 1998c; Silva et al, 2014;	
			<i>C. brasiliensis</i>	88	$\alpha$ :30; $\beta$ :16; $\gamma$ :12	/	Caballo > Perro > Conejo, O+. NA: Vaca.	Dam et al, 1998; Grangeiro et al 1997; Pérez, 1998; Ramos et al, 1996	
			<i>C. ensiformis</i>	96	$\alpha$ :25.5; $\beta$ :14; $\gamma$ :12.5	7.1	Perro > Ratón, Mono > Conejo > Rata > O+. También A, B, AB, Pollo, Paloma y Carpa. NA: Cabra ni Vaca.	Agrawal & Goldstein, 1967; Chen, 2008; Dam et al, 1998, 2005; Goldstein et al, 1986; Gupta et al, 1996; Perez, 1998; Reynolds & Perez, 2011	
			<i>C. gladiata</i>	60	$\alpha$ : 30	/	Ratón, oveja, conejo, humano	Kojima et al, 1991; Une et al., 2018; Wong & Ng, 2005	
			<i>C. grandiflora</i>		$\alpha$ :29; $\beta$ :16; $\gamma$ :12	/	Conejo	Ceccatto et al, 2002; Dam et al, 2000	
			<i>C. maritima</i>	/	/	/	O+, Conejo	Delatorre et al, 2006; Pérez et al, 1991; Ramos et al, 1996a, 1996b	
	Dioclea	Cymbosema	Dioclea	<i>C. roseum</i>	/	$\alpha$ :30; $\beta$ :18; $\gamma$ : 12	/	Conejo, CMA: 2 $\mu$ g/mL	Cavada et al, 2006; Dam et al, 2011
				<i>D. altissima</i>	100	$\alpha$ :26.3; $\beta$ :14; $\gamma$ : 9	8.8	Conejo, CMA: 1.3 $\mu$ g/mL	Moreira et al, 1997
		<i>D. guianensis</i>	100	$\alpha$ :30; $\beta$ :18; $\gamma$ : 12		Conejo, Pollo. NA: humano, vaca, oveja, cabra ni cerdo.	Dam et al, 1998; Vasconcelos et al, 1991		
		<i>D. grandiflora</i>	100	$\alpha$ :25; $\beta$ :13; $\gamma$ : 8	8.8	CMA: 0.58 $\mu$ g/mL (A, B, T, Tn, Cerdo); 1.17 $\mu$ g/mL (O, Oveja). Caballo > Conejo, Perro > ABO. También Cabra y Oveja. NA: Vaca	Cortázar et al, 2018; Dam et al, 1998, 2005; Gupta et al, 1996; Moreira et al, 1983; Ramos et al, 1996a, 1996b; Perez 1998; Reynolds & Perez, 2011		
		<i>D. lasiophylla</i>	/	$\alpha$ :25.6; $\beta$ :13; $\gamma$ : 12.6	/	Conejo	Pinto Jr et al, 2013		
		<i>D. lehmanni</i>	/	$\alpha$ :25.3; $\beta$ :14; $\gamma$ : /	8.2	Conejo > Perro > Caballo > ABO. También de Oveja, Cabra, Rata, Ratón, Mono. NA: Vaca.	Pérez et al, 1990, 1991; Pérez, 1998		
		<i>D. rostrata</i>	/	$\alpha$ :30.9; $\beta$ :15.8; $\gamma$ : 11.7	/	Conejo > BO. CMA: 3 $\mu$ g/mL (Conejo). NA: cabra ni A+.	Cavada et al, 1996; Dam et al, 1998, 2000		
		<i>D. sclerocarpa</i>	102	$\alpha$ : 25.6; $\beta$ :12.8; $\gamma$ :12.7	/	Conejo, CMA: 0.4 ng	Correia et al, 2011		
		<i>D. sericea</i>	52.9	$\alpha$ :29.9; $\beta$ :16.5; $\gamma$ : 13.4	6.7	AB > O, caprino, perro, ratón,	Sierra & Pérez, 1999		
		<i>D. violacea</i>	/	$\alpha$ :29.5; $\beta$ :15.8; $\gamma$ : 11.7	/	Conejo, CMA: 0.65 $\mu$ g	Dam et al, 1998, 2000; Moreira et al, 1996;		
		<i>D. virgata</i>	/	$\alpha$ :30.9; $\beta$ :16.2; $\gamma$ : 12	/	Conejo > ABO. NA: cabra.	Cavada et al, 1996; Dam et al, 1998, 2000; Ramos et al, 1996		
		<i>D. wilsonii</i>	/	$\alpha$ :25.6; $\beta$ :12.9; $\gamma$ : 12.8	/	Conejo > ABO. CMA: 13 ng/mL Conejo)	Azevedo et al 2011, 2012.		
	Galactia	Camptosema	Cratylia	<i>C. pedicellatum</i>	/	$\alpha$ :30; $\beta$ :16; $\gamma$ : 13	/	Conejo	Souza Teixeira et al, 2011
				<i>C. mollis</i>	/	$\alpha$ :30; $\beta$ :16; $\gamma$ : 14	8.5	Conejo: 6 ng/mL. Conejo > ABO	Correia et al, 1995; De Souza et al, 2003; Varejão et al, 2010
<i>C. floribunda</i>		/	$\alpha$ :25; $\beta$ :14; $\gamma$ : 12	/	Conejo, O+	Calvette et al, 1999; Dam et al, 1998; Oliveira et al, 1991; Ramos et al, 1996			
<i>G. lindenii</i>		60	$\alpha$ :29	6.5	A ,B: 0,625 $\mu$ g; O+: 1.25 $\mu$ g.	Quintero, M. 2014			

kDa: kiloDalton; pl: punto isoeléctrico; Símbolo /: no se reporta en bibliografía consultada; CMA: concentración mínima aglutinante ensayada; NA: no aglutina. A, B, O, T y Tn: eritrocitos de origen humano.

## 1.4.2. Lectinas de tipo II

Las lectinas de la tribu Diocleae que han mostrado especificidad por carbohidratos diferentes a manósidos y glucósidos, se han denominado lectinas de tipo II. En la Tabla 1-3 se presentan las propiedades fisicoquímicas y actividad eritroaglutinante de este tipo de lectinas. El número de estudios reportados acerca de lectinas tipo II es menor al de lectinas tipo I. Las lectinas tipo II no son inhibidas por Man ni por Glc (Almanza *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2010; Dam *et al.*, 2011; Melgarejo *et al.*, 2005; Pérez G, 1998; Quintero, 2014; Sierra & Pérez G, 1999), aún usando concentraciones tan altas como 200 mM (Pérez G, 1998). Éstas lectinas pueden ser purificadas por afinidad con lactosa (Lac), ser inhibidas por N-acetilgalactosamina (GalNAc) o Lac, o reconocer de manera específica el antígeno histo-sanguíneo H-tipo II representado por la estructura del trisacárido  $\alpha$ -L-Fuc(1,2)- $\beta$ -D-Gal(1,4)- $\beta$ -D-GlcNAc-O-R (Almanza *et al.*, 2004; Dam *et al.*, 2011; Melgarejo *et al.*, 2005). Las dos lectinas de tipo II usadas en el presente estudio fueron LDG-II y LGL-II, de *Dioclea grandiflora* y *Galactia lindenii*, respectivamente. Los datos de aglutinación incluidos en la Tabla 1-3 para eritrocitos A, B, T, Tn, oveja y cerdo con la lectina LDG-II, y de eritrocitos O y oveja con LGL-II, fueron obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo.

**Tabla 1-3. Características fisicoquímicas y actividad eritroaglutinante de lectinas II de plantas de la tribu Diocleae**

Tipo de Lectina	Clado	Genero	Especie	Propiedades Fisicoquímicas			Tipo de eritrocito que aglutina y datos de aglutinación	Referencias
				Mr nativa (kDa)	Mr subunidad (kDa)	pI		
Tipo II (especificidad por carbohidratos diferentes de manósidos/ glucósidos)	Canavalia	<i>Canavalia</i>	<i>C. ensiformis</i>	57.5	29 - 30	5.3	CMA: 320.5 $\mu$ g/mL (O). NA: conejo.	Melgarejo <i>et al.</i> , 2005
	Dioclea	<i>Cymbosema</i>	<i>C. roseum</i>	/	25	/	CMA: < 2 $\mu$ g/mL (Conejo).	Rocha <i>et al.</i> , 2009; Dam <i>et al.</i> , 2011
		<i>Dioclea</i>	<i>D. grandiflora</i>	58.9	29 - 30	5.2	CMA: 0.11 $\mu$ g/mL (T); 1.82 $\mu$ g/mL (Cerdo); 304.5 $\mu$ g/mL (O). NA: A, B, Tn, oveja ni conejo.	Cortázar <i>et al.</i> , 2018; Melgarejo <i>et al.</i> , 2005
			<i>D. lehmanni</i>	58.4	29 - 30	6.5	Caballo > ABO > Conejo > Oveja. CMA: 0.3 $\mu$ g (ABO); 2.2 $\mu$ g (Conejo). NA: rata, ratón, mono, perro, cabra ni vaca.	Pérez, 1998
			<i>D. sericea</i>	57.3	26.6 - 30	5.4	B > AO	Sierra & Pérez, 1999
	Galactia	<i>Galactia</i>	<i>G. lindenii</i>	104.3	26.1	8.3	CMA: 1.1 $\mu$ g/mL (O); 7 $\mu$ g/mL (B); 26 $\mu$ g/mL (Rata); 28 $\mu$ g/mL (A); 350 $\mu$ g/mL (Conejo). NA: ratón, vaca, caballo, perro ni oveja.	Cortázar <i>et al.</i> , 2018; Almanza <i>et al.</i> , 2004
			<i>G. tenuiflora</i>	53	27	/	O > A	Lependu <i>et al.</i> 1986
			<i>G. tashiroi</i>	95	24	8.0	CMA: 2 $\mu$ g/mL (ABO); 128 $\mu$ g/mL (Conejo, y Rata)	Fukuda <i>et al.</i> , 1994
		<i>Camptosema</i>	<i>C. ellipticum</i>	104	26	5.1	CMA: 2.8 $\mu$ M (O). O > AB.	Batista <i>et al.</i> , 2010

kDa: kiloDalton; pI: punto isoeléctrico; Símbolo /: no se reporta en bibliografía consultada; CMA: concentración mínima aglutinante ensayada; NA: no aglutina. A, B, O, T y Tn: eritrocitos de origen humano.

### 1.4.3. Inhibición de las lectinas tipo I y tipo II de la tribu *Diocleae* por mono-, di- o trisacáridos

Diferentes estudios han mostrado que la actividad eritroaglutinante de las lectinas *Diocleae* puede ser inhibida por carbohidratos en diferentes rangos de concentración, dependiendo del carbohidrato y de la lectina. No se ha observado inhibición de la actividad de las lectinas *Diocleae* por las pentosas arabinosa, xilosa o ribosa (Almanza *et al*, 2004; Dam *et al*, 1998; Moreira *et al*, 1996), incluso usando concentraciones tan altas como 150 mM (Pérez G *et al*, 1990, 1991; Pérez G, 1998). Entre las hexosas, aquellas con mayor potencia inhibitoria de la actividad de las lectinas tipo I están la manosa ( $\alpha$ -D-Man) y su derivado metil- $\alpha$ -D-manopiranosido (Me- $\alpha$ -D-Man), con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) reportadas desde 2.1 mM y 0.3 mM, respectivamente, para lectinas de algunas especies (Me- $\alpha$ -D-Man;  $K_a$  entre  $0.13 \text{ M}^{-1} \times 10^{-4}$  –  $1.3 \text{ M}^{-1} \times 10^{-4}$ , dependiendo de la lectina); seguidas de glucosa ( $\alpha$ -D-Glc; CMI desde 4.2 mM) y su derivado metil- $\alpha$ -D-glucopiranosido (Me- $\alpha$ -D-Glc; CMI desde 1 mM) (Almeida *et al*, 2011; Azevedo *et al* 2011, 2012; Cavada *et al*, 1996, 2006, 2018; Correia *et al*, 1995; Dam *et al*, 1998, 2000, 2005, 2011; De Souza *et al*, 2003; Goldstein *et al*, 1986; Grangeiro *et al* 1997; Gupta *et al*, 1996; Moreira *et al*, 1983, 1996, 1997; Pérez G *et al*, 1990, 1991; Pérez G, 1998; Quintero, 2014; Ramos *et al*, 1996; Reynolds & Perez S, 2011; Sierra & Pérez, 1999; Silva *et al*, 2014); además, las lectinas tipo I de varias especies muestran preferencia por los anómeros  $\alpha$  siendo inhibidas por Me- $\alpha$ -D-Man pero no por Me- $\beta$ -D-Man, y en los casos en que se ha reportado inhibición por Me- $\beta$ -D-Glc ha sido a concentraciones mayores de 33.3 mM del monosacárido (Dam *et al*, 1998; Grangeiro *et al* 1997; Pérez G *et al*, 1990, 1991; Pérez G, 1998; Quintero, 2014; Ramos *et al*, 1996). La mayoría de las lectinas tipo I no muestran inhibición por galactosa ( $\alpha$ -D-Gal) o por sus derivados (Me- $\alpha$ -D-Gal; Me- $\beta$ -D-Gal), ni por fucosa. Entre los disacáridos, las manobiosas mostraron menores CMI; y para la mayoría de lectinas tipo I se observa una preferencia por el enlace  $\alpha$ 1,6 (Man $\alpha$ 1,6Man), con CMI desde 0.8 mM para algunas especies (Ramos *et al*, 1996); mientras que la sacarosa (Sac) inhibió algunas, pero no todas las lectinas tipo I, con CMI desde 8.3 mM; y la lactosa (Lac) no inhibió ninguna de las lectinas tipo I incluso a 150 mM (Pérez *et al*, 1991; Quintero, 2014). Entre todos los mono-, di- y trisacáridos reportados, el trimanósido Man $\alpha$ 1,6(Man $\alpha$ 1,3)Man fue aquel con mayor potencia inhibitoria para todas las lectinas tipo I (rango de CMI: 7 - 40  $\mu$ M). Durante la interacción, las lectinas tipo I reconocen los hidroxilos en los tres residuos de Man del trimanósido, mostrando una  $K_a$  (constante de afinidad) entre  $34.7 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$  y  $122 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ .

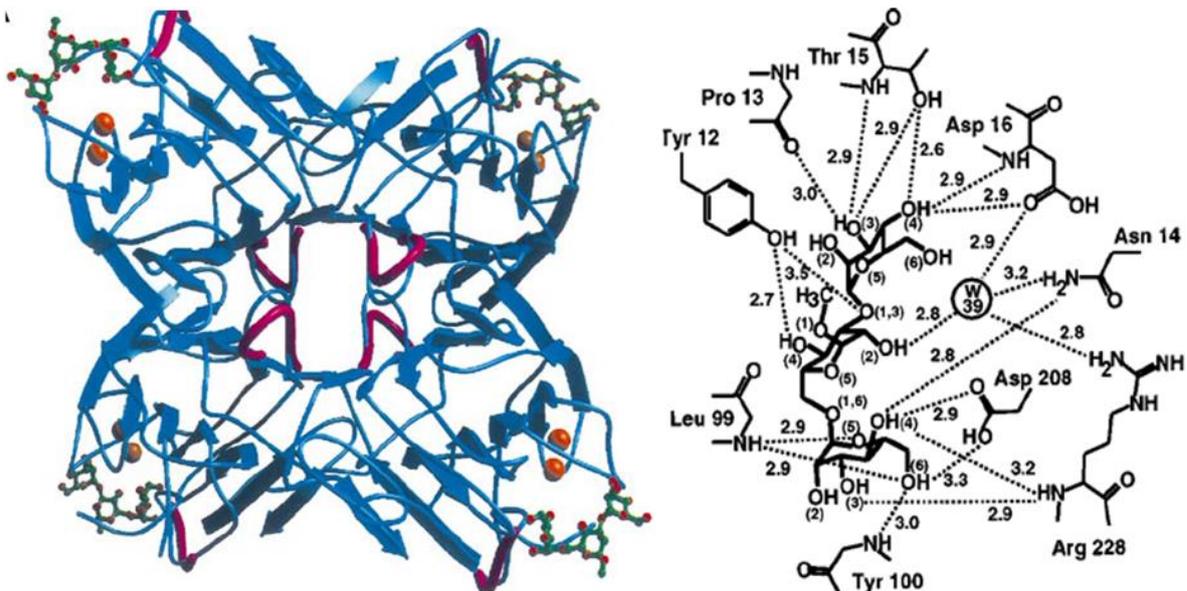
Por otro lado, la mayoría de las lectinas tipo II tienen en común que su actividad no es inhibida por  $\alpha$ -D-Man ni  $\alpha$ -D-Glc, ni por sus derivados Me- $\alpha$ Man, Me- $\alpha$ Glc o Me- $\beta$ Glc, hasta concentraciones tan altas como 200 mM (Melgarejo *et al*, 2005); sin embargo, estas lectinas muestran mayores diferencias entre sí en cuanto a su especificidad, en comparación con las lectinas tipo I. Por ejemplo, entre los monosacáridos que mostraron ser inhibidores de alguna de las lectinas tipo II (GlcNAc,  $\alpha$ -D-Gal, Me- $\alpha$ Gal, Me- $\beta$ Gal, o GalNAc) no hay uno en común que las inhiba a todas (Almanza *et al*, 2004; Batista *et al*, 2010; Dam *et al*, 2011; Fukuda *et al*, 1994; Lependu *et al* 1986; Melgarejo *et al*, 2005; Pérez G, 1998, Rocha *et al*, 2009; Sierra & Pérez G, 1999). Entre los disacáridos, Lac inhibió todas las lectinas tipo II ensayadas con CMI desde 2.3 mM; y la sacarosa inhibió la mayoría de las lectinas con CMI de hasta 40 mM. Entre los mono-, di- y trisacáridos reportados, el trisacárido H-tipo II (Fuc $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-O-R) presenta una alta interacción con estas proteínas. Para la lectina II de *C. roseum* se ha reportado una CMI de éste trisacárido de

18  $\mu\text{M}$  y  $K_a = 12.2 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$ , determinada por titulación microcalorimétrica (Dam *et al.*, 2011); y para las lectinas II de *G. lindenii* y *D. lehmanni*, por cromatografía frontal de afinidad se determinaron las constantes  $K_d = 9.3 \mu\text{M}$  y  $4 \mu\text{M}$ , respectivamente (Vega *et al.*, resultados no publicados). Por ensayos de ELLA, la interacción del determinante H-tipo II con LGL-II mostró la mayor absorbancia (Abs 415nm = 1.8) usando 7.3 ng de lectina con respecto a los otros determinantes tipo H ensayados (Almanza *et al.*, 2004). Para otras lectinas II se han reportado Abs 415 nm entre 0.38 y 1.4 usando 1  $\mu\text{g}$  de lectina (Melgarejo *et al.*, 2005; Pérez G, 1998). Otros ensayos mostraron que la melezitosa (otro trisacárido) inhibió la actividad de lectinas tipo II con CMI desde 25 mM (Melgarejo *et al.*, 2005; Pérez G, 1998; Sierra & Pérez G, 1999).

## 1.5. Lectinas de *Dioclea grandiflora* y *Galactia lindenii*

### 1.5.1. Lectina tipo I de *D. grandiflora* (LDG-I)

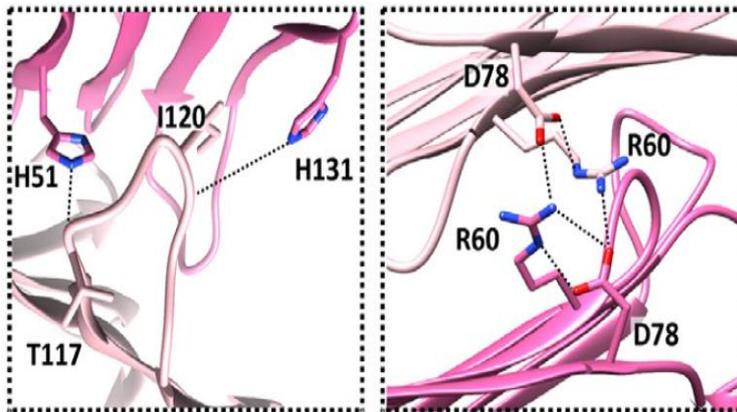
La lectina LDG-I tiene un 83% de identidad de secuencia de aminoácidos con la lectina concanavalina A (ConA) encontrada en la planta *Canavalia ensiformis* (Tabla 1-1), con la cual también comparte los residuos de unión a carbohidratos (Tyr12, Pro13, Asn14, Thr15, Asp16, Leu99, Asp208, y Arg228); los residuos implicados en la interacción no covalente con los metales  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (Glu8, Tyr12, Asn14, Asp19 y His24) y afinidad por el trimanósido [3,6-di-O-( $\alpha$ -D-manopiranosil)- $\alpha$ -D-manopiranosil] (Fig. 1-10; Dam *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 1996; Richardson *et al.*, 1984; Rozwarski *et al.*, 1998). Sin embargo, a diferencia de la lectina ConA, LDG-I no posee gran afinidad por carbohidratos complejos biantenarios (Dam *et al.*, 2000), y además, LDG-I puede aglutinar eritrocitos de diferentes especies incluidos humanos (Tabla 1-2); mientras que ConA aglutina algunos eritrocitos de animales (eg. perro > ratón, mono > conejo > rata) (Pérez G, 1998), pero no de humanos (Goldstein *et al.*, 1986; Pérez G, 1998).



**Figura 1-10. Estructura de la lectina LDG-I de *D. grandiflora*.** Izquierda: LDG-I en su forma tetramérica (azul), con cada subunidad interactuando con una molécula del trimanósido (varitas verdes y esferas rojas) y con iones metálicos (esferas naranjas). En color violeta se muestran los sitios en donde la estructura difiere de aquella de la lectina ConA de la misma familia. Derecha: residuos de aminoácidos de LDG-I interactuando

con el trimanósido. Esfera W39: molécula de agua conservada; líneas punteadas: interacciones por puentes de hidrógeno. Distancias indicadas en angstroms (Å). Recuperado de Rozwarski *et al.*, 1998.

En la estructura tetramérica de LDG-I, los contactos interdiméricos en la periferia están mediados por la interacción entre los residuos arginina R60 y ácido aspártico D78 de monómeros opuestos (Fig. 1-11), mientras que las interacciones interdiméricas en la cavidad central están dirigidas por la presencia de los residuos de histidina H51 y H131 (Zamora-Caballero *et al.*, 2015). Se ha visto que cambios en estos dos residuos de histidina afectan la conformación tridimensional del cristal, y consecuentemente sus propiedades biológicas (Barbosa *et al.*, 2013).



**Figura 1-11. Contactos interdiméricos en la LDG-I.** Interacciones interdiméricas mediadas por los residuos H51 y H131 hacia la cavidad central, y por R60 y D78 de monómeros opuestos en la periferia (PDB: 1DGL). Recuperado de Zamora-Caballero *et al.*, 2015.

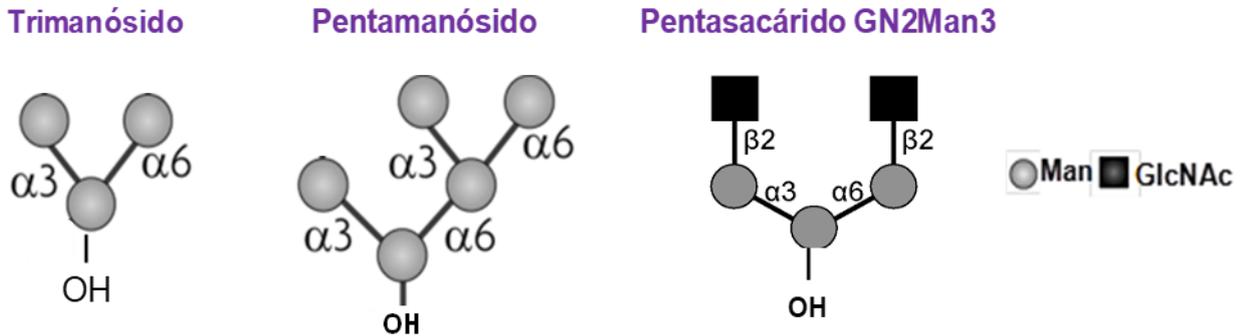
En la Tabla 1-4 se presentan las CMI de mono-, di-, tri- y oligosacáridos que inhiben la actividad de la LDG-I con eritrocitos de conejo, y se comparan con la lectina ConA. En general, la actividad de ambas lectinas puede ser inhibida por algunos carbohidratos que contengan Man o Glc; ambas mostrando preferencia por Man; y siendo ésta más marcada para la lectina LDG-I, la cual no fue inhibida por maltosa (Glc $\alpha$ 1,4Glc), y requiere de mayores concentraciones de Me- $\alpha$ Glc y de maltotriosa (Glc $\alpha$ 1,4Glc $\alpha$ 1,4Glc) para ser inhibida (Dam *et al.*, 1998). De este hallazgo también se puede inferir que la Glc en enlace  $\alpha$ 1,4 no es un inhibidor potente de la actividad de LDG-I. Ambas lectinas son inhibidas por  $\alpha$ Man y por derivados monosacáridos Me- $\alpha$ Man y Me- $\alpha$ Glc, a la vez que no son inhibidas por Me- $\beta$ Glc (Dam *et al.*, 1998, Gupta *et al.*, 1996; Ramos *et al.*, 1996), observándose la preferencia de las lectinas tipo I por los anómeros  $\alpha$  sobre los  $\beta$ , como se mencionó previamente. La actividad sobre eritrocitos de conejo de ambas lectinas tipo I no fue inhibida por el aminoazúcar acetilado N-acetil glucosamina (GlcNAc) (Gupta *et al.*, 1996). Las CMI de mono- y disacáridos son del orden de mM, mientras que las CMI del trimanósido y pentamanósido son del orden de  $\mu$ M.

**Tabla 1-4. Concentración mínima inhibitoria de mono-, di-, tri- y oligosacáridos sobre la actividad aglutinante de lectinas I de *Dioclea grandiflora* (LDG-I) y *Canavalia ensiformis* (ConA) en eritrocitos de conejo \***

Carbohidrato	LDG-I	ConA
<b>Monosacáridos y sus derivados</b>	α-D-Man	15 mM
	Me-αMan	3.1 mM (Ka: 0.46 M <sup>-1</sup> x 10 <sup>-4</sup> )
	α-D-Glc	16.7 mM
	Me-αGlc	25 mM
	Me-βGlc	NI a 150 mM
	GlcNAc	NI a 100 mM
<b>Disacáridos</b>	Manα1,2Man	4.6 mM
	Manα1,3Man	3.1 mM
	Manα1,6Man	2.0 mM
	Glcα1,4Glc	NI a 50 mM
	GlcNAcβ1,2Man	NI a 104 mM
<b>Trisacáridos</b>	Trimanósido	12 μM (Ka: 122 M <sup>-1</sup> x 10 <sup>-4</sup> )
	Maltotriosa	50 mM
<b>Oligosacáridos</b>	Pentamanósido	6 μM
	Pentasacárido GN2Man3	400 μM (Ka: 4.7 M <sup>-1</sup> x 10 <sup>-4</sup> )

\* α-D-Man: manosa; Me-αMan: metil-α-D-manopiranosido; Me-αGlc: metil-α-D-glucopiranosido; Me-βGlc: metil-β-D-glucopiranosido; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Maltosa: Glcα1,4Glc; Trimanósido: Manα1,3(Manα1,6)Man; Maltotriosa: Glcα1,4Glcα1,4Glc; Pentamanósido: (Man α1,6[Man α1,3]Man α1,6[Man α1,3]Man-OH); Pentasacárido GN2Man3: GlcNAcβ1,2Manα1,3(GlcNAcβ1,2Manα1,6)Man-OH; Ka: constantes de afinidad reportadas; NR: no reportado en la literatura revisada; α y β: configuraciones de los enlaces glicosídicos en los carbohidratos indicados. Refs: Chen, 2008; Dam *et al*, 1998, 2005; Goldstein *et al*, 1986; Gupta *et al*, 1996; Moreira *et al*, 1983; Pérez G, 1998; Ramos *et al*, 1996; Reynolds & Perez S, 2011.

En lo referente a los disacáridos, ambas lectinas tienen mayor especificidad por las manobiosas, sin embargo, LDG-I tiene preferencia por manosas en enlace α1,6, mientras que ConA por manosas en enlace α1,2; y ConA es inhibida por GlcNAcβ1,2Man mientras que LDG-I no (Dam *et al*, 1998). Se ha reportado que, entre los carbohidratos con mayor potencia inhibitoria de la actividad de lectinas tipo I, se encuentra el trimanósido, el cual esta presente en glicoproteínas con N-glicosilación. La CMI del trimanósido para la actividad aglutinante de la LDG-I sobre eritrocitos esta en el rango de 7 – 25 μM, dependiendo del tipo de eritrocito (Gupta *et al.*, 1996); y es de 25 μM para la actividad ConA sobre eritrocitos de conejo (Ramos *et al.*, 1996). Además, entre todas las lectinas tipo I estudiadas, LDG-I es aquella que ha presentado la mayor interacción con el trimanósido. Termodinámica de unión determinados por microcalorimetría de titulación isotérmica han mostrado que LDG-I reconoce los grupos hidroxilo 2-, 3-, 4- y 6- del residuo α(1,6) Man, los grupos hidroxilo 3- y 4- del residuo α(1, 3)Man, y los grupos hidroxilo 2- y 4- del residuo Man central del trimanósido (Fig. 1-10; Dam *et al.*, 1998, 2000; Reynolds & Perez S, 2011). La lectina ConA posee mayor afinidad por el carbohidrato complejo biantenarico GN2Man3 que la lectina LDG-I (Dam *et al.*, 2000). En la Fig. 1-12 se muestran las representaciones de oligosacáridos con los que pueden interactuar las lectinas tipo I de la tribu Diocleae.



**Figura 1-12. Estructuras de oligomanósidos que interactúan con lectinas tipo I.** La nomenclatura simbólica es aquella acordada por el *Consortium for Functional Glycomics*. ([www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org)) y aceptada por IUPAC: círculos: hexosas; cuadrados: N-acetilhexosaminas; negro: esteroquímica de glucosa; gris: esteroquímica de manosa. Man: manosa, GlcNAc: N-acetilglucosamina.

LDG-I esta dentro del grupo de moléculas con propiedades farmacológicas encontradas en la planta *D. grandiflora*. Esta lectina posee capacidad de estimular la proliferación de linfocitos en concentraciones entre 1 -10  $\mu\text{g/mL}$ ; y la producción de interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) por células mononucleares humanas usando 10  $\mu\text{g}$  de lectina (Barral-Neto *et al*, 1992), además puede inhibir la adherencia de especies de streptococci orales *in vitro*, muestra toxicidad hacia el caracol *Biomphalaria glabrata* hospedero de *Schistosoma mansoni* que infecta a seres humanos, con una concentración letal para el 100% de la población de caracoles adultos de 50  $\mu\text{g/mL}$  de lectina; y su concentración letal para el 90% de la población del crustáceo *Artemia salina* es de 10  $\text{mg/mL}$  (revisado en Sá *et al.*, 2013).

### 1.5.2. Lectinas tipo II de *D. grandiflora* y *G. lindenii*.

Estudios realizados en el grupo de investigación en proteínas (GRIP), permitieron encontrar las lectinas tipo II en las semillas de *D. grandiflora* (LDG-II) y de *G. lindenii* (LGL-II). En las primeras investigaciones se determinó que estas dos lectinas pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad a Lac y reconocer el antígeno histo-sanguíneo H-tipo II,  $\alpha\text{-L-Fuc}(1,2)\text{-}\beta\text{-D-Gal}(1,4)\text{-}\beta\text{-D-GlcNAc-O-R}$  (Fig. 1-13); ambas poseen en su N-terminal la secuencia SSS (Almanza *et al.*, 2004; Melgarejo *et al.*, 2005), encontrada en otras lectinas tipo II de la tribu *Diocleae* (Batista *et al*, 2010; Pérez G, 1998; Quintero, 2014; Rocha *et al*, 2009; Sierra & Pérez G, 1999), y ninguna de las dos lectinas es inhibida por Man o Glc (Almanza *et al.*, 2004; Melgarejo *et al.*, 2005). Se presentan diferencias en las características fisicoquímicas y de especificidad; la LDG-II es una proteína con punto isoeléctrico (pI) ácido, posee dos monómeros que interactúan de forma no covalente, y su actividad aglutinante puede ser inhibida por los disacáridos Lac y Sac, y por el trisacárido melezitosa; mientras que, la LGL-II es homotetramérica, con pI básico, y su actividad es inhibida por Lac pero no por Sac ni melezitosa usando concentraciones hasta 100 mM (Tabla 1-5). Las concentraciones relativamente altas de mono-, di- y trisacáridos necesarias para inhibir la eritroaglutinación indican que las dos lectinas, podrían reconocer estructuras más complejas.

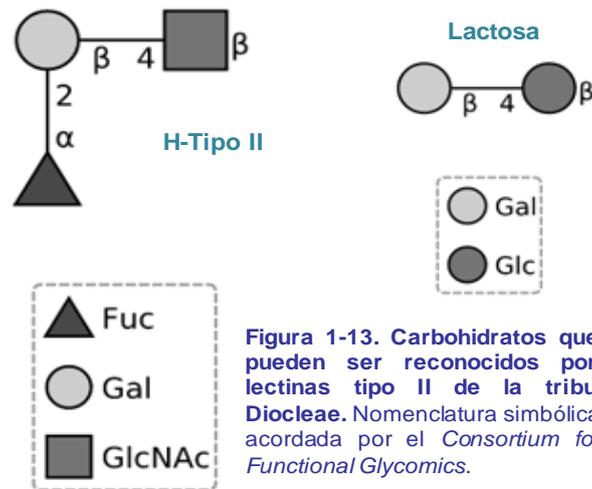


Figura 1-13. Carbohidratos que pueden ser reconocidos por lectinas tipo II de la tribu Diocleae. Nomenclatura simbólica acordada por el Consortium for Functional Glycomics.

Tabla 1-5. Concentración mínima inhibitoria de mono-, di- y trisacáridos sobre la actividad aglutinante de lectinas II de *D. grandiflora* (LDG-II) y *G. lindenii* (LGL-II) en eritrocitos O+ \*

Carbohidrato		LDG-II	LGL-II
Monosacáridos	α-D-Man	NI hasta 200 mM	NI hasta 100 mM
	α-D-Glc	NI hasta 200 mM	NI hasta 100 mM
	α-D-Gal	NR	100 mM
	GalNAc	NR	12.5 mM
Disacáridos	Glcα1,2βFru	40 mM	NI hasta 100 mM
	Galβ1,4Glc	90 mM	50 mM
Trisacárido	Glcα1,2Fruα1,3Glc	25 mM	NI hasta 100 mM

\*α-D-Man: manosa; α-D-Glc: glucosa; α-D-Gal: galactosa; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Sacarosa: Glcα1,2βFru; Lactosa: Galβ1,4Glc; Melezitosa: Glcα1,2Fruα1,3Glc; NR: no reportado en la literatura revisada. α y β: configuraciones de los enlaces glicosídicos en los disacáridos y trisacáridos indicados. Refs: Almanza *et al.*, 2004; Melgarejo *et al.*, 2005.

Almanza *et al.* (2004) y Melgarejo *et al.* (2005) realizaron ensayos de ELLSA para evaluar la interacción de las lectinas biotiniladas usando neoglicoconjugados que presentaban las estructuras de carbohidratos presentes en diferentes determinantes histo-sanguíneos de tipo H y Lewis (Tabla 1-6), mostrando que ambas lectinas tipo II tienen preferencia por el determinante H-tipo II en comparación con los otros determinantes. Por los valores de absorbancia, se infiere que dicho ligando es mucho más específico para la LGL-II (Abs 415nm = 1.8; usando alrededor de 7.3 ng de lectina) (Almanza *et al.*, 2004) que para LDG-II (Abs 415nm = 0.8 usando 1 μg de lectina) (Melgarejo *et al.*, 2005). La alta especificidad de LGL-II por el determinante H-tipo II en comparación con la especificidad más débil por el resto de determinantes, conllevó a Almanza *et al.* a concluir que los hidroxilos 3-OH de GlcNAc; 3-, 4- y 6-OH de Gal; y 4-OH de Fuc, están implicados en la formación de puentes de hidrógeno durante la interacción; además que la presencia del enlace glicosídico Fuca1,2Gal es necesaria para la interacción y que la afinidad es mucho mayor cuando Gal y GlcNAc están unidos por un enlace β1,4 (Almanza *et al.*, 2004).

**Tabla 1.6. Interacción de LDG-II y LGL-II con los determinantes histo-sanguíneos tipo H y Lewis**

Determinante (0.65 µg/mL)	Fórmula estructural	Lectina (ng) Abs 415 nm = 0.5		Descripción general
		LDG-II	LGL-II	
<b>H-Tipo I</b>	Fuca1,2Galβ1,3GlcNAc-O-R	500	967	Grupos histo-sanguíneos y antígenos relacionados: carbohidratos complejos presentes en la superficie de eritrocitos y epitelios, y libres en fluidos biológicos. La sustancia H (Fuca1,2Gal), precursora de los antígenos A, B, Le <sup>y</sup> y Le <sup>b</sup> , esta presente en cuatro tipos diferentes de cadenas de carbohidratos (tipos I y II en glicoproteínas y glicolípidos; tipos III y IV en glicolípidos).
<b>H-Tipo II</b>	Fuca1,2Galβ1,4GlcNAc-O-R	425	14	
<b>H-Tipo III</b>	Fuca1,2Galβ1,3GalNAcα-O-R	>1000	72	
<b>H-Tipo IV</b>	Fuca1,2Galβ1,3GalNAcβ-O-R	937	402	
<b>Le<sup>a</sup> (tipo I)</b>	Galα1,3(Fuca1,4)GlcNAc-O-R	>1000	>1000	
<b>Le<sup>x</sup> (tipo II)</b>	Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAc-O-R	nd	nd	
<b>Le<sup>b</sup> (tipo I)</b>	Fuca1,2Galβ1,3(Fuca1,4)GlcNAcβ-O-R	nd	nd	
<b>Le<sup>y</sup> (tipo II)</b>	Fuca1,2Galβ1,4(Fuca1,3)GlcNAcβ-O-R	>1000	>1000	

\* Fuc: fucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Gal: galactosa. α y β: configuraciones de los enlaces glicosídicos en los glicanos indicados. nd: no determinado. Las lectinas biotinizadas se usaron en diluciones seriadas partiendo de 0.5 mg/mL (1 µL). Refs: Almanza *et al*, 2004; y Melgarejo *et al*, 2005, respectivamente. Información general de los determinantes en Refs: Anstee, 1990; Himbert *et al*, 2017; Jaff, 2010; Méhul, 2003, Möginger *et al*, 2018; Podbielska *et al*, 2004; Ravn & Dabelsteen, 2000.

La determinación de las constantes de afinidad (Kd) por cromatografía frontal de afinidad (Vega *et al.*, resultados no publicados) corroboraron los resultados del ensayo de ELLSA, donde la mejor interacción se presentó con el trisacárido H-tipo II (Kd = 9.7 µM) y la lectina reconoció de manera preferencial la configuración β1,4 (740) en comparación a la configuración β1,3 (729) (20 µM > 220 µM); además, LGL-II mostró preferencia por trisacáridos (718) (9.7 µM > 20 µM) en comparación con pentasacáridos (740):



718

$$K_a = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$$

$$K_d = 9.7 \text{ } \mu\text{M}$$



729

$$K_a = 4.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$$

$$K_d = 220 \text{ } \mu\text{M}$$



740

$$K_a = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$$

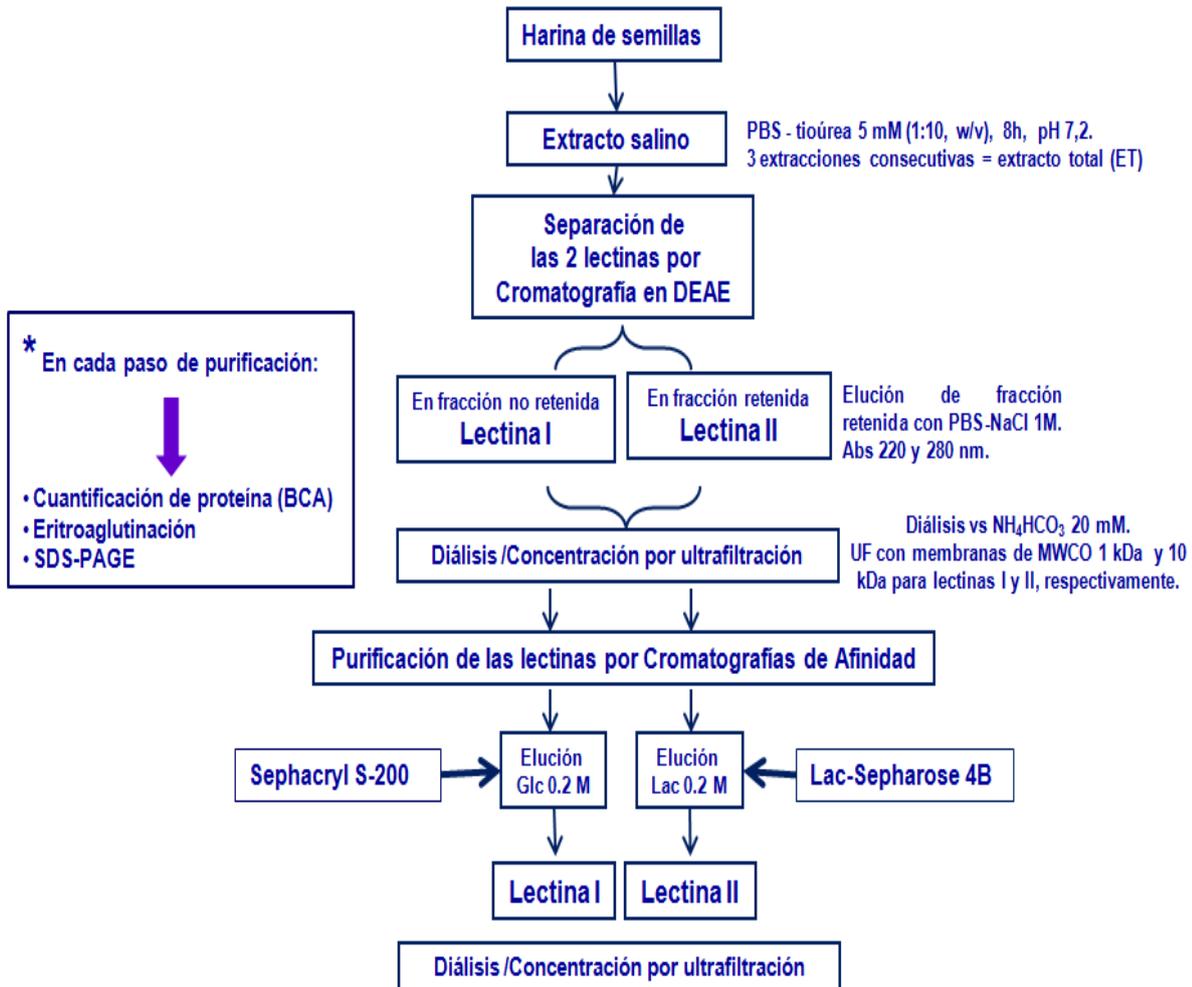
$$K_d = 20 \text{ } \mu\text{M}$$

## 2. Purificación de lectinas de la familia Fabaceae

### 2.1. Introducción

En el presente trabajo las dos lectinas de *D.grandiflora*, (LDG-I y LDG-II) pudieron ser aisladas a partir de un mismo extracto de semillas maduras, para lo cual se propuso un esquema general, teniendo en cuenta la diferencia en su punto isoeléctrico; inicialmente se hizo cromatografía de intercambio iónico para separarlas, y posteriormente, cada una de ellas se purificó por cromatografía de afinidad (Diagrama 2-1). En trabajos previos, estas dos proteínas fueron purificadas cada una de manera independiente (Melgarejo *et al.*, 2005; Moreira *et al*, 1983). La lectina LGL-II de *Galactia lindenni* se purificó siguiendo el mismo esquema, y en este caso la

fracción usada para la cromatografía de afinidad a lactosa fue la fracción no retenida en DEAE dado que el pI de LGL-II es 8.3 (Almanza *et al*, 2004). En ensayos iniciales, la liofilización de la lectina LDG-I produjo una disminución en su actividad aglutinante por lo cual se evitó este proceso durante la purificación de las tres lectinas.



**Diagrama 2-1. Esquema para la purificación de las lectinas presentes en semillas de *D. grandiflora*.** PBS: buffer fosfato salino; DEAE-Sephadex: matriz de dextrán con grupo dietilaminoetil-; Abs: absorbancia; BCA: ácido biscinconínico; SDS-PAGE: electroforesis en poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio;  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ : bicarbonato de amonio; UF: ultrafiltración; MWCO: *molecular weight cut-off*; kDa: kiloDaltons; Glc: glucosa; Lac: lactosa.

## 2.2. Marco teórico

### 2.2.1. Tiourea en el buffer de extracción

La tiourea se ha incluido en los procesos de obtención de extractos de origen vegetal (Van Driessche *et al*, 1984), por ejemplo los obtenidos durante la purificación de lectinas de especies de las familias Fabaceae y Lamiaceae (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005; Vega & Pérez G, 2006; Wilches *et al.*, 2017), con el fin de reducir la pigmentación al inhibir la reacción de oxidación

de fenoles, la cual es catalizada por polifenoloxidasas (Anexo I); de esta forma se evita que las quinonas formadas se unan a las proteínas produciendo complejos proteína-fenol que pueden reducir la solubilidad y actividad de las proteínas (Lee *et al*, 2009; Queiroz *et al*, 2008). La tiourea es activa en un rango amplio de pH (3 – 9.6) (Van Driessche *et al*, 1984). Estudios realizados con otros inhibidores como metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), mostraron que la actividad eritroaglutinante de la lectina del tubérculo de tomate se perdía durante la extracción y la diálisis. Los efectos de otros agentes antioxidantes como DDCA (dietilditiocarbamato) sobre varios péptidos y derivados de aminoácidos, afectaron el triptófano, la cisteína y la cistina mientras que la tiourea no mostró efecto alguno (Van Driessche *et al*, 1984). Igualmente, en ensayos preliminares Almanza *et al*. (2004) y Vega & Pérez G (2006) observaron disminución en los títulos de aglutinación de los extractos de semillas de *G. lindenii* y *Salvia bogotensis* cuando se realizó la extracción en presencia del agente que precipita polifenoles, polivinilpolipirrolidona (PVPP); la pérdida de actividad de las lectinas se atribuye a la adsorción sobre PVPP.

### 2.2.2. El pH y la actividad lectina

En varios estudios se ha observado que la actividad lectina es influida por el pH. Lectinas del género *Dioclea* han mostrado actividad aglutinante en el rango de pH 5-8, mientras que a pH menor a 5, o igual o mayor a 10, la actividad eritroaglutinante o la unión de las lectinas a columnas de matrices de carbohidratos se pierde (do Nascimento A.S *et al*, 2012; Melgarejo *et al*, 2005; Moreira *et al*, 1983; Pinto-Júnior *et al*, 2013). Lectinas de especies del género *Galacia* mantienen su actividad en el rango de pH 4-10 (Almanza *et al*; 2004; Fukuda *et al* 2014; LePendou *et al*, 1986; Quintero, 2014), y a pH 3 ocurre hemólisis de los eritrocitos. Melgarejo *et al* (2005) realizaron la extracción de proteínas de semillas de *D. grandiflora* a pH 7; y Almanza *et al* (2004) y Quintero (2014) extrajeron proteínas de semillas de *G. lindenii* a pH 5, esos valores están dentro de los rangos en los que se mantiene la actividad de las lectinas de dichos géneros y están en concordancia con los pH encontrados en las células vegetales, con valores típicos de 7.5 en el citoplasma, 5.5 en vacuolas y espacio extracelular (<http://croptechnology.unl.edu/>); así como 6.2 – 6-5 en los cotiledones de las semillas (Billon-Grand *et al*, 2012).

También se ha observado el efecto del pH en lectinas de la familia Lamiaceae. Vega & Pérez G (2006) obtuvieron los mejores resultados realizando la extracción de proteínas de la harina de semillas de *Salvia bogotensis* usando PBS-tiourea 5 mM, pH 7.2, y reportaron que la estabilidad máxima de la lectina de *Salvia bogotensis* (LSBo) se alcanza a pH entre 7-8, mientras que la lectina pierde completamente su actividad a pH muy bajos (pH 2.0) o a pH muy altos (pH 12.5).

## 2.3. Metodología

### 2.3.1. Extracción y purificación de las lectinas de *Dioclea grandiflora* (LDG-I y LDG-II)

#### 2.3.1.1. Preparación del extracto salino

Las semillas de *D. grandiflora* fueron colectadas en Crato, Ceará (Brasil) y obsequiadas por el Dr. Renato Moreira, profesor de la Universidade Federal do Ceará. Las proteínas solubles fueron

extraídas partiendo de 5 g de harina de semillas molidas en una proporción harina: buffer (1:10 p/v). Se hicieron tres extracciones consecutivas, cada una con 50 mL de buffer fosfato salino (PBS 1X), pH 7.2 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, *Biopack Art.* 163908; 7558-79-4;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM, *Applichem Biochemica Cas #* 10049-21-5; NaCl 150 mM, Sigma S-7653), con tiourea 5 mM (Carbo Erba 488105), a 4°C en agitación suave, durante 8 h. Tres extractos fueron obtenidos luego de centrifugación a 36000 g durante 30 min a 4°C, en una centrifuga refrigerada *Sorvall RC5C* (rotor 5, RCF 11953), y se unieron para obtener el extracto salino total (ET), el cual fue dializado contra una solución de bicarbonato de amonio 20 mM ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), realizando tres cambios y almacenado a -20 °C hasta posteriores ensayos.

### 2.3.1.2 Cromatografía de intercambio iónico

Inicialmente, 15 mL del ET se pasaron sobre una columna de *DEAE-Sephadex A-50* (3.5 x 7.5 cm), la cual es una matriz hidrofílica de dextrán entrecruzado, que posee el grupo iónico dietilaminoetil [-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N+H(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] como ligando y permanece cargado positivamente en un rango de pH de 2.0 – 9.0 (GE Healthcare Handbook, 2010). La columna se equilibró con PBS 1X; se dejó eluir la fracción no retenida (DEAE-NR); y luego, se eluyó la fracción retenida (DEAE-R) aumentando la fuerza iónica del PBS 1X con NaCl 1M. Las dos fracciones obtenidas fueron sometidas a diálisis contra una solución de bicarbonato de amonio 20 mM; a cambio a buffer PBS 1X y a concentración en una celda con agitación para ultrafiltración (*Amicon*) usando una membrana de celulosa límite de tamaño molecular (*MW cut off*) de 1 kDa (*Millipore*) para la DEAE-NR y de 10 kDa para la DEAE-R; posteriormente las fracciones se almacenaron a -20°C hasta su uso en los ensayos subsiguientes.

### 2.3.1.3 Cromatografía de afinidad

La lectina LDG-I, con afinidad conocida por manosa/glucosa (Man/Glc), fue purificada a partir de la fracción DEAE-NR. Dicha fracción se aplicó a una columna de *Sephacryl S-200* (copolimero entrecruzado de alil dextrán y N,N'-metilenbisacrilamida) (GE Healthcare Handbook, 2010), previamente equilibrada con PBS 1X. La fracción retenida en *Sephacryl* se eluyó usando PBS 1X-Glc 0.2 M. Luego, dicha fracción fue sometida a cambio a buffer PBS 1X y a concentración por ultrafiltración usando una membrana de celulosa con *MW cut off* de 1 kDa; posteriormente la fracción obtenida se almacenó a -20°C para ensayos posteriores.

Con el fin de purificar la lectina LDG-II con afinidad por conocida por lactosa (Lac), inicialmente, la fracción DEAE-R se desalinizó y se concentró por ultrafiltración usando una membrana de celulosa con *MW cut off* de 10 kDa (*Millipore*, PLG CO6210; *Amicon Bioseparations*, USA), y luego se aplicó a la columna de afinidad *Sepharose 4B* acoplada a Lac (*Sepharose 4B-Lac*), previamente equilibrada con PBS 1X. La fracción con afinidad a Lac (lectina LDG-II) se eluyó usando PBS 1X-Lac 0.2 M, se sometió a diálisis contra bicarbonato de amonio 20 mM, a cambio a buffer PBS 1X y a concentración por ultrafiltración, y se almacenó a -20°C para posteriores ensayos. Para obtener la matriz de afinidad *Lactosil-Sepharose 4B*, se realizó el acople de Lac previamente lavada en etanol, a la matriz de *Sepharose 4B* activada con divinilsulfona (DVS), siguiendo la metodología descrita por Hermanson *et al*, 1992 (Anexo II).

### 2.3.2. Purificación de la lectina LGL-II de *Galactia lindenii*

La especie y las semillas de *G. lindenii* se recolectaron en los alrededores de Fúquene, Cundinamarca (Colombia) y fueron identificadas por el Botánico Profesor Jose Luis Fernández Alonso. Se dejaron testigos en el instituto de Ciencias Naturales (ICN) y se registraron con los *voucher* COL 15115 y 580116. Por otra parte, para estudiar esta especie nativa el contrato de acceso a recurso genético otorgado por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible fue el RGE246. La lectina LGL-II fue aislada siguiendo la metodología descrita en 2.3.1. En este caso la lectina II se encuentra en la fracción DEAE-NR dado que su *pI* es de 8.3 (Almanza *et al*, 2004). La lectina se purificó por afinidad a *Sepharose* 4B-Lac a partir de la fracción DEAE-NR.

### 2.3.3. Cuantificación de proteína

Para la cuantificación de proteína total en solución se usó el método del ácido bicinconónico (BCA) (Smith *et al.*, 1985, Anexo III). El ensayo se realizó en microplaca de 96 pozos, con diluciones seriadas de las fracciones obtenidas en cada uno de los pasos purificación de las lectinas (25  $\mu$ L). La curva de calibración se realizó usando diluciones de albumina sérica bovina (BSA). Brevemente, se vertieron 100  $\mu$ L de buffer carbonato, pH 11.24 sobre cada muestra, seguidos de otros 100  $\mu$ L de una solución de BCA al 1% (p/v) que contenía  $\text{CuSO}_4$  al 4%. Las microplacas con las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C, luego se dejaron enfriar unos minutos antes de realizar la lectura de absorbancia a 540 nm.

### 2.3.4. Electroforesis de las fracciones de purificación de las lectinas

Las fracciones obtenidas durante la purificación de LDG-I se sometieron a separación electroforética siguiendo la metodología *Tricina-SDS-PAGE* (Schägger & von Jagow, 1987); y las fracciones de purificación de LDG-II y LGL-II se sometieron a separación electroforética siguiendo la metodología descrita por Laemmli, 1970 (*Glicina-SDS-PAGE*). Las muestras (20 - 50  $\mu$ g proteína total) se mezclaron con buffer de carga 10X (Tris-HCl 450 mM pH 8.45, SDS 4%, glicerol 12%, DTT (0,154 g/mL), Coomassie Blue G-250 0,0025% y rojo de fenol 0.025%); se denaturaron a 95 - 100°C durante 5 min; se sometieron a concentración en un gel del 5% de poliacrilamida y se separaron en geles del 15%. Las electroforesis se realizaron a 100 V durante aproximadamente 1.5 h. Los geles se tiñeron usando Coomassie G-250 (SERVA, Cat. 17524) en solución [1 mg/mL en metanol 40% (Merck, Cat. 6009.2500) y ácido acético 10% (J.T. Baker Cat. 9507.3)].

### 2.3.5. Ensayos de eritroaglutinación

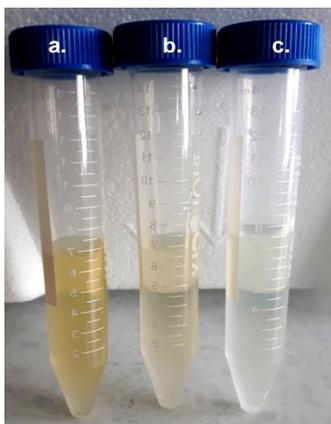
La actividad de la lectina presente en el extrato total de semillas, así como en cada uno de los pasos de purificación, fue evaluada realizando diluciones seriadas dispuestas en microplacas de 96 pozos (Pérez G, 1984), en ensayos de aglutinación de eritrocitos suspendidos en buffer PBS 1X, pH 7.2 - 7.4. Las suspensiones de eritrocitos se prepararon al 2% (v/v) partiendo de 500  $\mu$ L de eritrocitos que se lavaron 3 veces con 1 mL de buffer, centrifugando a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C, cada vez (Navarro & Pérez G, 1978). En el caso de la LDG-I, el buffer PBS contenía  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{MnCl}_2$  (ambos a 5 mM), dado que esta lectina ha mostrado requerimiento de iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (Moreira *et al*, 1983); el buffer con iones se prepara en el momento del ensayo para evitar la precipitación en presencia de iones divalentes que ocurre cuando el buffer se refrigera (Anexo IV).

En las microplacas se sembraron 50  $\mu$ L de muestra de cada paso de purificación + 50  $\mu$ L de buffer + 50  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos al 2%. En el caso de las muestras de proteína pura, se emplearon 25  $\mu$ L de muestra + 25  $\mu$ L de buffer + 25  $\mu$ L de la suspensión de eritrocitos. Se dejó que la lectina interaccionara con la superficie del eritrocito durante 30 min a temperatura ambiente. Los blancos se prepararon usando 100  $\mu$ L de buffer + 50  $\mu$ L de la suspensión de glóbulos rojos. La actividad aglutinante fue calculada teniendo en cuenta los títulos específicos de aglutinación y la concentración de lectina utilizada. El título específico se define como el título de aglutinación dividido en la cantidad de proteína ( $\mu$ g) presente en la solución ensayada. La concentración mínima aglutinante (CMA) representa la concentración más baja ensayada de lectina en la cual la aglutinación celular fue visible.

Los eritrocitos que exponían los antígenos determinantes T y Tn se preparon a partir de suspensiones de eritrocitos A al 10%, sometidos a degradación enzimática con 0,05U de  $\alpha$ -neuraminidasa, durante 3 h a 37°C, con el fin de exponer el antígeno T, seguida de degradación con 30U de  $\beta$ -galactosidasa, para exponer el antígeno Tn (Hirohashi *et al.*, 1985); y se usaron en suspensiones al 2% como esta descrito.

## 2.4. Resultados

En los extractos se observó una disminución significativa de pigmentos con respecto a los que se obtuvieron sin tiourea (Fig. 2-1 a, b). Adicionalmente, la fracción DEAE-NR, en la cual esta presente la lectina LDG-I (en el caso del extracto de *D. grandiflora*), o la lectina LGL-II (en el caso del extracto de *G. lindenii*); queda desprovista de pigmentos luego del fraccionamiento del extracto sobre la columna de intercambio aniónico (Fig. 2-1c), de esta forma, en los pasos posteriores de purificación no se afectan los soportes de afinidad.

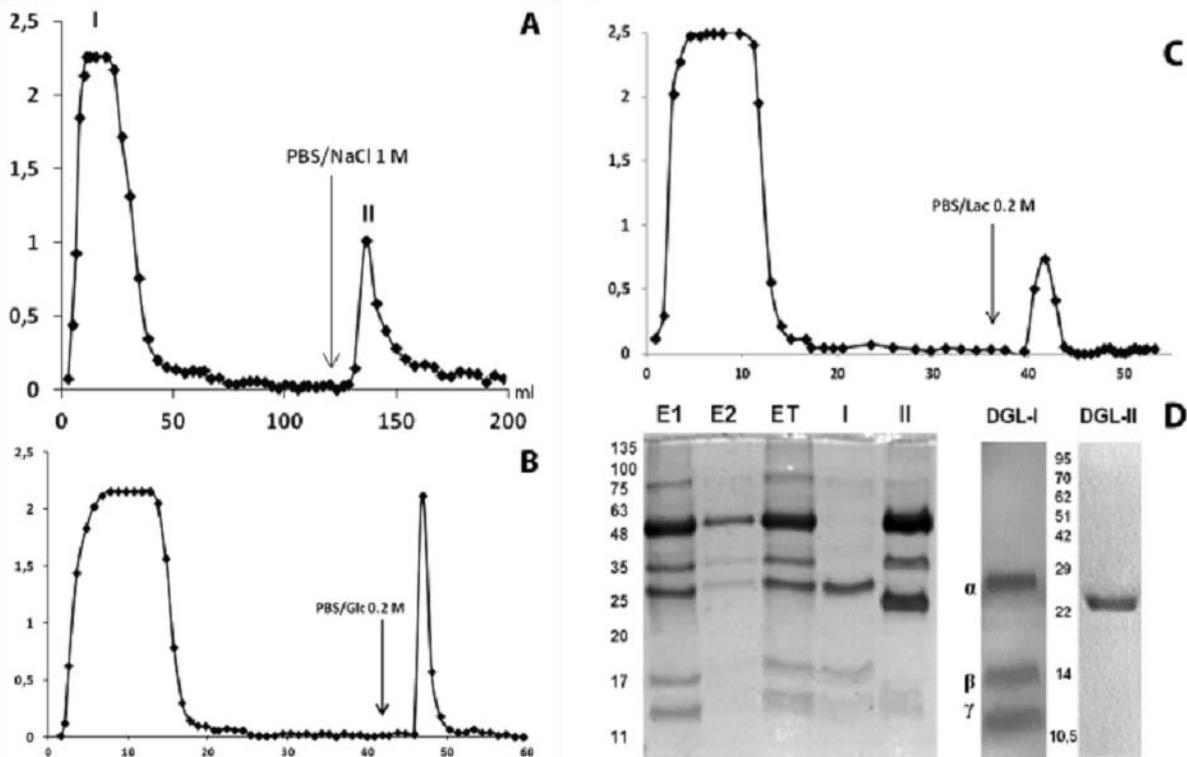


**Figura 2-1. Uso de tiourea en la extracción de semillas.** a. Extracto salino total (ET) de semillas de *D. grandiflora* a partir de extracción sin tiourea. b. ET a partir de extracción en presencia de tiourea 5 mM. c. Fracción no retenida en DEAE, partiendo del fraccionamiento del ET producido en presencia de tiourea.

Los resultados obtenidos durante la extracción y el proceso de purificación de las dos lectinas de *D. grandiflora* se muestran en la Tabla 2-1. La concentración de proteína soluble en el extracto salino total (ET) de *D. grandiflora* fue de 4.4 mg/mL y dicho extracto mostró la capacidad de aglutinar todos los eritrocitos evaluados [humanos A, B, O, T, y Tn; de cerdo (C) y de oveja (Ov)]. El ET fue fraccionado en un soporte DEAE-*Sephadex* A-50 equilibrado en PBS 1X. El material no retenido en la columna (DEAE-NR) se dejó eluir con el buffer de equilibrio (Fig. 2-2a, pico I); mientras que la fracción DEAE-R, compuesta por macromoléculas con carga neta negativa a pH 7.2, fue eluida con mayor fuerza iónica usando PBS-NaCl 1M (Fig. 2-2a, pico II). Las fracciones

DEAE-NR y DEAE-R exhibieron actividad aglutinante hacia determinados tipos de eritrocitos. Las actividades específicas fueron diferenciándose a lo largo de cada uno de los pasos de purificación, según la lectina y el tipo de eritrocitos (Tabla 2-1). La actividad diferencial sobre los diferentes tipos de eritrocitos se discutirá más adelante.

La fracción DEAE-NR fue purificada sobre *Sephacryl* S-200 para obtener la LDGL-I por elución con Glc 0.2 M en PBS (Fig. 2-2b). La electroforesis SDS-PAGE mostró que la cromatografía de afinidad es un paso importante para remover otras proteínas de mayor peso molecular observadas en la fracción DEAE-NR (Fig. 2-2d). La lectina LDG-I mostró por SDS-PAGE el perfil característico para la LDG-I (Ainouz *et al.*, 1987; Moreira *et al.*, 1983) y para otras lectinas tipo I de la tribu Diocleae (Carrington *et al.*, 1985; Cavada *et al.*, 1996; Correia *et al.*, 2011; Do Nascimento *et al.*, 2012; Moreira & Cavada, 1984; Moreira *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 1991; Pérez G *et al.*, 1990; Pérez G *et al.*, 1991; Pérez G, 1998; Pinto-Júnior *et al.*, 2013; Pinto-Júnior *et al.*, 2016; Rangel *et al.*, 2011; Sierra & Pérez., 1999; Vasconcelos *et al.*, 1991), disociándose en una subunidad  $\alpha$  ( $\approx$  27.3 kDa) y los dos fragmentos  $\beta$  y  $\gamma$ , de  $\approx$  14.7 kDa y  $\approx$  12.1 kDa, respectivamente. La electroforesis Tricina-SDS-PAGE facilitó una buena resolución de dichos fragmentos (Fig. 2-2d), en concordancia con lo reportado para esta técnica, la cual permite una mayor separación de proteínas con pesos moleculares inferiores a 20 kDa (Schägger & von Jagow, 1987). Por otro lado, la fracción DEAE-R fue aplicada a una columna de *Sepharose*-Lac y la LDG-II fue eluida con PBS-Lac 0.2 M (Fig. 2-2c). Por Glicina-SDS-PAGE (Laemmli), se encontró una banda de aproximadamente 25.4 kDa (Fig. 2-2d).



**Figura 2-2. Purificación de las lectinas de *Dioclea grandiflora*.** a. Perfil cromatográfico obtenido sobre matriz de *DEAE-Sephadex* A-50. b. Cromatografía de afinidad sobre *Sephacryl* S-200 para obtener la lectina LDG-I. c. Cromatografía de afinidad sobre *Sepharosa* 4B-Lac para obtener la lectina LDG-II. d. SDS-PAGE



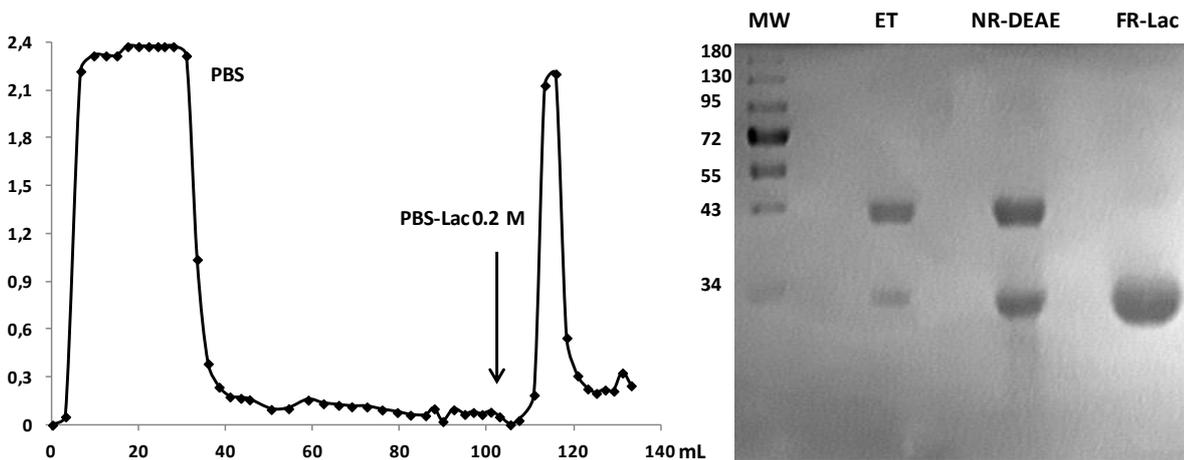
Cuando la lectina LDG-I fue liofilizada (48 h, 0.120 mbar y  $-50^{\circ}\text{C}$ ), disminuyó su título de aglutinación sobre eritrocitos A y T y no aglutinó los eritrocitos O y Tn (Tabla 2-2).

**Tabla 2-2. Títulos de eritroaglutinación con LDG-I liofilizada y no liofilizada**

Lectina LDG-I (1.2 mg/mL)	Eritrocitos				
	A	B	O	T	Tn
No liofilizada	1:2018	1:2018	1:1024	1:2018	1:2018
Liofilizada	1:64	N.D	N.A	1:8	N.A

Volúmen 25  $\mu\text{L}$  lectina/pozo; NA: no se observa aglutinación. ND: no determinado.

En la Fig. 2-3 y Tabla 2-3 se muestran los resultados obtenidos durante la purificación de la LGL-II. La fracción DEAE-NR fue aplicada a una columna de *Sepharose-Lac* y eluida con PBS-Lac 0.2 M, por SDS-PAGE se observó una banda de aproximadamente 25.7 kDa.



**Figura 2-3. Purificación de la lectina LGL-II de *Galactia lindenii*.** a. Perfil cromatográfico de purificación de LGL-II por afinidad a lactosa, absorbancia a 280 nm; y electroforesis SDS-PAGE realizada en condiciones denaturantes y reductoras. ET: extracto salino total; DEAE-NR: Fracción no retenida en DEAE; FR-Lac: fracción retenida en *Sepharosa-Lac*. Proteína total en cada muestra: 50  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 2-3. Purificación de la lectina LGL-II presente en semillas de *G. lindenii* \***

Paso de purificación	Vol (ml)	Proteína ( $\mu\text{g/mL}$ )	Proteína total (mg)	Título de aglutinación	Título específico	Veces de purificación
ET	60	25051.43	1503.09	1:2048	1.61	1.0
DEAE-NR	25.4	10265.71	260.75	1:256	0.49	0.31
Afinidad Lac	17.8	2220.21	39.52	1:2048	18.45	11.46

\* Título específico definido como el título de aglutinación dividido en los  $\mu\text{g}$  de proteína en la solución del último pozo en el que se observó aglutinación. Los ensayos de aglutinación de las fracciones de los pasos de purificación de LGL-II fueron realizados con eritrocitos O.

## 2.5. Discusión

En la Tabla 2-4 se muestran los rendimientos de la extracción total de proteínas a partir de semillas de *G. lindenii*. Almanza et al., 2004 hicieron extracciones a partir de 10 g de harina de semillas en buffer acetato acético (100 mM, NaCl 150 mM, tiourea 5 mM), pH 5.0, (1:10, p/v); Quintero (2014) realizó extracciones usando el mismo buffer, a partir de diferentes cantidades de harina, observando que al emplear 10 g y 20 g, al final del proceso de concentración se pierde gran cantidad de proteína por insolubilización; y al emplear 5 g de harina obtuvo 55.8 mg de proteína total / g de harina (Tabla 2-4). En el presente trabajo se obtuvo un rendimiento de 300,62 mg de proteína total / g de harina partiendo de 5 g de harina de semillas de *G. lindenii* y extrayendo con buffer PBS-tiourea 5 mM, pH 7.2 (1:10 p/v).

El rendimiento y el título específico obtenidos en la extracción de semillas de *G. lindenii* fueron mayores a los obtenidos previamente. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en la determinación de la cantidad de proteína por el método del ácido bicinonínico, se puede presentar sobrestimación por interferentes del extracto como azúcares reductores que no se eliminan completamente luego de los procesos de concentración por ultrafiltración y/o diálisis, en comparación con el método microKjeldajhl usado por Almanza et al. que es un método más exacto donde se determina la cantidad de nitrógeno proteico total, y no es afectado por interferentes como carbohidratos.

**Tabla 2-4 Extracción de proteína a partir de harina de semillas de *Galactia lindenii***

Referencia	Harina (g)	Vol. extracto total (mL)	Concentración proteína total (mg/mL)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg proteína total/ g harina)	Aglutinación de eritrocitos O /título	Título específico <sup>c</sup>
Quintero M, 2014	20	100	1.74 <sup>b</sup>	174.2	8.71	+4	n.d
Almanza et al, 2004	10	70.0	2.3 <sup>a</sup>	161.0	16.1	Título 1:16	6.9
Quintero M, 2014	10	60.0	4.49 <sup>b</sup>	269.4	26.94	+4	n.d
Quintero M, 2014	5	22.5	12.10 <sup>b</sup>	279.0	55.80	+4	n.d
Presente trabajo	5	60.0	25.05 <sup>b</sup>	1503.1	300.62	Título 1:2048	81.75

<sup>a</sup> Determinación por el método microKjeldajhl.

<sup>b</sup> Determinación por el método del ácido bicinonínico.

<sup>c</sup> Título específico definido como título de aglutinación dividido en la concentración de proteína (mg/mL) de la solución ensayada.

Nd: no determinado

Las lectinas del género *Galacia* mantienen su actividad en el rango de pH 4-10 (Almanza et al; 2004; Fukuda et al 1994; LePendou et al, 1986), sin embargo, los resultados obtenidos muestran que la cantidad de harina, la proporción de buffer y el pH 7.2 mantienen la actividad y se obtienen mejores rendimientos de extracción. La lectina de *G. tashiroi* mostró una mejor actividad a pH 8

(Fukuda *et al* 1994) y sus congeneres también podrían mostrar ese comportamiento, lo que explicaría el título específico mayor del extracto a pH 7.2 de *G. lindenii* en comparación al obtenido en estudios anteriores (pH=5.0). Cabe anotar que las extracciones a partir de harina de semillas durante la purificación de las lectinas de *G. tashiroi* y *G. tenuiflora*, al igual que en el presente trabajo, se realizaron a pH 7 (Fukuda *et al*, 1994, LePendu *et al*, 1986).

La cantidad de proteína extraída a partir de harina de *D. grandiflora* fue menor con respecto al reportado por Melgarejo *et al.*, 2005; sin embargo, el título específico fue 500 veces mayor (Tabla 2-5). Lectinas del género *Dioclea* han mostrado actividad aglutinante en el rango de pH 5-8, (do Nascimento A.S *et al*, 2012; Melgarejo *et al*, 2005; Moreira *et al*, 1983; Pinto-Júnior *et al*, 2013), con actividad en un rango de pH de 6-8 (do Nascimento A.S *et al*, 2012; Pinto-Júnior *et al*, 2013). Melgarejo *et al.* extrajeron las proteínas usando una solución de NaCl 1% pH 7, que contenía inhibidores de proteasas (PMSF 5 mM, leupeptina 0.4  $\mu$ M, EDTA 2.5 mM y EGTA 2.5 mM), lo que indica que la presencia de agentes quelantes (EDTA y EGTA) disminuyó notablemente la actividad de la lectina; por otra parte se observa que no es necesaria la inclusión de inhibidores de proteasas en la preparación de los buffer de extracción y que sí se requiere usar un buffer para regular el pH durante el proceso de extracción.

**Tabla 2-5. Extracción de proteína a partir de harina de semillas de *Dioclea grandiflora***

referencia	Harina (g)	Vol. extracto total (mL)	Concentración proteína total (mg/mL)	Proteína total (mg)	Rendimiento (mg proteína total/ g harina)	Aglutinación de eritrocitos O	Título específico <sup>c</sup>
Melgarejo <i>et al</i> , 2015	10	279	10.32 <sup>a</sup>	2879.3	287.93	Título 1:8	0.780
Presente trabajo	5	125	4.43 <sup>b</sup>	553.9	110.78	Título 1:2048	462.3

<sup>a</sup> Determinación por el método microKjeldahl.

<sup>b</sup> Determinación por el método del ácido bicinconínico.

<sup>c</sup> Título específico definido como título de aglutinación dividido en la concentración de proteína (mg/mL) de la solución ensayada.

Durante los procesos de purificación de las lectinas, es importante seleccionar un buffer compatible con los subsiguientes pasos de cromatografía, para evitar pérdida de proteína causada por cambio de buffer; el pH y la concentración de la solución salina en los extractos y en las fracciones de purificación de proteínas son relevantes cuando se usan en células de mamíferos.

Una solución salina puede brindar estabilidad a las proteínas cuando se usa en el rango de pH 5-10 (Liu W *et al*, 2012; Mao *et al*, 2007). Durante diferentes pasos de purificación de las lectinas de especies de los géneros *Dioclea* y *Galactia*, las fracciones protéicas se han dializado o redisolto en solución salina o en buffers que contienen NaCl (0.1 – 1 M; *i.e.*, 0.6 – 6%) (Almanza *et al*, 2004; Cavada *et al*, 1996a, 1996b; Correia, J.L *et al*, 2011; do Nascimento A.S *et al*, 2012; Fukuda *et al*, 2014; Melgarejo *et al.*, 2005; Monteiro *et al* 2014; Moreira *et al*, 1983, 1996; LePendu *et al*, 1986; Pérez G. & de Navarro (1978): Pérez G *et al*, 1990; Pérez G, 1998; Pérez G & Sierra, 1999; Pinto-Júnior *et al*, 2013; Quintero, 2014; Rangel *et al* 2011; Wah *et al*, 2001). Shu *et al* (2016) reportaron que la solución de NaCl es ácida a concentraciones por debajo de 1,8 M y básica por encima de 1,8 M; también a concentraciones bajas de NaCl, el pH de la solución se ve influenciado por el pH del agua. Una solución de NaCl a 150 mM (0,9%) es isoosmótica con aquella que se encuentra en las células, sin embargo, carece de capacidad de tamponamiento y tiene un pH más bajo que el de las células. Por su parte, el buffer PBS (que contiene NaCl al 0.9%) mimifica varias condiciones

fisiológicas como el pH, la osmolaridad y la concentración iónica de las células, siendo isotónico y no citotóxico (Balcão & Villa, 2015), a la vez que mantiene la actividad de las lectinas. Los medios de cultivo de células de mamíferos también deben mantener dichas condiciones, incluyendo el pH fisiológico (Yao & Asayama, 2017). Por todo lo anterior, es recomendable realizar las extracciones de harina de semillas en buffer PBS-tiourea 5 mM, pH 7.2; y realizar cambio de buffer a PBS 1X solo, pH 7.2 - 7.4, removiendo el exceso de NaCl o los carbohidratos eluyentes en las fracciones de los pasos de purificación, antes de ser usadas en los ensayos de eritroaglutinación y en los cultivos de queratinocitos.

La electroforesis en geles de poliacrilamida mostró que la cromatografía de afinidad en *Sephacryl-S200* es un paso importante para remover proteínas con mayor peso molecular mayor al de LDG-I, las cuales se observan en la fracción DEAE-NR de *D. grandiflora* (Fig. 2-2d); y además, que la fracción de la lectina purificada tiene el perfil característico de LDG-I (Ainouz *et al.*, 1987; Moreira *et al.*, 1983), disociándose en una subunidad  $\alpha$  y obteniéndose también los fragmentos  $\beta$  y  $\gamma$  característicos de las lectinas tipo I de las especies de *Dioclea* (Fig. 2-2d; Tabla 1-2). La presencia de tricina facilitó una buena resolución de dichos fragmentos, en concordancia con lo reportado para electroforesis Tricina-SDS-PAGE, que permite una mayor separación de proteínas con pesos moleculares inferiores a 20 kDa (Schägger & von Jagow, 1987). Por otro lado, las subunidades de las lectinas LDG-II y LGL-II, con afinidad a Lac, mostraron pesos moleculares determinados por electroforesis SDS-PAGE (Laemmli) que están dentro del rango de pesos moleculares reportados para las subunidades de las lectinas tipo II de *Diocleae* (Tabla 1-3).

LDG-I perdió actividad luego de ser sometida a liofilización (Tabla 2-2), por esta razón, durante los siguientes ensayos de purificación de las tres lectinas vegetales, se evitó este proceso, y las lectinas se concentraron por ultrafiltración. Usando espectroscopia de infrarojo (FTIR) se ha observado que pueden ocurrir cambios conformacionales y agregación de algunas proteínas durante el proceso de liofilización (Roy & Gupta, 2004); también, se ha reportado que la liofilización puede afectar la solubilidad (Grossman *et al.*, 2018) o la actividad de algunas proteínas (Page *et al.*, 2000).

### 3. Especificidad de las lectinas hacia diferentes glicotopes

#### 3.1. Introducción

La interacción de las lectinas con los carbohidratos fue estudiada, realizando ensayos de *dot blot* con N/O-glicofomas remodeladas a partir de glicoproteínas de origen mamífero; realizando ensayos de actividad aglutinante con eritrocitos de diferente tipo y origen, en un ambiente de membrana celular y realizando ensayos *in silico* del acople molecular de la lectina LGL-II con carbohidratos que se encuentran en glicanos de células de mamífero. Las interacciones se vieron influenciadas por los residuos de carbohidratos circundantes al glicotope específico que cada una de ellas reconoce y por la forma como se presenta el glicotope en el glicano o en la superficie celular (monovalente, polivalente, en *cluster*). A partir de los resultados se sugirieron esquemas funcionales de reconocimiento por LDG-I, LDG-II y LGL-II, los cuales ilustran el impacto de la modificación de glicótopes básicos que se encuentran en la superficie de células de mamíferos, la cual puede mejorar, permitir, disminuir o inhibir el reconocimiento por los dominios DRC de cada

una de las lectinas. Entre los principales ligandos de las lectinas están: manósidos (interacción proporcional al número de manosas) y NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3/4HexNAc para LDG-I; glicotope T en *cluster* T multivalente sialilado en enlace  $\alpha$ 2,3 para LDG-II; y el determinante H tipo II y LacNAc para LGL-II.

## 3.2. Marco teórico

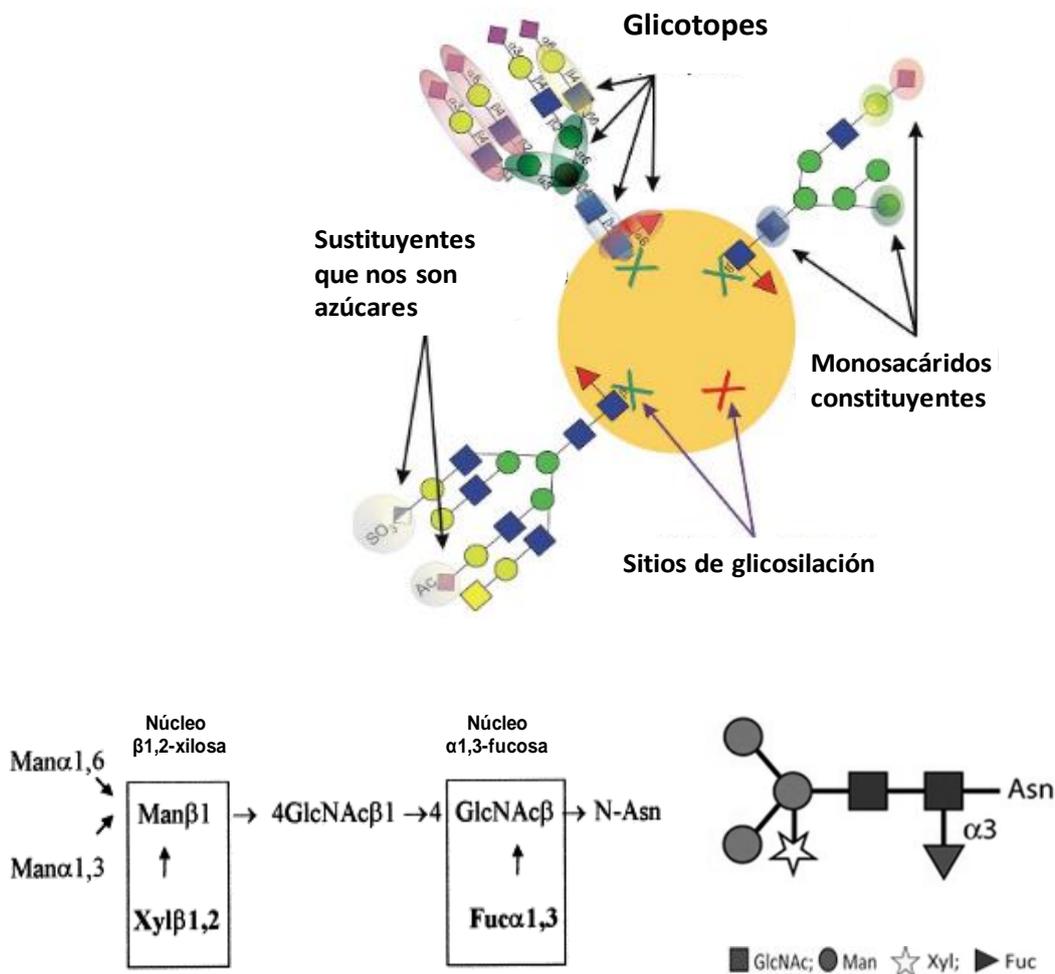
### 3.2.1. Glicotopes

Los glicomas de mamíferos contienen muchas estructuras de glicanos y estos se sintetizan a partir de 10 monosacáridos comunes (Glc, GlcNAc, Gal, GalNAc, Man, Fuc, GlcA, Xyl, NeuAc y IdA); en reacciones que son catalizadas por glicosiltransferasas (GT) a partir de carbohidratos activados con nucleótidos pirofosfato (Krishnamoorthy *et al.*, 2009). En la naturaleza se conocen al menos 9 aminoácidos que pueden ser glicosilados (Asn, Ser, Thr, Tyr, Trp, Cys, hidroxil-Lys e hidroxil-Pro) (Cummings & Pierce, 2014). Por otro lado, el número de proteínas descubiertas que poseen dominios de reconocimiento de carbohidratos (DRC) (lectinas, glicosilasas, glicosiltransferasas, transportadores de azúcares, selectinas, siglecs, proteínas inactivadoras de ribosomas, entre otras), así como la caracterización de sus DRC y la interacción con sus ligandos, ha incrementado en los últimos años (Angata, 2018; Borsig, 2018; Gupta *et al.*, 2012; Lyu *et al.*, 2013).

La expresión de los glicanos es específica de cada tipo celular, y a la vez es dependiente de la etapa de desarrollo y de la diferenciación celular; la organización espacial y temporal de todos aquellos glicanos y el número total de funciones dadas por interacciones proteína-glicano aún no están completamente dilucidados, en gran parte debido a varios factores que influyen en la microheterogeneidad de los glicoconjugados (Fig. 3-1), sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado diversas tecnologías que apoyan la elucidación de la estructura de glicanos, y la distribución y especificidad de proteínas con DRC ([www.functionalglycomics.org/](http://www.functionalglycomics.org/)). A partir de los datos obtenidos con diferentes plataformas, se observó que las proteínas con DRC muestran una afinidad relativamente alta por glicanos complejos que pueden contener entre 3-7 residuos de monosacáridos, y que incluyen estructuras ramificadas o modificaciones tales como O-acetilación, sulfatación o fosforilación. Por ello, la visión apoyada en la inhibición de lectinas usando monosacáridos (a concentraciones de mM) y glicanos simples, va cada vez evolucionando hacia la elucidación de las interacciones biológicas y fisiológicas entre proteínas con DRC y glicanos complejos existentes en la naturaleza.

En las cadenas de glicanos presentes en glicoconjugados naturales se presentan unidades estructurales (Fig. 3-1). El concepto "glicotope" se refiere a la estructura mínima del glicano que confiere la "máxima" afinidad de unión al glicano determinante (Cummings, 2009), y puede considerarse similar a los epítopes de los anticuerpos (Cao *et al.*, 1996). Este concepto ha permitido comprender contribuciones de estructuras individuales en las funciones de los glicanos y rutas biosintéticas (Cummings & Pierce, 2014). Algunos glicotopes pueden estar involucrados en procesos de reconocimiento, promover la producción de anticuerpos o tener efecto sobre otros procesos celulares (Faveeuw *et al.*, 2003; Hoffmann-Sommergruber *et al.*, 2011; Lannoo *et al.*, 2015; Marth *et al.*, 2008). La actividad de los glicotopes o epítopes tridimensionales representados por

carbohidratos puede estar gobernada por una región del carbohidrato, y en algunos casos, depender adicionalmente de estructuras en aminoácidos al que el glicotope esta unido (eg. Ser/Thr/Asn) (Šebestik *et al*, 2012). En la parte inferior de la Fig. 3-1 se muestra la estructura de un N-glicano con núcleos  $\beta$ 1,2-xilosa y  $\alpha$ 1,3-fucosa, encontrado en glicoconjugados de diferentes plantas y que presenta actividad inhibitoria contra el anticuerpo anti-peroxidasa de rábano (Hoffmann-Sommergruber *et al*, 2011; Wilson & Altmann, 1998).



**Figura 3-1. Microheterogeneidad de los glicoconjugados.** Arriba) Factores que contribuyen a la microheterogeneidad de los glicoconjugados. Recuperado de Defaus *et al*, 2014. Abajo) Representación esquemática de los glicotopes en N-glicano encontrado en *Armoracia rusticana* (rábano) y en otras plantas. Izquierda: *Representación estructural* del N-glicano mostrando residuos de azúcar, tipo de enlace entre ellos, ramificaciones y núcleos que contiene. Derecha: *Representación simbólica* del mismo glicano. Recuperados de Hoffmann-Sommergruber *et al*, 2011 y Wilson & Altmann, 1998. Las representaciones de los glicanos son las acordadas por el Consortium for Functional Glycomics, [www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org), y aceptadas por IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): GlcNAc: N-acetil glucosamina; Man: manosa; Xyl: xilosa; Fuc: fucosa, Asn: asparragina. Círculos: hexosas; cuadrados: N-acetilhexosaminas; gris: esteroquímica de manosa; triángulo gris: fucosa; estrella: xilosa.

Los glicotopes, presentados en diferentes densidades, pueden expresarse como núcleos (*core*), estar expuestos o encriptados, o presentarse solamente expuestos en la parte externa del glicano (Tabla 3-1). Estas estructuras pueden generar señales moleculares en un espacio reducido, dado su alto nivel de versatilidad estructural. La secuencia y estructura de algunos glicotopes, así como

los aspectos espaciales de presentación multivalente, representan la base de la especificidad y la selectividad natural de lectinas propias o foráneas hacia dichas estructuras (Gabiús *et al.*, 2011a; Iskratsch *et al.*, 2009; Murphy *et al.*, 2013).

**Tabla 3.1 Ejemplos de glicotopes encontrados en la naturaleza**

Glicotope	Fórmula estructural	Tipo de glicano donde se presenta	Comentarios	Ref.
<b>Núcleos (Core)</b>				
$\alpha 1,3\text{Fuc}$	R-(Fuc $\alpha 1,3$ )GlcNAc-R	N-glicanos, glicolípidos	En plantas, invertebrados; y en grupos Lewis Lex (CD15) y Ley (CD174) presentes en membranas de células hematopoyéticas mieloides y tejidos embrionarios; y en tracto gastrointestinal en bajas cantidades, respectivamente; sobreexpresados en carcinomas.	Sehlbach <i>et al.</i> , 2013; Wilson, 2002
$\beta 1,2\text{Xyl}$	R-(Xyl $\beta 1,2$ )Man $\beta 1$ -R	N-glicanos	En plantas e invertebrados	
$\alpha 1,4\text{Fuc}$	R-(Fuc $\alpha 1,4$ )GlcNAc-R	N-glicanos, glicolípidos	En plantas, y en grupos Lewis Lea y Leb presentes en glicoesfingolípidos de saliva y plasma humanos	
$\alpha 1,3\text{Fuc} + \alpha 1,6\text{Fuc}$	R-(Fuc $\alpha 1,3$ )GlcNAc-R + R-(Fuc $\alpha 1,6$ )GlcNAc-R	N-glicanos	En invertebrados.	
<b>GN2Man3</b>	R-GlcNAc $\beta 1,2$ (GlcNAc $\beta 1,2$ )Man $\alpha 1,3$ (Man $\alpha 1,6$ )Man-R	N-glicanos	En glicanos biantenarios complejos en mamíferos. Su interacción con ciertas lectinas tipo I induce producción de histamina en mastocitos.	Dam <i>et al.</i> , 1998
<b>Expuesto o encriptado</b>				
<b>Tn</b>	GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr	O-glicanos	Biomarcadores producto de síntesis incompleta por disminución en expresión de glicosiltransferasas o chaperonas asociadas a ellas. Formas expuestas sobreexpresadas en carcinomas. Tn (CD175) y T $\alpha$ = antígeno Thomsen-Friedenreich (CD176).	Souza <i>et al.</i> , 2015
<b>T<math>\alpha</math></b>	Gal $\beta 1,3$ GalNAc $\alpha 1$ -Ser/Thr			Häuselmann & Borsi, 2014
<b>T<math>\beta</math></b>	Gal $\beta 1,3$ GalNAc $\beta 1$ -R	N/O-glicanos, glicolípidos	Precusores de grupos histo-sanguíneos expresados en superficie de eritrocitos y células de otros tejidos, y en fluidos. A este grupo también pertenece T $\alpha$ encriptado que también se encuentra en invertebrados.	Hara <i>et al.</i> , 2014; Fujitani <i>et al.</i> , 2000; Nasir <i>et al.</i> , 2017; Wilson, 2002
<b>I<math>\beta</math></b>	Gal $\beta 1,3$ GlcNAc $\beta 1$ -R	N/O-glicanos, glicolípidos		
<b>II<math>\beta</math></b>	Gal $\beta 1,4$ GlcNAc $\beta 1$ -R			

<b>GG</b>	Gal $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,6)Gal $\beta$ -R	O-glicanos	En glicoproteínas de pared celular que contienen arabinogalactanos con papel en crecimiento y desarrollo en plantas.	Geshi <i>et al</i> , 2013; Wilson, 2002
<b>XyG</b>	Gal $\beta$ 1,2Xyl	N/O-glicanos	Xiloglicano en glicoproteína xilogeno de pared celular de plantas, el cual media interacciones intercelulares e induce formación de xilema.	Geshi <i>et al</i> , 2013; Sehlbach <i>et al</i> , 2013
<b>Siempre expuesto (reconocimiento intercelular)</b>				
<b>Sia<math>\alpha</math>2,3</b>	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal-R	N/O-glicanos, glicolípidos	En glicoproteínas de membrana y glicoconjugados de mamíferos y aves.	Nohara <i>et al</i> , 2012
<b>Sia<math>\alpha</math>2,6</b>	NeuAc $\alpha$ 2,6Gal-R		En glicoproteínas de membrana. Sobreexpresado contribuye a la propagación metastásica del cáncer colorectal.	Park <i>et al</i> , 2013
<b>SLex</b>	NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4(Fuca1,3)GlcNAc $\beta$ -R		Papel en adhesión de leucocitos y unión óvulo-espermatozoide.	Marth <i>et al</i> . 2008
<b>LDN, LacDiNAc</b>	GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc-R	N/O-glicanos, glicolípidos	En glicoconjugados del parásito humano <i>S. mansoni</i> .	Smith <i>et al</i> , 2015
<b>LDN-F</b>	GalNAc $\beta$ 1,4(Fuca1,3)GlcNAc-R	N/O-glicanos, glicolípidos	En veneno de abeja y en <i>S. mansoni</i>	Smith <i>et al</i> , 2015; Wilson, 2002
<b>LDN-DF</b>	GalNAc $\beta$ 1,4(Fuca1,2Fuca1,3)GlcNAc-R	N/O-glicanos, glicolípidos	Antígeno en huevos de <i>S. mansoni</i>	Smith <i>et al</i> , 2015
<b>I<math>\beta</math>-F</b>	Gal $\beta$ 1,3(Fuca1,4)GlcNAc $\beta$ -R	N-glicanos	Específico de plantas	Wilson, 2002

Fuc: fucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Man: manosa; Xyl: xilosa; GalNAc: N-acetil galactosamina; Gal: galactosa; NeuAc: ácido siálico; *S. mansoni*: *Schistosoma mansoni*.  $\alpha$  y  $\beta$ : configuraciones de los enlaces glicosídicos.

### 3.2.2. Glicanos que presentan los grupos histo-sanguíneos

Los grupos histo-sanguíneos y antígenos relacionados son glicotopes complejos que se expresan en los extremos no reductores de las cadenas de carbohidratos de glicoconjugados de las superficies celulares, incluyendo eritrocitos; células de la piel; epitelios de tractos respiratorio, genitourinario y gastrointestinal (Tabla 1-6); o también presentarse como oligosacáridos libres en fluidos biológicos e.g., saliva, semen, contenido intestinal, leche, jugos gástricos y sangre (Anstee, 1990; Himbert *et al*, 2017; Jaff, 2010; Méhul, 2003, Möginger *et al*, 2018; Podbielska *et al*, 2004; Ravn & Dabelsteen, 2000). El reconocimiento biomolecular por lectinas depende de la especificidad de la lectina y de la forma como se presentan los glicotopes en la superficie celular. Usando glicolípidos de membrana se ha observado que la presentación de glicanos es más restringida que aquella de glicanos en solución, particularmente debido a las restricciones de orientación impuestas en el glicolípido a través de sus interacciones laterales con otros lípidos y proteínas de la membrana (Nasir *et al*; 2017).

Los eritrocitos son las células más comúnmente usadas en estudios de membranas biológicas, y poseen glicoconjugados tales como glicoforinas (altamente O-glicosiladas); transportadores iónicos y de glucosa, y acuaporinas-1 (con N-glicanos); y glicolípidos; además, en eritrocitos humanos se han descrito otras glicoproteínas presentes en menor proporción como CD44, CD47, Lu, Kell y Duffy (Aoki *et al*, 2017). Por lo anterior, eritrocitos de diferente origen se convierten en una herramienta útil para ensayar la interacción de lectinas con diferentes glicotopes en un ambiente de membrana celular. Se ha estimado que un eritrocito humano puede tener hasta  $8 \times 10^5$  sitios antigénicos en total sobre los glicolípidos que llevan los grupos histo-sanguíneos AB(H) expuestos en la superficie celular (Himbert *et al*, 2017), además de un mayor número de proteínas que cargan estos antígenos (Anstee, 1990) (Tabla 3-2).

**Tabla 3-2. Glicanos en membrana de eritrocitos humanos normales que cuentan con grupos histo-sanguíneos en su estructura**

Glicano	Nº copias estimadas
<b>Glicanos que contienen grupos AB(H):</b>	
Intercambiador aniónico; SLC4A1	$1 \times 10^6$
Glicoforina A; GYPA	$1 \times 10^6$
Glicolípidos	$8 \times 10^5$
Transportador de glucosa; GLUT-1	$5 \times 10^5$
Acuaporina-1; AQP1	$2 \times 10^5$
Transportador de amonio; RHAG	$1-2 \times 10^5$
<b>Glicanos que contienen NeuAca<math>\alpha</math>2,3Gal *</b>	$1.2 \times 10^6$
<b>Glicanos que contienen Tn</b>	$2.7 \times 10^5$

\* NeuAca $\alpha$ 2,3Gal: ácido N-acetilneuramínico en enlace  $\alpha$ 2,3 con Gal. Anstee, 1990; Ogawa & Galili, 2006.

La estructura de los determinantes antigénicos histo-sanguíneos de glicanos presentes en la superficie de diferentes tipos de eritrocitos, incluyendo humanos y de animales, se indican en la Tabla 3-3. En los N-glicanos de la superficie de eritrocitos de diferentes especies además se ha estimado el número de glicotopes terminales como el antígeno  $\alpha$ -Gal o Galilli, y N-acetilactosamina sialilada y no sialilada (LacNAc y Sia-LacNAc) (Tabla 3-4). Por otro lado, la síntesis incompleta de cadenas de carbohidratos produce los glicotopes T $\alpha$  y Tn asociados a superficies celulares en tejidos tumorales (Cao *et al*, 2008). La glicoforina A (GYPA), proteína transmembranal altamente glicosilada (60%) presente en eritrocitos humanos tiene diez y seis (16) cadenas de O-glicanos principalmente del tipo NeuAca $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3(NeuAca $\alpha$ 2,6)GalNAc, y un N-glicano triantenario que presenta sialilación NeuAca $\alpha$ 2,6 y núcleo fucosa  $\alpha$ -Fuc1,6 *i.e.*, Fuca $\alpha$ 1,6GlcNAc (además de grupos-histosanguíneos) (Aoki, 2017; Podbielska *et al*, 2004). Entonces, eritrocitos humanos normales pueden ser tratados con sialidasa para producir glóbulos rojos que contengan asialo-GYPA exhibiendo el glicotipe T $\alpha$ ; y otro grupo de eritrocitos tratado secuencialmente con sialidasa y  $\beta$ -galactosidasa, resultando en eritrocitos que contienen asialoagalacto-GYPA exponiendo el glicotipe Tn (Hirohashi *et al*, 1985; Koizumi *et al*, 2010).

**Tabla 3.3 Principales estructuras de carbohidratos que representan grupos histo-sanguíneos en eritrocitos de diferente origen**

Eritrocito	Formula estructural de grupos-histosanguíneos*	Anotaciones
<b>O</b>	Fuca1,2Galβ1-R (Sustancia H precursora de antígenos A, B, Le <sup>y</sup> y Le <sup>b</sup> )	En superficie de eritrocitos y células de otros tejidos, y en fluidos humanos. R = 3/4GlcNAcβ (O/N glicanos); 4GalNAcβ (O/N glicanos); 3GalNAcβ (glicolípidos).
<b>B</b>	Galα1,3(Fuca1,2)Galβ1-R	
<b>A</b>	GalNAca1,3(Fuca1,2)Galβ1-R	
<b>T</b>	Galβ1,3GalNAca1-O-Ser/Thr	
<b>Tn</b>	GalNAca1-O-Ser/Thr	Productos de biosíntesis alterada de O-glicanos: T (CD176) o antígeno Thomsen–Friedenreich; y Tn (CD175).
<b>Oveja</b>	GalNAca1,3GalNAcβ1,3Galα1,4Galβ1,4Glcβ1-Cer	Globopentaglicosilceramida en glicoesfingolípidos; ausente en conejo y humano (excepto en glicotopes oncofetales). Contiene el antígeno Forssman GalNAca1,3GalNAc (marcador tumoral en humanos); el glicotope E encriptado (R-Galα1,4Gal-R) presente además en glicoesfingolípidos de eritrocitos y de intestino delgado humanos, en glicoproteínas salivares del ave comestible <i>Collocalia</i> y en glicoproteínas de anfibios, y que junto con el glicotope del grupo sanguíneo P presente en células del tracto urinario y también encriptado en este glicolípidos ovino (R-GalNAcβ1,3Gal-R), es receptor de aglutininas tóxicas y microbianas; y el glicotope L (Galβ1,4Glcβ1-R) que se encuentra en la leche de mamíferos y encriptado en glicoproteínas y glicolípidos.
<b>Cerdo</b>	Galα1,3Galβ1,4GlcNAcβ1-R; NeuGca2,6(Galβ1,3)GalNAca1-O-Ser/Thr NeuGca2,6(Galα1,3Galβ1,4GlcNAcβ1Galβ1,3)GalNAca1-O-	Galα1,3Galβ1,4GlcNAcβ1-R es el antígeno α-Gal o Gallili, principal xenoantígeno en eritrocitos porcinos. En glicoforinas también presentes NeuGca2,6(α-Gal); NeuGca2,6T y NeuGca2,6Tn.
<b>Conejo</b>	Galα1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc-Cer; Neu5Aca2,3Galβ1,3GalNAca1-O-Ser/Thr; NeuAca2,6(Galβ1,3)GalNAca1-O-Ser/Thr; NeuAca2,6(Neu5Aca2,3Galβ1,3)GalNAca1-O-Ser/Thr	Pentasacaridoceramida, glicolípidos más abundante en eritrocitos de conejo, contiene antígeno α-Gal y glicotope L. En O-glicoproteínas también presentes NeuAca2,3T y NeuAca2,6Tn.

<b>Caballo</b>	Neu5Gca2,3Galβ1,4GlcNAcβ1-Cer; Neu5Gca2,3Galβ1,3GalNAcα1-O-Ser/Thr NeuGca2,6(Galβ1,3)GalNAcα1-O-Ser/Thr NeuGca2,6(Neu5Gca2,3Galβ1,3)GalNAcα1-O-Ser/Thr	Neu5Gca2,3Lac-Cer, principal gangliósido en eritrocitos equinos. La aglutinación se ha relacionado con presencia de NeuGca2,3Gal. NeuGc presente en glicoforinas. En O-glicoproteínas también presentes NeuGca2,3T y NeuGca2,6Tn.
<b>Perro</b>	NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3-	La aglutinación se ha relacionado con presencia de NeuAca2,3.
<b>Ratón</b>	9- 0-Ac-NeuAca2,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4GlcNAcβ1,3-	La aglutinación se ha relacionado con presencia de 9-0-Ac-NeuAc.
<b>Rata</b>	9-0-Ac-NeuAca2,3Galβ1,3GalNAc-	En O-glicoproteínas también presentes NeuAca2,3T/LacNAc, NeuAca2,6Tn y T.
<b>Pollo</b>	NeuAca2,3Galβ1,3(NeuAca2,6)GalNAc-	Presente en O-glicanos

\*Fórmula estructural de glicanos propuesta por el *Consortium for Functional Glycomics* ([www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org)) y aceptada por IUPAC. Paréntesis = ramificaciones. Fuc: fucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Gal: galactosa; NeuAc: ácido N-acetilneuramínico; NeuG: ácido N-glicolilneuramínico. α o β: configuración de enlace glicosídico. Refs: Aoki, 2017; Doucet *et al*, 2004; Ito *et al*, 1997; Momoi & Yamakawa, 1978; Ogawa & Galili, 2006; Ravn & Dabelsteen, 2000; Tan *et al*, 2010.

**Tabla 3-4. Número estimado de glicotopes terminales α-Gal, LacNAc y Sia-LacNAc en N-glicanos sobre la superficie de eritrocitos de diferentes especies**

Origen del eritrocito	Número de glicotopes en N-glicanos x 10 <sup>6</sup> /célula		
	αGal	Galβ1,3/4GlcNAc-R	Sia-Galβ1,3/4GlcNAc-R
Humano	0	0.008	0.4
Conejo	2	0	0
Cerdo	0.16	0	0.12
Perro	0.008	0.008	0.8
Bovino	0.008	0	0.4
Cabra	0	0	2
Oveja	0	0	0.16
Caballo	0	0	0.008
Ratón	0	0	0.16
Pollo	0	0	2

αGal: glicotope Gallili; N-acetilgalactosamina: LacNAc; Sia-LacNAc: Sia2,3/6Galβ1,3/4GlcNAc-R; Sia es NeuAc; Neu5Gc o 9-0-Ac-NeuAc, según la especie. Refs: Aoki, 2017; Ogawa & Galili, 2006; Ravn & Dabelsteen, 2000; Rogers *et al*, 1986.

### 3.3. Metodología

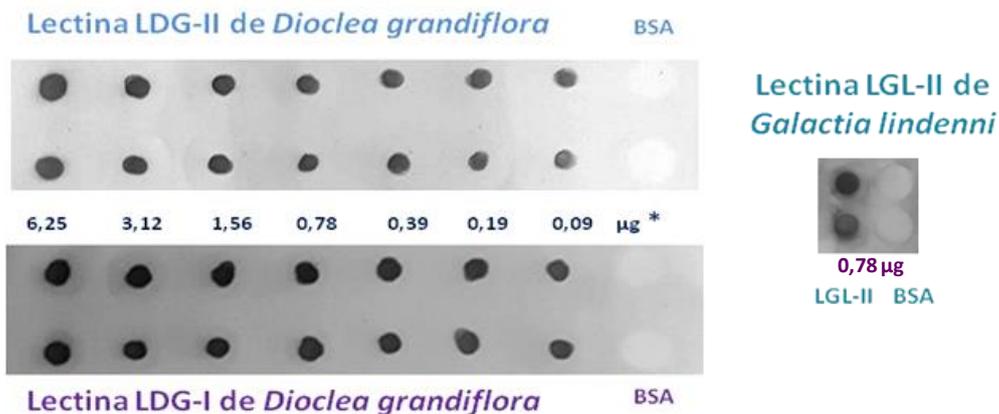
Las especificidades de unión de las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II fueron exploradas por medio de ensayos de *dot blot*; así como a través de ensayos de aglutinación de eritrocitos de diferente tipo y del acople molecular *in silico* de LGL-II con diferentes ligandos; permitiendo complementar y expandir el conocimiento acerca de la especificidad de estas tres lectinas y proponer esquemas de especificidad de glicotopes para cada una de ellas.

#### 3.3.1. Evaluación de la especificidad de las lectinas usando glicofomas remodeladas a partir de glicoproteínas

Se realizaron ensayos *dot-blot* para determinar las especificidades de unión de las lectinas evaluando once (11) glicoconjugados con estructuras de glicanos definidas, obtenidos por remodelación enzimática de dos glicoproteínas. Previo a los ensayos de interacción, las lectinas fueron biotiniladas y el marcaje se corroboró realizando incubación con estreptavidina-peroxidasa, y revelando con diaminobenzamida (DBA) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 3.3.1.1. Biotinilación de las lectinas.

La biotinilación se realizó permitiendo el acople a los residuos de amina primaria, al mezclar sulfo-N-hidroxisuccinimida éster de biotina (sulfo-NHS-LC-biotina) con las lectinas puras, siguiendo el método descrito por Hermanson, 1996 (Anexo V). La verificación de la biotinilación de las lectinas se observa en la Figura 3-2.



**Figura 3-2. Biotinilación de las lectinas.** Membranas con lectinas sembradas en las concentraciones indicadas (µg), se incubaron en presencia de estreptavidina peroxidasa 1:500. Revelado usando 0.5 mg/mL de DAB y 10 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. BSA: albumina sérica bovina (control). Ref: Hermanson G. T, 1996.

### 3.3.1.2. Preparación de neoglicofomas de glicoproteínas

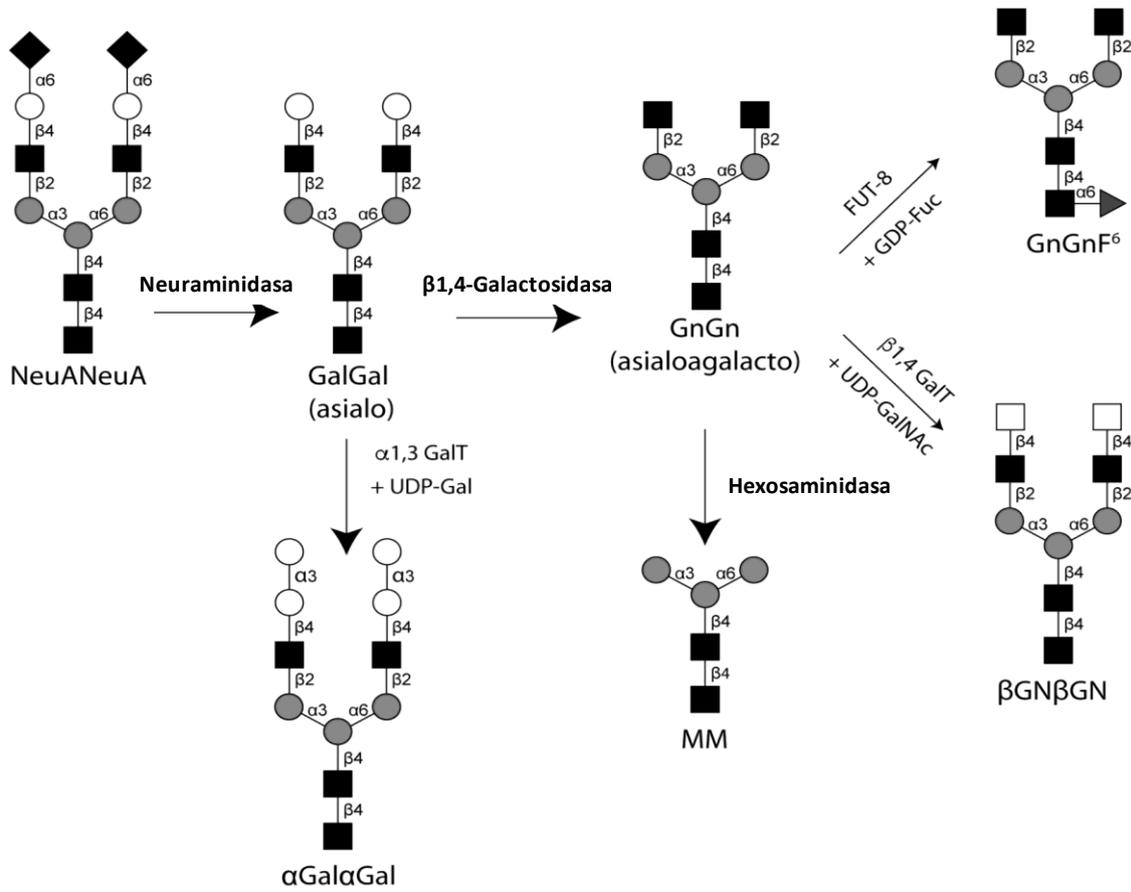
Las glicoproteínas apotransferrina humana y fetuina bovina fueron remodeladas con enzimas para producir glicofomas con glicanos definidos, siguiendo la metodología descrita por Iskratsch *et al* (2009) de la *Universität für Bodenkultur* (BOKU en Viena, Austria), quienes a través de este método lograron refinar las especificidades de 12 lectinas vegetales comerciales, ampliando la información reportada en la literatura. La N-glicosidasa F (PNGasa F) fue obtenida de Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania), mientras que las otras enzimas y las glicoproteínas fueron obtenidas de Sigma–Aldrich–Fluka, a excepción de la α1,6-fucosiltransferasa de *Caenorhabditis elegans* (FUT-8) y la β1,4-galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, las cuales fueron preparadas por el Laboratorio de Glicobiología Molecular de BOKU.

*Glicofomas a partir de apotransferrina humana*: La glicoproteína (26 mg) fue disuelta en una solución de ácido 2-(N-morfolino) etanesulfónico (Mes 50 mM; pH 5.5), a una concentración final de 20 mg/mL. Una alícuota de 150 µL de la proteína nativa (conteniendo N-glicanos biantenarios complejos típicos dentro de su dominio C-terminal Satomi *et al*, 2004) se guardó a -20°C, mientras que otras alícuotas de la muestra se sometieron a acción enzimática con glicosidasas y

glicosiltransferasas usando las condiciones que se describen en la Tabla 3-5 para producir nuevas glicoformas a partir de sus predecesoras (Fig. 3-3).

<b>Tabla 3-5. Condiciones de mezclas de reacción para la producción de las glicoformas de apotransferrina humana *</b>						
<b>Glicoformas obtenidas por degradación enzimática usando glicosidasas</b>						
<b>Glicoforma inicial</b>	<b>Glicoforma/ Buffer/ Sustrato</b>	<b>Enzima</b>	<b>Unidades enzimáticas</b>	<b>T°</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Glicoforma resultante</b>
<b>Transferrina (NeuANeuA)</b>	150 µL de glicoforma en Mes 50 mM; pH 5.5	Neuraminidasa de <i>C. perfringens</i>	195 mU	37°C	16 h	<b>Asialo-transferrina (GalGal)</b>
<b>Asialotransferrina (GalGal)</b>		β1,4-galactosidasa de <i>A. oryzae</i>	8.6 U	37°C	16 h	<b>Asialoagalactotransferrina (GnGn)</b>
<b>Asialoagalactotransferrina (GnGn)</b>		β-hexosaminidasa de <i>Streptococcus</i>	7.5 U	37°C	16 h	<b>Núcleo pentasacárido de N-glicanos (MM)</b>
<b>Glicoformas obtenidas por unión de carbohidratos usando glicosiltransferasas</b>						
<b>Asialo transferrina (GalGal)</b>	200 µg de GalGal/ 20 nmol de UDP-Gal pH 7.0	α1,3-galactosil transferasa recombinante (α1,3GalT)	0.5 mU	37°C	16	<b>αGalαGal</b>
<b>Asialo-Agalactotransferrina (GnGn)</b>	300 µL GnGn + 150 µL Mes 0.4 M (pH 5.5), MnCl <sub>2</sub> 7.5 mmoles, UDP-GalNAc 1 mmol	β1,4-galactosil transferasa bovina (GalT)	75 mU	37°C	48 h	<b>βGNβGN</b>
<b>Asialo-agalactotransferrina (GnGn)</b>	+ 5 µL de Mes 0.4 M (pH 7.5), MnCl <sub>2</sub> 4 mmoles, GDP-fucosa 150 nmol	α1,6-fucosil transferasa de <i>C. elegans</i> (FUT-8)	Sobrenadante 10x de <i>P. pastoris</i> expresando FUT-8	23 °C	48 h	<b>GnGnF<sup>6</sup></b>

\* *C. perfringens*: *Clostridium perfringens*; *P. pastoris*: *Pichia pastoris*; *A. oryzae*: *Aspergillus oryzae*.



**Figura 3-3. Estructuras de N-glicanos en las glicofomas de transferrina humana *post remodelamiento enzimático in vitro*.** La transferrina fue desialilada y luego degalactosilada usando neuraminidasa y β1,4-galactosidasa, antes de subsiguientes modificaciones con hexosaminidasas, β1,4-galactosiltransferasa (β1,4-GalT), α1,3-galactosiltransferasa (α1,3-GalT) y α1,6-fucosiltransferasa (FUT-8). La nomenclatura simbólica es la propuesta por el *Consortium for Functional Glycomics* ([www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org)) y aceptada por IUPAC; círculos: hexosas; cuadrados: N-acetilhexosaminas; blanco: esteroquímica de galactosa; negro: esteroquímica de glucosa; gris: esteroquímica de manosa; triangulo gris: fucosa; diamante negro: ácido neuramínico. Recuperado de Cortázar *et al*, 2018.

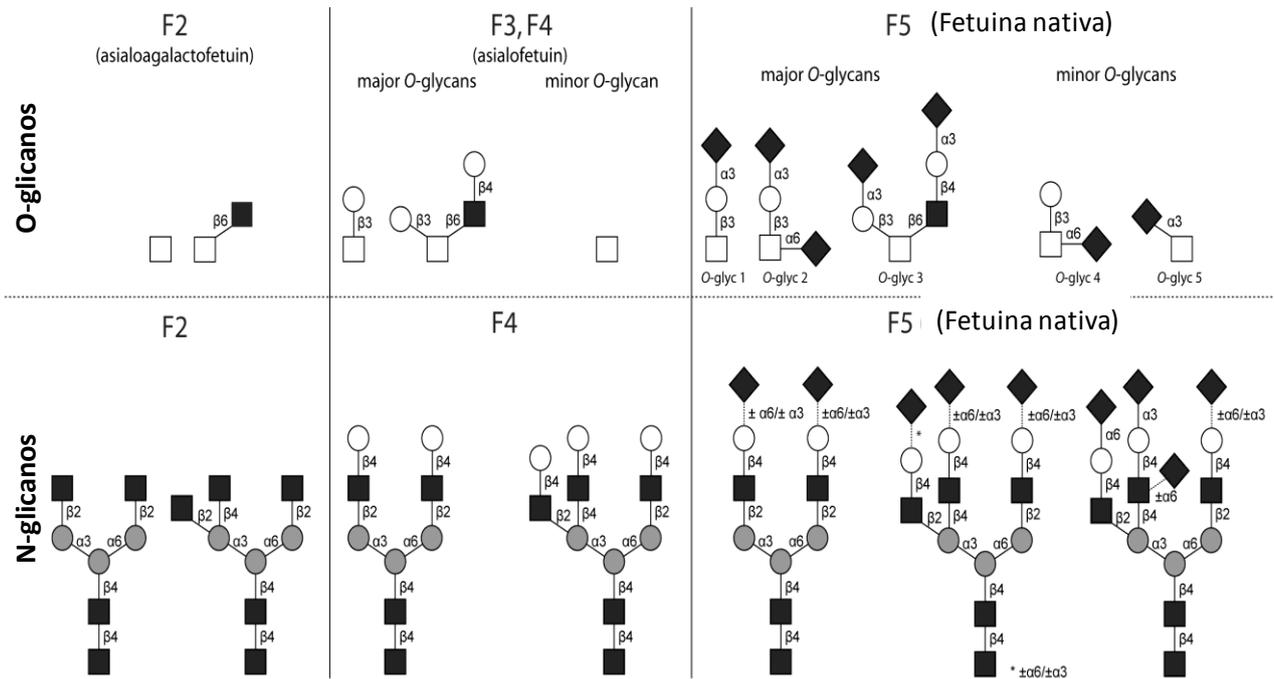
*Glicofomas a partir de fetuina bovina:* la fetuina, principal glicoproteína presente en el suero fetal de cabra posee tres O-glicanos (Spiro *et al*, 1974) y tres N-glicanos (Green *et al*, 1988) en su estructura (glicoforma F5 en Fig. 3-4). La glicoproteína (2 mg) fue disuelta en 100 μL de Mes 50 mM, pH 5.5, y alícuotada en cinco partes. Las alícuotas fueron incubadas con 1 μL de cada una de las enzimas usadas e incubadas a 37°C toda la noche para producir las glicofomas:

Fetuina nativa = glicoforma F5 incubada toda la noche en ausencia de enzimas.

Glicoforma F4 = F5 tratada con neuraminidasa para obtener asialofetuina con O/N-glicanos.

Glicoforma F3 = F5 tratada con neuraminidasa, y además con PNGasa F (0.77 U, 37°C, 24 h) con el fin de escindir los N-glicanos y obtener asialofetuina con solo O-glicanos.

Glicoforma F2 = F5 tratada con neuraminidasa, β1,3-galactosidasa bovina y β1,4-galactosidasa; para obtener asialoagallactofetuina:



**Figura 3-4. Estructuras de O/N-glicanos en las glicofomas de fetuina bovina *post remodelamiento enzimático in vitro*.** Nomenclatura simbólica es la propuesta por el *Consortium for Functional Glycomics* ([www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org)) y aceptada por IUPA; círculos: hexosas; cuadrados: N-acetilhexosaminas; blanco: esteroquímica de galactosa; negro: esteroquímica de glucosa; gris: esteroquímica de manosa; triángulo gris: fucosa; diamante negro: ácido neurámico. Recuperado de Iskratsch *et al*, 2009. Traducción de las palabras en la imagen por la estudianta tesista.

La confirmación de la estructura y el grado de remodelamiento de las glicofomas han sido analizadas por el Laboratorio de Glicobiología Molecular de BOKU, siguiendo una metodología desarrollada en dicho laboratorio, que incluye la separación de las glicofomas por SDS-PAGE, escisión de las bandas de interés, digestión triptica antes de la liberación de los glicanos usando N-glicosidasa (PNGasa A o F) y análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF MS (Anexo VI).

### 3.3.1.3. *Dot-blot* con glicofomas de transferrina y fetuina

Con el fin de observar la interacción de las lectinas con las glicofomas obtenidas por remodelamiento, se realizaron ensayos de *dot blot* siguiendo el método descrito por Iskratsch *et al*, 2009. Las glicoproteínas (glicofomas) (20 mg/mL) fueron diluidas (1:10), y 0.5 µL de cada una de las diluciones fueron dispuestas como puntos separados sobre membranas de nitrocelulosa (BioTrace NT, Pall Life Sciences, East Hills, NY, USA). Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente, y luego se realizó el bloqueo de las membranas en buffer Tris salino (Buffer TBS: Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, pH 7.4) que contenía Tween al 0.05% (Buffer TTBS), suplementado con albumina de suero bovino (BSA) al 0.5%, toda la noche, a 4 °C. Luego de tres lavados con buffer TTBS, durante 5 min por lavado, las membranas se incubaron durante 1 h con las lectinas biotiniladas a una concentración de 5 µg/mL de lectina en TTBS con BSA 0.5%, sobre un agitador horizontal a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron nuevamente, y se incubaron con un conjugado de fosfatasa alcalina - estreptavidina (1:1000),

durante 1 h, a temperatura ambiente, en agitación. Las membranas se lavaron, y finalmente se revelaron con [5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/azul nitrotetrazolio (Sigma-FAST *tablets*)]. Un ensayo de control interno se realizó con la lectina RCA-I de *Ricinus communis*, con la cual ya se habían realizado *dot blots* usando estas mismas glicofomas en condiciones similares (Iskratsch *et al*, 2009; Anexo VII).

### 3.3.2. Modelamiento molecular y acople de la lectina LGL-II con diferentes carbohidratos

#### 3.3.2.1. Análisis de la secuencia y modelo tridimensional

Usando el servidor I-TASSER disponible en <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, el cual permite el modelamiento comparativo utilizando una combinación de múltiples estructuras de referencia y una optimización iterativa de alineaciones alternativas, se realizó la comparación y selección de modelos de acuerdo con el mejor resultado (score), para obtener un modelo para la estructura tridimensional de la lectina LGL-II, partiendo de la secuencia previamente descrita por Quintero, 2014 y Carreño *et al.*, 2016. En la evaluación del modelo se utilizaron los parámetros de I-TASSER, como el algoritmo de puntuación (C-score) que va de -5 a 2; para la estimación de la calidad de los modelos de predicción, donde una mayor puntuación indica una mejor predicción en la estructura. Igualmente, el TM-score y el (RMSD) son parámetros estándar que se utilizan para indicar la cercanía del modelo que se predice con la estructura nativa del molde. TM-score > 0,15 significa un modelo que presenta una topología correcta (Banerjee *et al*, 1996; Zhang 2008; Roy *et al.*, 2010, 2012). También se realizó el análisis de estructura secundaria por diagramas de Ramachandran mediante la herramienta PROCHECK ANALYSIS que se obtuvo con PBDsum en <http://www.ebi.ac.uk/> (Banerjee *et al*, 1996; Roy A *et al*, 2010, 2012; Zhang Y, 2008).

#### 3.3.2.2. Acople molecular

Se hizo el acople molecular de la LGL-II con 6 ligandos; se descargó el archivo PDB (Rep.) de la estructura 3D predicha de la lectina, y los 6 ligandos de interés fueron descargados de Pubchem en formato PDB. En Autodock-tools 1.5.6 fueron editados los archivos, se eliminaron aguas y se adicionaron hidrógenos polares. Sobre la molécula que contenía el ligando se definió la posición y tamaño del *gridbox* para realizar el acople (X center: 62.058; Y center: 57.860; Z center: 72.890 / Size x: 92; Size Y: 96; Size Z: 60). Para cada uno de los ligandos se definieron los ángulos de torsión y se guardaron los respectivos archivos en formato PDBQT; en el caso del receptor, este se definió como una estructura rígida. La corrida del acople se realizó usando el programa AutodockVina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010), y para cada uno de los ligandos fue seleccionado el modelo con la mejor energía de interacción (valor más negativo). Para representar las interacciones en 2D y 3D entre los carbohidratos y la LGL-II se usó Discovery studio 2016.

Como parte de investigaciones realizadas en el grupo de investigación GRIP, con el fin de determinar la estructura primaria de la LGL-II, la proteína pura fue hidrolizada usando tripsina, quimotripsina y Lys-C (Quintero, 2014); la secuencia de los péptidos se determinó por espectrometría de masas en tándem y la superposición de ellos se realizó con las secuencias de otras dos lectinas de tipo II *i.e.*, LDL-II y LCR-II, las cuales tienen un 76% y 84% de identidad y de

similitud, respectivamente, entre ellas (Fig. 3-5). En la secuencia propuesta para LGL-II faltaron 9 aminoácidos por definir, de esta forma con 230 aminoácidos (Fig. 3-6), y un porcentaje de carbohidratos neutros del 7% con el que cuenta esta lectina glicosilada (Almanza *et al*, 2004), el peso molecular del monómero de LGL-II fue de 26064 Da (Quintero, 2014; Carreño *et al.*, 2016). Para la LDG-I otros autores ya han realizado modelamiento de su interacción con manósidos (Figs. 1-4 y 1-10), y de LDG-II se tiene información solo de su secuencia N-terminal y de muy pocas secuencias de péptidos (Melgarejo *et al*, 2005). De acuerdo con lo anterior se realizó el modelamiento de la LGL-II y la evaluación de la interacción con carbohidratos seleccionados para entender mejor los procesos de reconocimiento.

Score	Expect	Method	Identities	Positives
329 bits(843)	6e-120	Compositional matrix adjust.	168/221(76%)	187/221(84%)
Query 1	AKVTSFDYTSFSSSSDIKPLQGNAGELTVAMLQLTDLKNPSSNLGRVLYSSPVTLWDEAT		60	
Sbjct 17	A VTSF+YTSFSSSS IK LQGN +L LT KNPSSN+GRVLYSSPVT+WDEAT			75
Query 61	GNVASFVSSLTLRFEDVSGYVPANGALGVVNAPDAGTLPSSGAGGQLGTVPKDAFNNFV		120	
Sbjct 76	GNVA FVSS+T R EDVS YVPA+G + + AP +PSGS GG LG VNPDAFNNFV			134
Query 121	GVEFDDYSNSWDPSYSFHI GLDVNSLLSLQTAKWNRKSGSLVKAALLYDCHAKTLSVAVE		180	
Sbjct 135	GVEFDDYSN+WDPYSY HIG+DVNSL+SLQTAKWNRKSGSLVKA++YDCHAKTLSVAVE			193
Query 181	NDGQLLTVAQMVDKLA VLPSKVRVGLSAATSGNGVQKHDVY		221	
Sbjct 194	NDGQ++TVAQMVD AVLP SKV VGLSA+TS G+Q+HDVY			234

Figura 3-5. Comparación de las secuencias de las lectinas *Dioclea lehmanni* II y *Camptosema ellipticum*

10	20	30	40	50	60
AKVTSFDYTS	FSSSSDIKPL	QGNAGELTV	MLQLTDLKNP	SSNLGRVLYS	SPVTLWDEAT
70	80	90	100	110	120
GNVASFVSSL	TLRFEDVSGY	VPANGALGVV	NAPDAGTLPS	GSAGGQLGTV	NPXKDAFNNF
130	140	150	160	170	180
VGVEFDDYSN	SWDPSYSFHI	GLDVNSLLSL	QTAKWNRKSG	SLVKAALLYD	CHAKTLSVAV
190	200	210	220	230	
ENDGQLLTVA	QMVDKLA VLPSKVRVGLSAA	TSGNGVQKHD	VYXXXXXXXX		

Figura. 3-6. Estructura de LGL-II propuesta por Quintero, 2014 y Carreño *et al*, 2016.

### 3.3.3. Actividad aglutinante de las lectinas sobre eritrocitos con diferente perfil glicómico

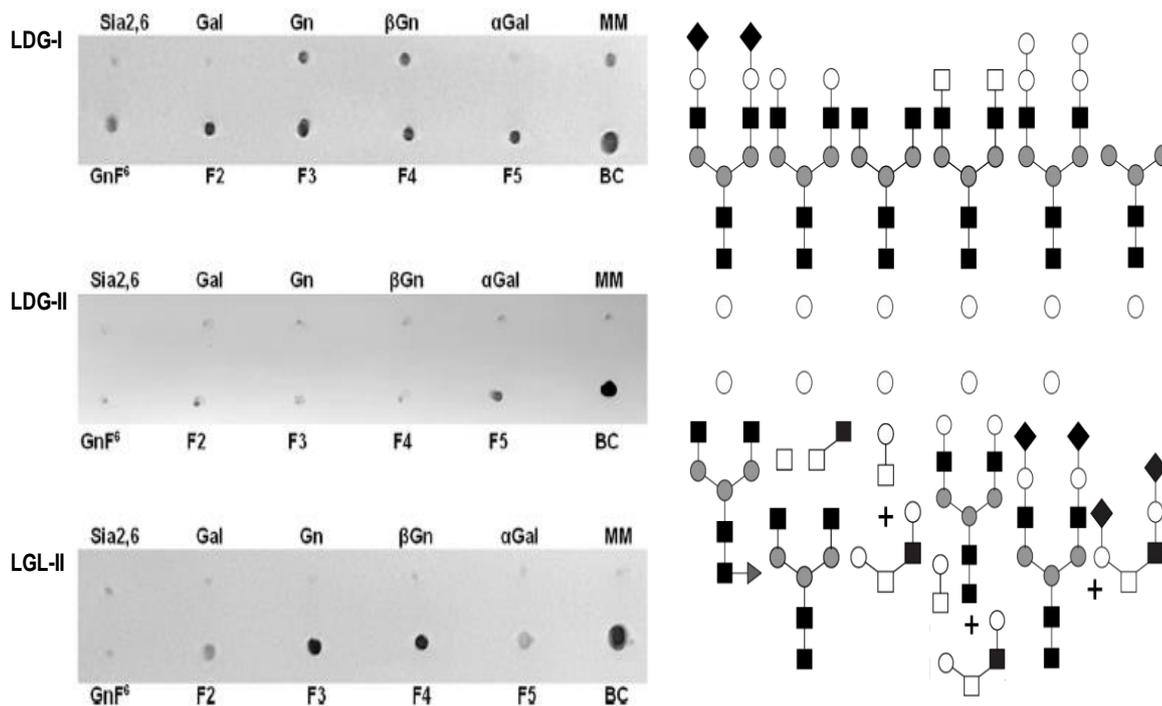
En los estudios de caracterización de lectinas es usual realizar pruebas con eritrocitos con el fin de verificar la actividad aglutinante de la lectina en cada paso de purificación. En varios estudios se han usado suspensiones de un solo tipo de eritrocitos, usualmente de conejo. En este trabajo se llevaron a cabo ensayos de eritroaglutinación siguiendo la metodología descrita en la sección 2.3.5, y evaluando diluciones seriadas de las lectinas sobre suspensiones de diferentes tipos de eritrocitos, los cuales presentan diferente perfil glicómico en sus membranas. Debido a que los

grupos histo-sanguíneos son carbohidratos no reductores de los extremos terminales de las cadenas de oligosacáridos presentes en las glicoproteínas y los glicoesfingolípidos expresados sobre la superficie de los glóbulos rojos y de otros tipos celulares (Ravn & Dabelsteen, 2000), esta aproximación permite evaluar ligandos oligosacáridos multivalentes en el contexto de ambiente de superficie celular (Evans & MacKenzie, 1999).

### 3.4. Resultados

#### 3.4.1. Interacción con glicoproteínas remodeladas

Después del remodelamiento enzimático, 1  $\mu$ g de cada una de las glicofomas resultantes fue dispuesto de manera punteada sobre membranas de nitrocelulosa, con el fin de identificar las estructuras de carbohidratos que puede reconocer cada una de las tres lectinas vegetales ensayadas (Fig. 3-7). Una muestra que contenía proteínas biotiniladas de manera natural (BC) fue usada como control positivo para visualizar la unión de la estreptavidina.



**Figura 3-7. Dotblot del reconocimiento de glicofomas de transferrina humana y fetuina bovina por las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II.** El panel de la derecha muestra las estructuras según la nomenclatura simbólica de glicanos acordada por el *Consortium for Functional Glycomics* y aceptada por IUPAC; círculos: hexosas; cuadrados: N-acetilhexosaminas; blanco: esteroquímica de galactosa; negro: esteroquímica de glucosa; gris: esteroquímica de manosa; triangulo gris: fucosa; diamante negro: ácido neuramínico. Los O-glicanos mostrados son aquellos que se encuentran en mayor proporción en cada glicofoma de fetuina (ver Fig. 3-4). *Glicofomas de transferrina*: Sia2,6: transferrina nativa con glicanos biantenarios con residuos terminales de ácido acetilneuramínico en enlace  $\alpha$ 2,6 con galactosa (NeuAc $\alpha$ 2,6); Gal: GalGal, asialotransferrina; Gn: GnGn asialoagalactotransferrina con glicanos que presentan residuos  $\beta$ GalNAc terminales;  $\beta$ Gn: glicofoma remodelada con residuos  $\beta$ GlcNAc terminales a partir de GnGn;  $\alpha$ Gal: glicofoma remodelada con residuos  $\alpha$ -galactosa terminales; MM: glicofoma con núcleo pentasacárido de N-glicanos,

con residuos de manosa terminales; GnF6: GnGnF6, asialoagalactotransferrina con núcleo  $\alpha$ 1,6-fucosa en GlcNAc reductora. Glicofomas de fetuina: F2: asialoagalactofetuina con O/N-glicanos; F3: asialofetuina con O-glicanos; F4: asialofetuina con O/N-glicanos y F5: fetuina nativa con O/N-glicanos. BC: Control de proteínas biotiniladas.

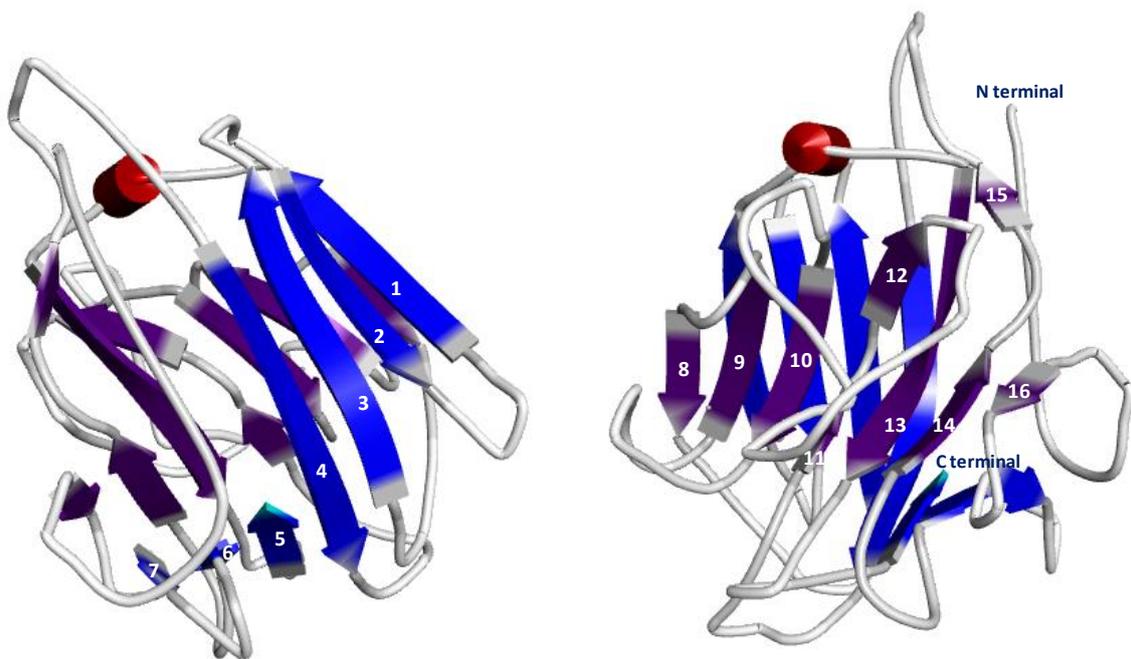
De acuerdo con los resultados del *dot blot* (Fig. 3-5), LDG-I reconoció 8 de las 11 glicofomas probadas; y de las 8 glicofomas, la mitad posee N-glicanos, y la otra mitad posee tanto N- como O-glicanos en su estructura. Por otro lado, LDG-II y LGL-II mostraron un comportamiento más específico al interactuar solo con 2 o con 4 de las glicofomas que contenían O/N-glicanos, respectivamente; mientras que no interactuaron con ninguna de las muestras de transferrina que contenían solo N-glicanos biantenarios; por lo cual se infiere que ambas lectinas tipo-II muestran preferencia por O-glicanos. Específicamente, se observó que LDG-I y LGL-II reconocieron la asialofetuina (F3 y F4, i.e., formas con y sin N-glicanos) pero no la asialotransferrina (N-glicano con  $\beta$ 1,4-Gal en el extremo terminal), indicando la unión de éstas dos lectinas a O-glicanos de las formas Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$  o Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (glicotopes T $\alpha$  y II $\beta$ , respectivamente). LDG-I también se unió a la asialoagalactofetuina [forma F2, con N-glicanos y con O-glicanos que contienen el núcleo GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr (antígeno Tn)], así como a la N-asialoagalactotransferrina  $\beta$ Gn $\beta$ Gn que contiene el extremo GlcNAc en enlace  $\beta$ 1,4, sugiriendo interacción de esta lectina con residuos HexNAc terminales sin importar el tipo de enlace ( $\alpha/\beta$ ) o tipo de glicano (O/N). LGL-II también reconoció GalNAc en enlace  $\alpha$  (como el encontrado en F2-F5), aunque en muy baja extensión (menor intensidad) cuando el glicano contenía solo uno o dos carbohidratos (F2). Por otro lado, LDG-II interactuó muy débilmente con F2, y en absoluto con asialoagalactotransferrina (GnGn) ni con ninguna de las demás glicofomas de transferrina que contenían solo N-glicanos biantenarios. LDG-I y LDG-II se unieron a la fetuina nativa (F5) pero no a la transferrina, sugiriendo que el ácido siálico en enlace  $\alpha$ 2,3 (encontrado en la fetuina, pero no en la transferrina) podría ser un ligando de las dos lectinas de *D. grandiflora*, mientras que la interacción de LGL-II con glicanos sialilados ( $\alpha$ 2,3 o  $\alpha$ 2,6) es muy poca o nula. El núcleo  $\alpha$ 1,6-fucosa en N-glicanos no promovió la unión de las lectinas tipo II. Ninguna de estas tres lectinas interactuó con asialotransferrina (GalGal) o su forma encriptada por  $\alpha$ 1,3-Gal ( $\alpha$ Gal $\alpha$ Gal); lo que indica que la galactosa no es un ligando obvio para ninguna de estas tres lectinas de la tribu *Diocleae*.

En el ensayo de control interno del reconocimiento de las glicofomas por la lectina RCA-I de la tribu *Acalypheae*, en el presente trabajo se obtuvieron resultados similares a los reportados por Iskratsch *et al*, 2009 para esta misma lectina, y concordantes otros estudios (revisado en Cummings & Schnaar, 2017), en donde RCA-I reconoce glicofomas con extremo terminal no reductor en enlace  $\beta$  tales como la N-glicofoma Gal que no es reconocida por ninguna de las tres lectinas *Diocleae* (Fig. 3-5), las glicofomas F2 - F4; y además, a diferencia de LDG-I, LDG-II y LGL-II; la presencia de NeuAc $\alpha$ 2,6 terminal no inhibe su interacción (Anexo VII).

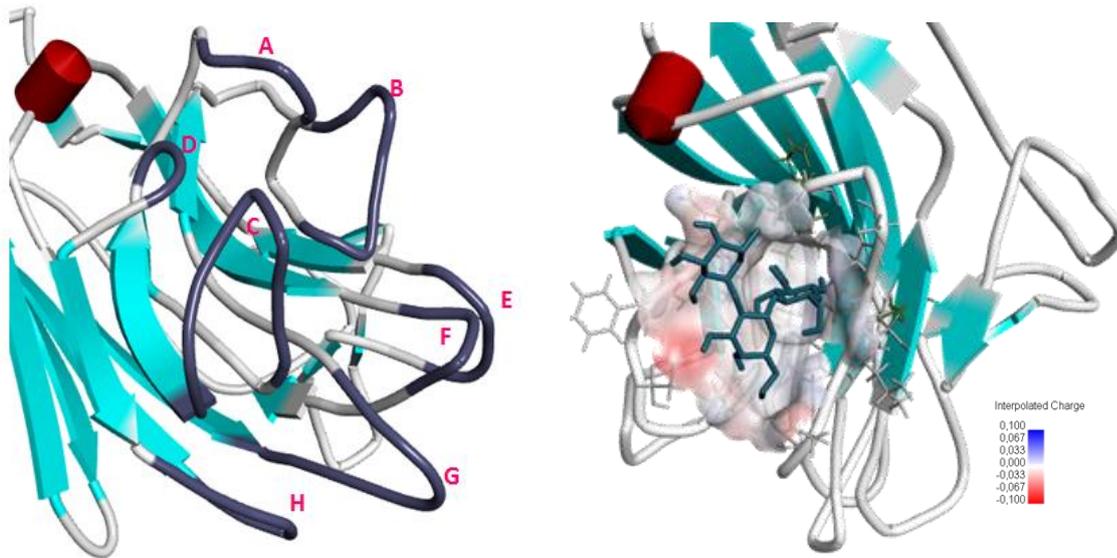
### 3.4.2. Modelamiento de la lectina LGL-II y de su acople molecular con diferentes carbohidratos

#### 3.4.2.1. Modelamiento molecular de la lectina LGL-II

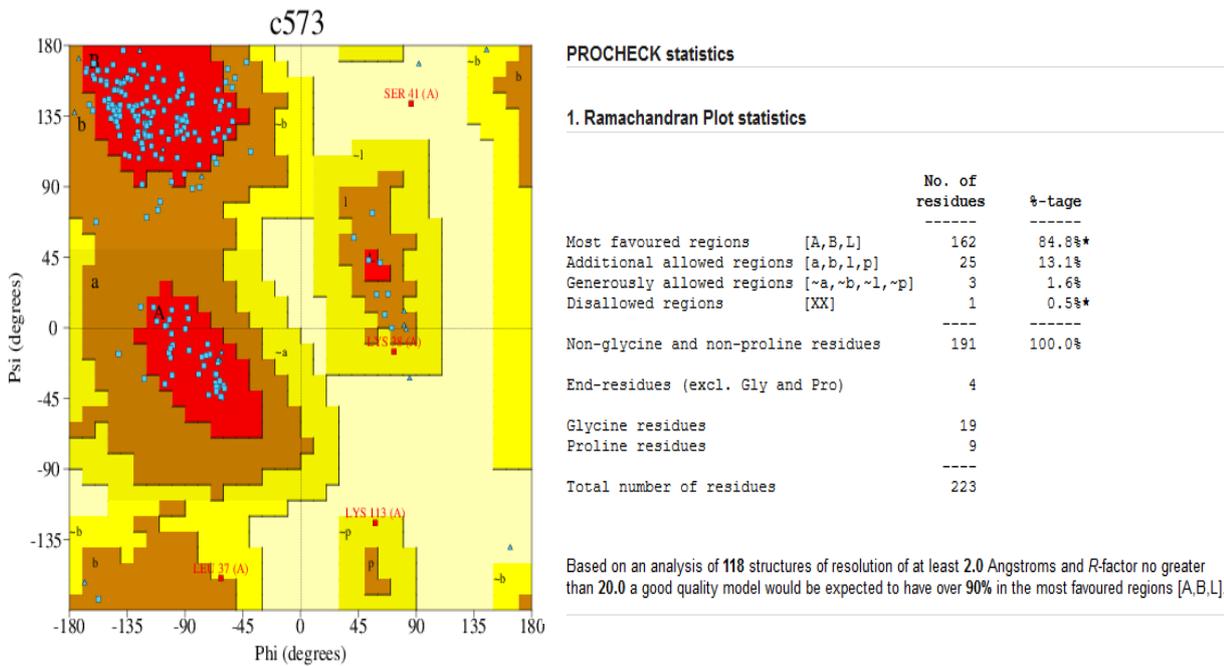
De tres modelos resueltos por I-TASSER se seleccionó aquel con la mayor significancia en la predicción (Roy *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2015; Zhang, 2008), con valor de C-score de 1.04. Según el modelo predicho, LGL-II consta de 16 hebras  $\beta$  organizadas de forma antiparalela formando un barril- $\beta$ , y ocho bucles flexibles que forman la superficie de unión al ligando (A-H) (Figs. 3-8 y 3-9). Con I-TASSER los modelos 3D se generan usando múltiples alineamientos enhebrados (*threading*) y simulaciones estructurales iterativas de montaje, de manera que puede usar la secuencia de solo tres proteínas para construir la totalidad de la proteína (Yang *et al.*, 2015). La plantilla usada por I-TASSER para generar la predicción de estructura 3D de LGL-II fue la de la lectina de *Pisum sativum* (arveja) (35,22% de identidad, 50% de similitud, cobertura del 81%). Hasta el momento, ninguna de las estructuras terciarias de las lectinas tipo II de la tribu Diocleae están reportadas en PDB. El diagrama de Ramachandran favorece este resultado indicando que el modelo propuesto es de buena calidad ya que más del 90% de los residuos se encuentra en las regiones favorecidas, como se explica en la leyenda de la Fig. 3-10.



**Figura 3-8. Estructura tridimensional de LGL-II.** Flechas azul y violeta: 16 hebras  $\beta$ ; líneas grises: *random coil*, cilindro rojo: hélice. C-score del modelo =1.04; con RMSD de  $3.5 \pm 2.4$  Å. <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/output/S385245/>.



**Figura 3-9. Sitio de unión a ligando.** Bucles A-H forman la superficie de unión al ligando (izquierda). Colores azules y violetas indican cargas positivas, y color rojo cargas negativas, en la superficie del bolsillo de unión al determinante H-tipo II (derecha); obtenido con Discovery Studio 2016.



**Figura 3-10. Diagrama Ramachandran para el modelo de LGL-II favorece el resultado obtenido con I-TASSER, indicando que el modelo propuesto es de buena calidad ya que más del 90% de los residuos se encuentra en las regiones favorecidas; *i.e.*, la conformación de ángulos de torsión phi y psi adecuada para la mayoría de los residuos de aminoácidos [zonas rojas: combinaciones más favorables de valores phi-psi (Morris *et al.*, 1992)], mientras solo un 0,5 % se encontró dentro de regiones no permitidas, además, se observa una mayor nube de puntos en las zonas Psi [45-180] y Phi[-180 - (-45)] correspondiente a la conformación hojas  $\beta$  característica de lectinas de leguminosas. Diagrama obtenido con PDBSum.**

### 3.4.2.2. Acople molecular de la lectina LGL-II con carbohidratos que representan diferentes glicotopes

La alta especificidad de la LGL-II por el trisacárido que representa al determinante histo-sanguíneo H-tipo II (Fuca $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc), en comparación con la especificidad más débil por el resto de determinantes tipo H y Lewis probada en ensayos ELLSA (Tabla 1-6), conllevó a Almanza *et al* (2004) a concluir que los hidroxilos 3-OH de GlcNAc; 3-OH, 4-OH y 6-OH de Gal; y 4-OH de Fuc, estaban implicados en la formación de puentes de hidrógeno con la lectina; además que la presencia del enlace glicosídico Fuca $\alpha$ 1,2Gal era necesario para la interacción y que la afinidad es mucho mayor cuando Gal y GlcNAc están unidos por enlace  $\beta$ 1,4. Por otro lado, ensayos por cromatografía frontal de afinidad (Vega *et al.*, resultados no publicados) muestran que LGL-II tiene preferencia por trisacáridos en comparación con pentasacáridos. Por medio de estudios *in silico* se realizaron los acoples moleculares entre LGL-II con seis ligandos diferentes (mono-, di- o trisacáridos) que pueden encontrarse en células de mamíferos, incluyendo al determinante H-tipo II, observando que dicho determinante es aquel ligando que muestra mayor energía de afinidad (-6.9 Kcal/mol) en la interacción con la lectina LGL-II, en comparación con los otros carbohidratos ensayados (Tabla 3-6). En la Tabla 3-7, y en las Figs. 3-11 a 3-16 se muestran y se describen las interacciones atómicas entre cada uno de los ligandos y LGL-II.

<b>Glicotipe</b>	<b>Secuencia del carbohidrato</b>	<b>Energía de afinidad (Kcal/mol)</b>
Determinante H tipo II	Fuca $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	-6.9
Disacárido II $\beta$ (LacNAc II)	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	-6.2
Sialil Gal (Sia $\alpha$ 2,3Gal)	Neu $\alpha$ 2,3Gal	-6.2
Sialil II $\beta$	Neu $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc	-6.1
Disacárido tipo H	Fuca $\alpha$ 1,2Gal	-6.0
GalNAc	GalNAc	-5.7

\* Los valores más negativos indican mejores energías de unión.

En las interacciones entre los seis ligandos y el sitio de unión en la LGL-II se presenta una frecuencia alta de residuos de aminoácidos polares y básicos en el reconocimiento carbohidrato-proteína, tales como Asn > Ser > Arg (Tablas 3-6 y 3-7; Figs. 3-11 a 3-16). Al menos un residuo de aminoácido polar, Asn, siempre estuvo presente en las interacciones con todos los ligandos, *i.e.*, los residuos Asn117 y Asn118 intervienen en interacciones con átomos en los azúcares acetilados de los carbohidratos H tipo II, NeuAc $\alpha$ 2,3Gal y GalNAc, pero no con galactosa; átomos del residuo Asn155 forman puentes de hidrógeno con Fuca $\alpha$ 1,2Gal y Sialil II $\beta$ ; Asn84, Asn129 y Asn213 forman puentes de hidrógeno con átomos en el disacárido LacNAc.

Las interacciones de los residuos Asn se dan a través de diferentes átomos del residuo de aminoácido (hidrógenos en NH<sub>2</sub>, NH, CH<sub>2</sub> o C<sub>4</sub>; y oxígenos en COOH o en la amida). Átomos en residuos polares (Ser) formaron puentes de hidrógeno con tres de los ligandos: Ser100 y Ser158 con átomos de oxígeno en C<sub>6</sub>/C<sub>3</sub> del azúcar NeuAc de los carbohidratos sialilados NeuAc $\alpha$ 2,3Gal y Neu $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, respectivamente; Ser136 con H/O en C<sub>1</sub>, C<sub>4</sub> o C<sub>5</sub> de galactosa en sialil LacNAc; Ser128 y Ser130 con H/O en GlcNAc de LacNAc, y H de Ser211 con galactosa en LacNAc. El residuo Arg46 interactúa con átomos en la amida de azúcares HexNAc; *i.e.*, como la amida de GlcNAc en el determinante H-tipo II y la amida del monosacárido GalNAc, así como con el anillo y el H de C<sub>6</sub> de galactosa en el disacárido NeuAc $\alpha$ 2,3Gal. También se presentan interacciones con los residuos aromáticos hidrofóbicos Phe116 (solo con Fuc), Phe119 (pi-sigma solo con monosacárido GalNAc) y Phe137; con los hidroxílicos polares Thr97 y Thr109, con anillo

del residuo hidrofóbico Pro93 (solo con C6 en Fuc; interacción de tipo alquil), los cargados Asp114, Lys153 y Lys157; aromáticos Trp131, Trp154 y Tyr135, y los no polares que tuvieron interacciones solo con galactosa fueron Gly104 (puente de hidrógeno con Gal en LacNAc) y Val110 (van der Waals con Gal en NeuAc $\alpha$ 2,3Gal) (Tablas 3-6 y 3-7; Figs. 3-11 a 3-16). La mayoría de las interacciones lectina-carbohidrato se dieron por medio de puentes de hidrógeno, seguido de puentes carbón-hidrógeno (*i.e.*, CH...O, donde H puede estar sobre el C2 del residuo de aminoácido o en el CH de Trp131; o sobre el CH de C1 o C5 del monosacárido GalNAc).

**Tabla 3-7. Interacciones atómicas entre ligando – lectina LGL-II**

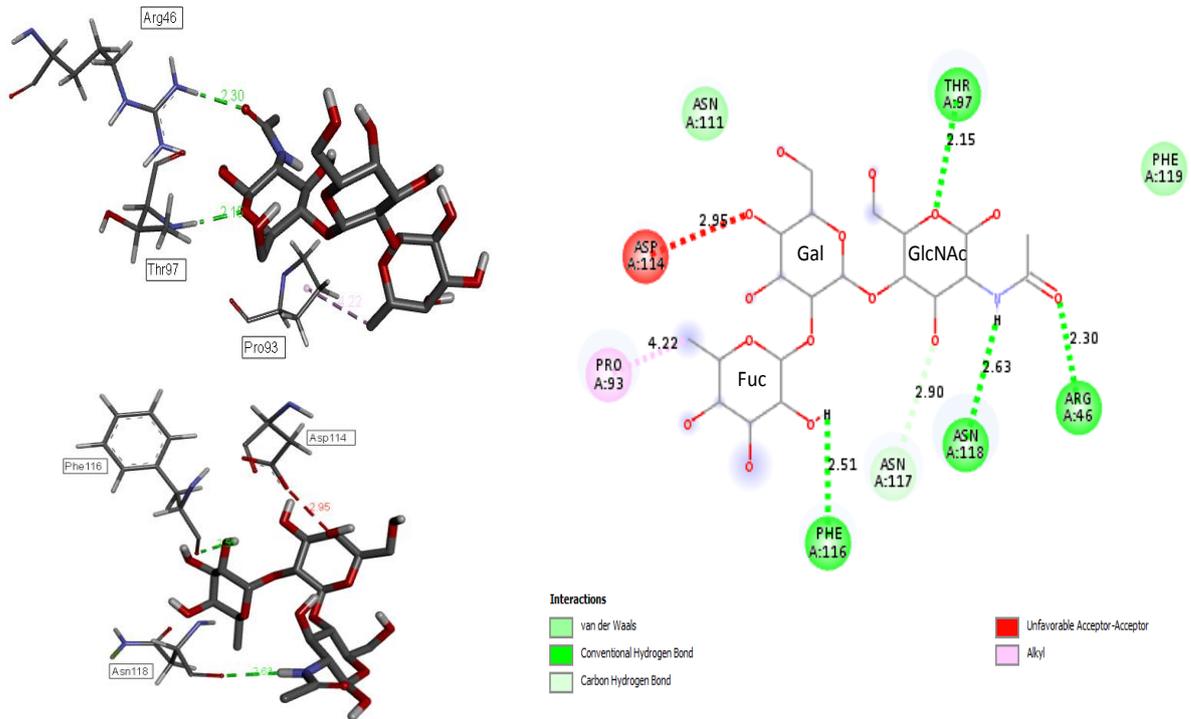
Ligando (glicotope)	Grupo aminoácido de LGL-II	Grupo del ligando	Distancia	Interacción
Fuca1,2Gal (Sustancia H)	Phe137: OH: H	Fuc: C4: O	2,54	Puente de hidrogeno
	Asn155: NH2: H	Gal: C3: O	2,98	Puente de hidrogeno
	Trp154: COOH: O	Fuc: C2: H	2,86	Puente de hidrogeno
	Trp154: COOH: O	Fuc: C3: H	2,36	Puente de hidrogeno
Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (Grupo histosanguíneo H tipo II)	Pro93: anillo	Fuc: C6: C	4,22	Alkil
	Phe116: COOH: O	Fuc: C2: H	2,51	Puente de hidrogeno
	Asp114: COOH: O	Gal: C4: O	2,95	Desfavorable aceptor-aceptor
	Thr97: NH: H	GlcNAc: O anillo	2,15	Puente de hidrogeno
	Arg46: NH2: H	GlcNAc: amida: O	2,30	Puente de hidrogeno
	Asn118: COOH: O	GlcNAc: NH: H	2,63	Puente de hidrogeno
	Asn117: CH2: H	GlcNAc: C3: O	2,90	Puente de hidrogeno
NeuAc $\alpha$ 2,3Gal (glicotope sialil Gal)	Asn118: NH: H	Neu: C1: COO: O	2,39	Puente de hidrogeno
	Asn117: C2: H	Neu: C1: COO: O	2,27	Puente de hidrogeno-carbón
	Ser100: OH: H	Neu: C6: O	2,36	Puente de hidrogeno
	Pro99: C2: H	Gal: C2: O	3,03	Puente de hidrogeno-carbón
	Arg46: NH2: H	Gal: O anillo	2,32	Puente de hidrogeno
	Arg46: NH2: H	Gal: C6: OH: H	1,98	Desfavorable donador-donador
	Thr109: C3: OH: O	Gal: C6: OH: H	2,51	Puente de hidrogeno
Sialil LacNAc (glicotope sialil II $\beta$ )	Arg156: COOH: O	Neu: C3: OH: H	2,50	Puente de hidrogeno
	Ser158: NH2: H	Neu: C3: OH: O	2,87	Puente de hidrogeno
	Lys157: C2: H	Neu: amida: O	2,66	Puente de hidrogeno-carbón
	Arg156: NH2: H	Gal: C4: OH: O	3,05	Puente de hidrogeno
	Ser136: COOH: O	Gal: C4: OH: H	2,90	Puente de hidrogeno
	Ser136: COOH: O	Gal: C5: OH: H	2,56	Puente de hidrogeno
	Ser136: C2: H	Gal: C1: OH: O	2,52	Puente de hidrogeno-carbón
	Tyr135: COOH: O	GlcNAc: C2: NH: H	2,58	Puente de hidrogeno
	Tyr135: COOH: O	GlcNAc: C3: OH: H	2,58	Puente de hidrogeno
	Phe137: C2: NH: H	GlcNAc: C4: OH: H	2,83	Puente de hidrogeno
	Lys153: NH3: H	GlcNAc: C2: NH: H	1,89	Desfavorable donador-donador
	Asn155: amida: O	GlcNAc: C6: OH: H	2,76	Puente de hidrogeno
	LacNAc (glicotope II $\beta$ )	Ser128: C2: COOH: O	GlcNAc: NH: H	2,38
Ser130: NH: H		GlcNAc: C3: OH: O	2,09	Puente de hidrogeno
Asn129: C2: COOH: O		GlcNAc: C3: OH: O	2,48	Puente de hidrogeno
Asn129: C2: COOH: O		Gal: C6: OH: H	2,21	Puente de hidrogeno
Asn84: C2: COOH: O		GlcNAc: C6: OH: H	2,32	Puente de hidrogeno
Asn84: C3: NH2: H		GlcNAc: C4: O	2,47	Puente de hidrogeno
Asn213: C3: O		Gal: C2: OH: H	2,69	Puente de hidrogeno
Asn213: C3: NH2: H		GlcNAc: C6: OH: O	2,25	Puente de hidrogeno
Ser211: OH: H		Gal: C2: OH: H	1,66	Desfavorable donador-donador
Gly104: O		Gal: C5: OH: H	2,63	Puente de hidrogeno
Trp131: CH: H		Gal: C6: OH: O	2,91	Puente de hidrogeno-carbón
GalNAc (monosacárido de antígeno Tn)	Thr97: C2: COOH: O	GalNAc: C6: OH: H	2,49	Puente de hidrogeno
	Asn117: C4: O	GalNAc: C5: CH: H	3,65	Puente de hidrogeno-carbón
	Asn117: C4: O	GalNAc: C1: CH: H	3,67	Puente de hidrogeno-carbón
	Asn117: C2: CH: H	GalNAc: C3: OH: O	2,88	Puente de hidrogeno-carbón
	Thr109: C2: COOH: O	GalNAc: C1: CH: H	3,53	Puente de hidrogeno-carbón
	Phe119: anillo	GalNAc: amida: C	3,66	Pi- sigma
	Asn118: C2: COOH: O	GalNAc: NH: H	2,32	Puente de hidrogeno

	Asn118: C2: NH: H	GalNAc: C3: O	2,74	Puente de hidrogeno
	Arg46: NH2: H	GalNAc: amida: O	2,44	Puente de hidrogeno

### Interacciones atómicas de lectina LGL-II con carbohidratos fucosilados

Las interacciones entre el determinante H-tipo II con LGL-II ocurren a través de cinco puentes de hidrógeno convencionales, dos interacciones de van der Waals, un puente de tipo carbón-hidrógeno, una interacción del tipo alquil y una interacción del tipo aceptor-aceptor (interacciones descritas en la leyenda de la Fig. 3-11). Con la aproximación bioinformática se corrobora la importancia del hidroxilo 3-OH de GlcNAc del trisacárido cuyo oxígeno interactúa con el residuo Asn117; además se observaron otras interacciones de este azúcar; los oxígenos del anillo y del enlace acetilamido de GlcNAc interactúan con Thr97 y Arg46, respectivamente; el hidrógeno de NH en GlcNAc interactúa con el oxígeno en el grupo CO de Asn118. También se observan interacciones de la fucosa de tipo alquil entre su C6 con el anillo de Pro93, y por puente de hidrógeno con el oxígeno de COOH en Phe116 (en los acoplos con los seis ligandos, Pro93, Phe116 y Phe137 solo interactuaron con átomos de Fuc); por otro lado, la interacción observada con la galactosa en el trisacárido es del tipo aceptor-aceptor entre el oxígeno en C4 del azúcar con el oxígeno en el COOH de Asp114 (Fig. 3-9, Tabla 3-7).

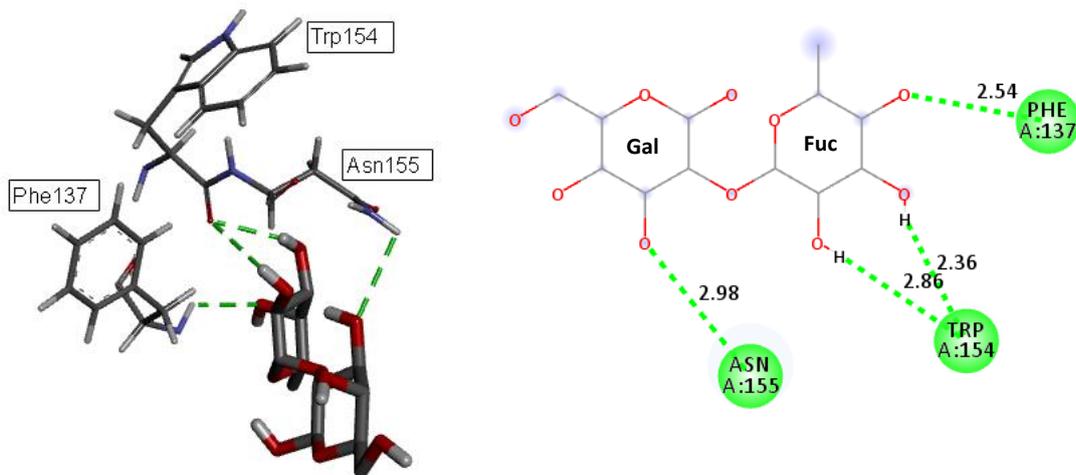
El número de puentes de hidrógeno de LGL-II con átomos de GlcNAc en el determinante H-tipo II fue mayor que el de las interacciones con Fuc o Gal (Fig. 3-11), y este mismo comportamiento ocurrió con los otros dos ligandos (LacNAc y sialil LacNAc) que también contienen GlcNAc en su estructura (Figs 3-14 y 3-15). El monosacárido GlcNAc no inhibe la actividad de LGL-II (Almanza *et al*, 2004) pero la presencia de GlcNAc en di- y trisacáridos aporta a la afinidad en las interacciones en comparación a monosacáridos. Entonces la interacción de LGL-II con GlcNAc es importante y depende del contexto, siendo relevante la presencia de enlaces de GlcNAc con Gal terminal o subterminal.

Fuca $\alpha$  1,2 Gal $\beta$  1,4GlcNAc

**Figura 3-11. Interacción de LGL-II con el determinante H-tipo II.** Fuc: puente de hidrógeno entre oxígeno del grupo carboxílico del residuo aromático hidrofóbico Phe116 con el H en C2 de Fuc, e interacción de tipo alquil entre el anillo del aminoácido no polar hidrofóbico Pro93 y el carbono de CH<sub>3</sub> en C6 en Fuc. Gal: fuerzas de van der Waals con residuo hidrofílico polar Asn111 e interacción del tipo aceptor-aceptor entre el átomo O en grupo carboxílico del residuo polar cargado Asp114 y el oxígeno en C4 de Gal. GlcNAc: puentes de hidrógeno entre el H en NH del residuo de aminoácido hidroxílico polar Thr97 con el oxígeno del anillo de GlcNAc, del oxígeno del grupo carboxílico del residuo polar Asn118 con el H del NH de GlcNAc, y del H del NH<sub>2</sub> del residuo cargado positivo básico Arg46 con el oxígeno de la amida en GlcNAc; por fuerzas de van der Waals con Phe119 e interacciones carbón-hidrógeno entre el H del CH<sub>2</sub> del residuo Asn117 y el oxígeno en C3 de GlcNAc.

En las interacciones de Fuca $\alpha$ 1,2Gal y Fuca $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc con LGL-II, átomos de la deoxi L-hexosa interactúan con residuos de aminoácidos hidrofóbicos mientras que átomos de la galactosa interactúan con residuos de aminoácidos hidrofílicos; aunque dichas interacciones no se presentan a través de exactamente los mismos átomos ni los mismos residuos para el disacárido y el trisacárido (Figs. 3-9 y 3-10). La presencia de fucosa aporta a la afinidad del trisacárido (-6.9 kcal/mol) en comparación al disacárido no fucosilado LacNAc (-6.2 kcal/mol; Gal $\beta$ 1,4GlcNAc), pero la afinidad del disacárido Fuca $\alpha$ 1,2Gal es inferior (-6.0 kcal/mol), lo que muestra nuevamente la preferencia de LGL-II por trisacáridos sobre otro tipo de carbohidratos, una preferencia por fucosa en el extremo terminal del carbohidrato, y un aporte de GlcNAc a la afinidad. En las interacciones del disacárido se observaron puentes de hidrógeno que involucran átomos sobre el C4 de Fuc y el C3 de Gal, como habían propuesto Almanza *et al* (2004).

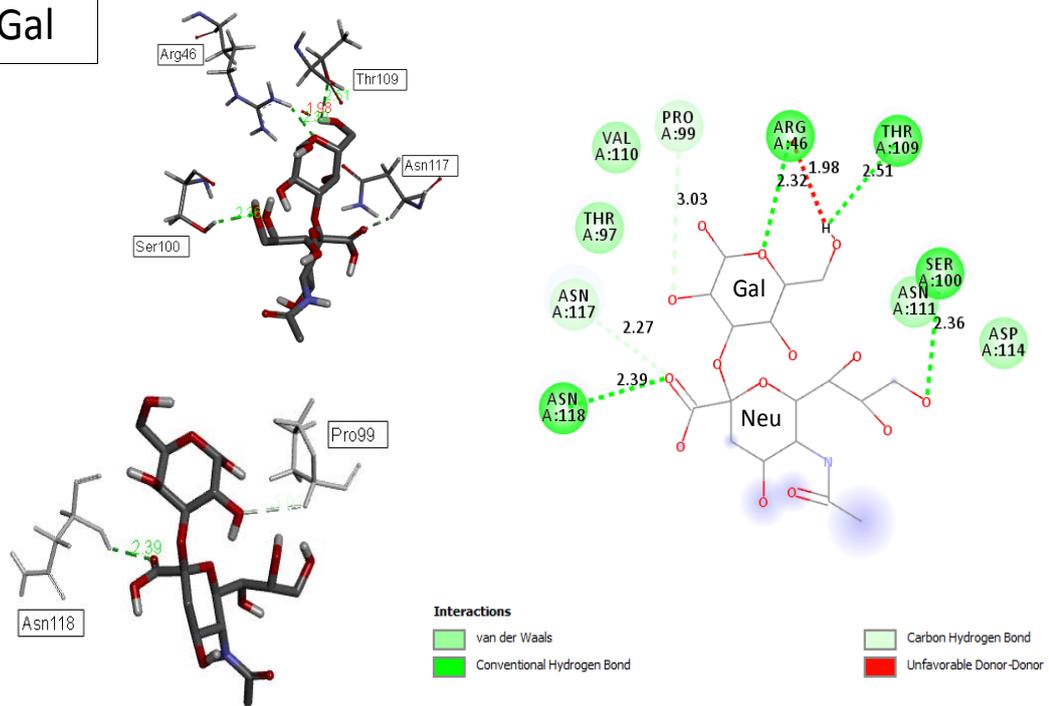
## Fuc $\alpha$ 1,2 Gal



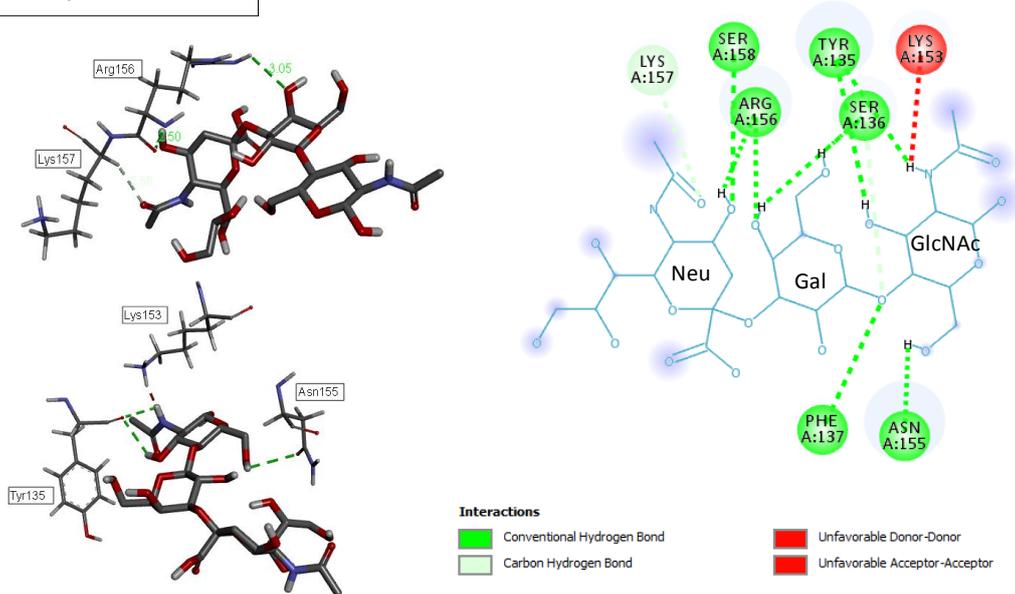
**Figura 3-12. Interacciones de LGL-II con el disacárido Fuc $\alpha$ 1,2Gal.** Fuc: puentes de hidrógeno entre el H del OH del residuo hidrofóbico aromático Phe137 con el oxígeno en C4 de Fuc; y entre oxígeno del grupo carboxilo en el residuo aromático Trp154 con los hidrógenos en C2 y C3 de Fuc. Gal: puente de hidrógeno entre H del NH<sub>2</sub> en el residuo de aminoácido hidrofílico polar Asn155 y el oxígeno en C3 de Gal. Regiones accesibles al solvente: circunferencias lila en azúcares y halos en residuos de aminoácidos. Código Corey-Pauling-Koltun (CPK): carbono gris, nitrógeno azul, oxígeno rojo, hidrógeno blanco.

### Interacciones de LGL-II con carbohidratos sialilados

Las interacciones del ácido acetil neuramínico (NeuAc) en el disacárido se dieron con aminoácidos polares no cargados pequeños (Ser100, Asn117, Asn118; aa pequeños: 60-117 A<sup>3o</sup>) mientras que las interacciones de este azúcar en el trisacárido se dieron con Ser158 pero también con aminoácidos básicos grandes (Arg156 y Lys157; aa grandes: 162-174 A<sup>3o</sup>). Las interacciones con galactosa fueron con átomos en C2, C6 o con el oxígeno en el anillo del azúcar en el disacárido, mientras que se dieron con átomos en C1, C4 o C5 de Gal en el trisacárido. Con GlcNAc ocurrieron puentes de hidrógeno con la participación de H en NH del C2 o de H de los hidroxilos en C3, C4 y C6 del azúcar (Figs. 3-13 y 3-14).

Neu $\alpha$ 2,3Gal

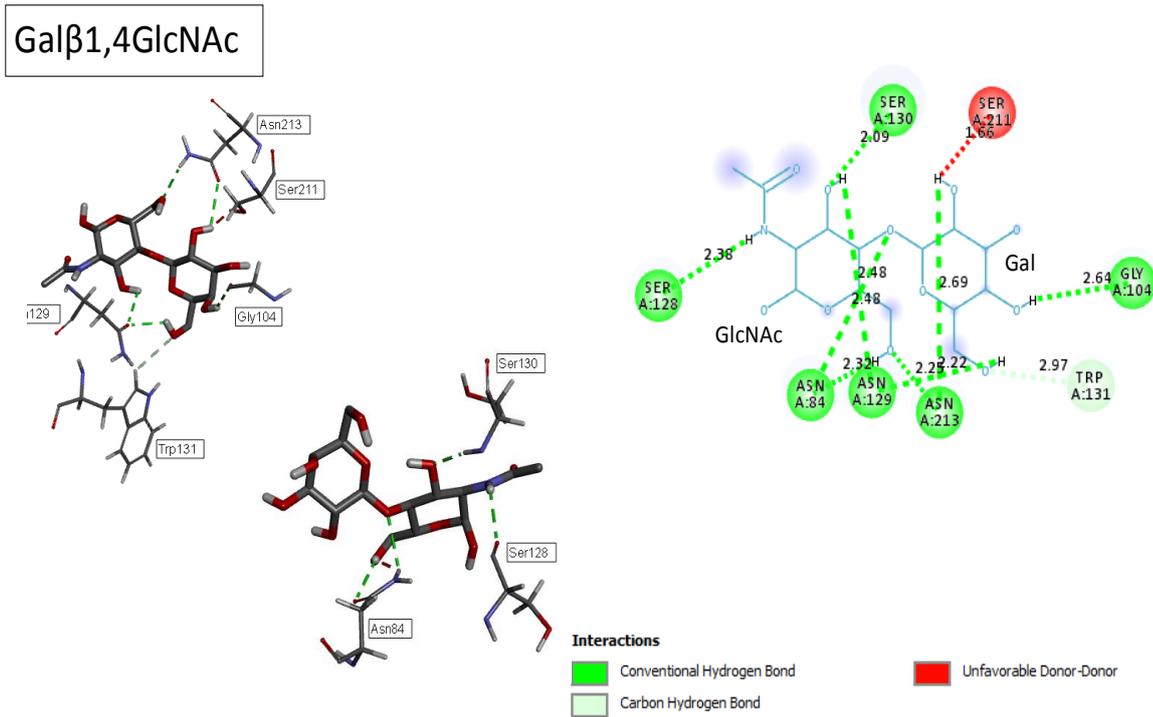
**Figura 3-13. Interacciones de LGL-II con el disacárido sialilado NeuAc $\alpha$ 2,3Gal.** NeuAc: puentes de hidrógeno entre el hidrógeno en NH del residuo de aminoácido polar Asn118 con el oxígeno de COO<sup>-</sup> en C1 del ácido N-acetilneuramínico, y entre H en OH del residuo hidroxílico polar Ser100 con el oxígeno en C6 de NeuAc; interacción enlace carbono-hidrógeno entre el H en C2 de Asn117 y el oxígeno de COO<sup>-</sup> en C1 del NeuAc, por fuerzas de van der Waals con Asn111 y con el residuo polar cargado Asp114. Gal: puentes de hidrógeno entre H del NH<sub>2</sub> del residuo cargado positivo básico Arg46 con el oxígeno del anillo de Gal, y del oxígeno del hidroxilo en C3 del residuo hidroxílico polar Thr109 y el H del 6-OH en Gal; fuerzas de van der Waals con los residuos polar Thr97 y el hidrofóbico no polar alifático Val110, interacción de enlace carbono-hidrógeno entre H en C2 del residuo hidrofóbico Pro99 y el oxígeno en C2 de Gal; y una interacción donador-donador entre H en NH<sub>2</sub> de Arg46 y el oxígeno en 6-OH de Gal.

Neu $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc

**Figura 3-14. Interacciones de LGL-II con el trisacárido sialilado NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc.** NeuAc: a través de puentes de hidrógeno entre el H del grupo NH<sub>2</sub> de Ser158 y el oxígeno del 3'OH en el ácido N-acetil neuramínico, y entre el oxígeno en COOH y del hidrógeno en NH<sub>2</sub> del residuo polar básico Arg156 con el H en 3-OH del NeuAc; e interacción de enlace carbono-hidrógeno del H en C2 del residuo hidrofílico polar básico Lys157 y el oxígeno en la amida de NeuAc. Gal: puentes de hidrógeno de un oxígeno del grupo carboxílico del residuo de aminoácido polar hidroxílico Ser136 y los hidrógenos en 4-OH y 5-OH de Gal, y del H en NH<sub>2</sub> del residuo polar básico Arg156 con el oxígeno en C4 de Gal; y a través de interacción enlace hidrógeno-carbón del hidrógeno del C2 de Ser136 con el oxígeno del 1-OH. GlcNAc: puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carboxílico del residuo aromático Tyr135 con los átomos de H de los grupos NH y 3'OH de GlcNAc; del H en el grupo NH del C2 del residuo hidrofóbico aromático Phe137 y el H del 4'OH de GlcNAc, y del oxígeno del grupo amida del residuo hidrofílico polar Asn155 y el H del 6'OH en GlcNAc; y una interacción del tipo donador-donador de H en NH<sub>3</sub> de Lys153 con el H de NH en C2 de GlcNAc.

### Interacciones de LGL-II con LacNAc

Las interacciones de la lectina con el disacárido Gal $\beta$ 1,4GlcNAc se dieron por puentes de hidrógeno con átomos en los hidroxilos 2-OH, 5-OH y 6-OH de galactosa; y con átomos en 3-OH, 6-OH, NH y C4 de GlcNAc. Adicionalmente, se observó un puente de tipo hidrógeno-carbón con el 6-OH de galactosa (Fig. 3-15). El glicotipe LacNAc se encuentra presente en glicoconjugados como unidades de disacáridos en los extremos de glicanos complejos, o como unidades repetitivas en cadenas de poli-LacNAc en N/O-glicanos que se encuentran en la estructura de varias moléculas de la matriz extracelular (MEC) y de la superficie celular (Rapoport *et al.*, 2008; Seetharaman *et al.*, 1998; Krzeminski *et al.*, 2011). La lectina de origen mamífero, galectina LGALS3 también interactúa con este glicotipe (Murphy *et al.*, 2013; Rapoport *et al.*, 2008). Las características que tienen en común las interacciones de LGL-II y LGALS3 con LacNAc es que intervienen átomos en los hidroxilos 6-OH de galactosa y 3-OH de GlcNAc, y que además un residuo de Trp es esencial para el contacto con galactosa vía interacciones C-H (Trp131 en LGL-II y Trp181 en LGALS3). Por otro lado, también se observan diferencias en otras interacciones. El acople de LGL-II con la galactosa en el disacárido se da a través de átomos en residuos de aminoácidos polares no cargados y no polares (Asn129, Asn213, Gly104 y Trp131); mientras que LGALS3 además de interactuar a través de residuos no cargados (Asn134) y no polares (Trp181) también lo hace por residuos cargados (Arg162, His158, Glu184). De manera similar, el acople con GlcNAc es a través de residuos diferentes, polares no cargados en LGL-II (Asn84, Ser128, Asn129, Ser130, Asn213), y cargados en LGALS3 (Arg162 y Glu184).

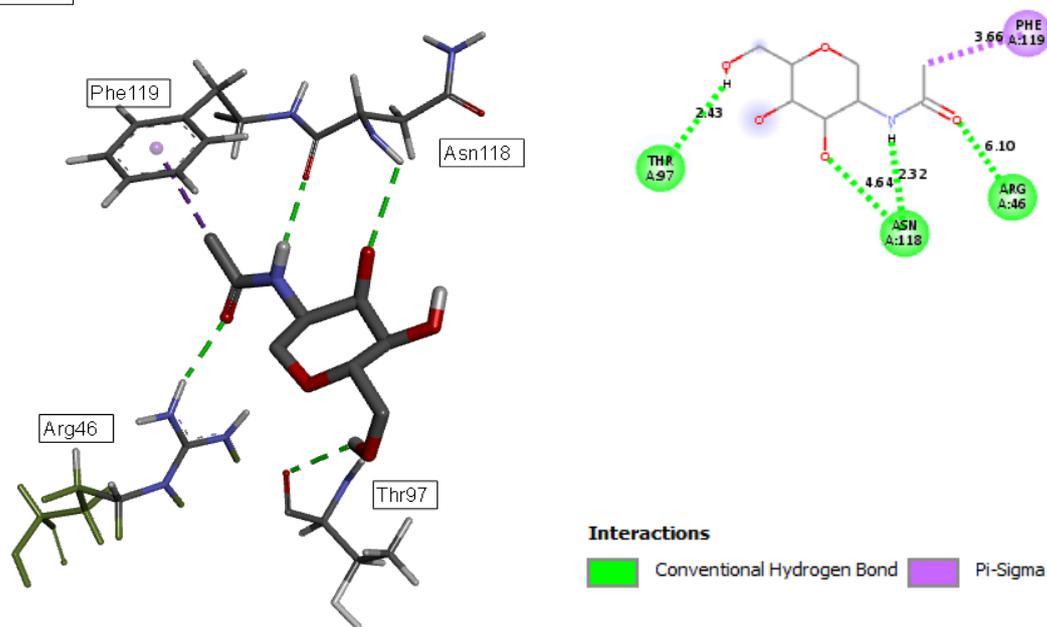


**Figura 3-15. Interacciones de LGL-II con el glicotopo disacárido Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (LacNAc).** Gal: puentes de hidrógeno entre el oxígeno en el grupo carboxilo en C2 del residuo polar Asn129 con el hidrógeno en 6-OH de Gal, del oxígeno del residuo no polar Gly104 con el H en 5-OH de Gal, y del oxígeno en C3 en Asn213 con el H del 2-OH de Gal; interacción hidrógeno-carbón del H en el CH del aromático hidrofóbico Trp131 con el O del 6-OH de Gal; y una interacción del tipo donador-donador entre H de OH en Ser211 y H del 2-OH de Gal. GlcNAc: puentes de hidrógeno entre el oxígeno en carboxilo de C2 del residuo del aminoácido polar hidroxílico Ser128 y el H en NH del GlcNAc, entre el H del grupo NH de Ser130 y oxígeno del 3-OH en GlcNAc, entre los oxígenos de los grupos carboxilo de los residuos polares Asn129 y Asn84 con el oxígeno del 3-OH y el H en 6-OH, respectivamente, y entre los hidrógenos en los grupos NH de Asn84 y Asn213 con los oxígenos en C4 y en 6-OH en GlcNAc, respectivamente.

### Interacciones de LGL-II con el monosacárido GalNAc

Se observó una menor afinidad en la interacción de LGL-II con el monosacárido GalNAc en comparación a la interacción con los di- y trisacáridos ensayados (Tabla 3-6), lo que está en concordancia con la afinidad relativamente alta de la lectina por glicanos más complejos en comparación a la afinidad por monosacáridos ([www.functionalglycomics.org/](http://www.functionalglycomics.org/)). Las interacciones estuvieron dadas por residuos de aminoácidos polares no cargados (Thr97, Thr109, Asn117, Asn118), el residuo básico Arg46 que interactuó con el oxígeno del enlace amidoacetyl del carbohidrato, y una interacción pi-sigma del anillo del residuo aromático hidrofóbico Phe119 con el metil de la GalNAc (Fig. 3-16).

## GalNAc



**Figura 3-16. Interacción de LGL-II con el monosacárido GalNAc** puentes de hidrógeno entre el oxígeno del grupo carboxílico en C2 del residuo de aminoácido hidroxílico polar Thr97 con el H del 6-OH de GalNAc; entre oxígeno del grupo carboxílico y el H del grupo NH en C2 del residuo polar Asn118, con el H del grupo NH y el oxígeno en C3 del aminoazúcar acetilado, respectivamente; entre H del NH<sub>2</sub> del residuo cargado positivo básico Arg46 con el oxígeno del grupo amida de GalNAc; e interacción pi-sigma del anillo del residuo aromático hidrofóbico Phe119 con el carbono del grupo amida del GalNAc.

En las interacciones de LGL-II con los seis carbohidratos ensayados se dieron en total cuatro interacciones “desfavorables” del tipo donador-donador o aceptor-aceptor. Se ha reportado que dichas interacciones en los acoples moleculares pueden deberse a que la entropía en la actividad de las proteínas y/o la flexibilidad de las moléculas no se tiene en cuenta, en algunos protocolos de programas bioinformáticos, por lo tanto, los átomos del ligando podrían encajar por efecto inducido ([www.researchgate.net/post/unfavourable\\_bump\\_in\\_molecular\\_docking](http://www.researchgate.net/post/unfavourable_bump_in_molecular_docking)).

### 3.4.3. Interacción de las lectinas con la superficie de eritrocitos de diferente tipo.

El extracto salino de semillas de *D. grandiflora* mostró fuerte actividad aglutinante hacia todos los tipos de eritrocitos ensayados (Tabla 2-1), al igual que la fracción DEAE-NR, en mayor o menor proporción dependiendo del tipo de eritrocito. La lectina LDG-I pura aglutinó todos los tipos de eritrocitos ensayados, exhibiendo diferentes títulos específicos, *i.e.*, esta lectina aglutinó las suspensiones de eritrocitos de cerdo, y de los tipos T y Tn, con  $\approx 15$  ng de lectina (última dilución ensayada en la que se observó aglutinación), mientras que se necesitaron 60 ng para aglutinar los eritrocitos tipo O. Los eritrocitos tipo A y B, así como los eritrocitos de oveja, fueron aglutinados por LDG-I en un grado similar, con un título específico que dobla a aquel para los de tipo O. Todo lo anterior concuerda con los resultados observados para otras lectinas tipo I (con especificidad por Man/Glc) de especies de la tribu *Diocleae*, las cuales mostraron la habilidad de aglutinar eritrocitos de diferentes especies (Cavada *et al*, 1996; Pérez G *et al*, 1990; Pérez G, 1998; Rangel *et al*, 2011; Sierra & Pérez G, 1999).

Trabajos previos mostraron que esta lectina aglutina eritrocitos de otras especies animales y eritrocitos humanos tipo O (Pérez G, 1998; Ramos et al; 1996). LDG-I aglutina eritrocitos de perro y de caballo con títulos específicos 2.5 y 5 veces mayores, respectivamente; que aquellos observados en eritrocitos O, además, los eritrocitos caninos son aglutinados por la lectina con una potencia similar a la de los eritrocitos de conejo, mientras que, en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, la actividad sobre eritrocitos de oveja es más débil. Acerca de la actividad aglutinante de LDG-I sobre eritrocitos T y Tn, probados por primera vez en el presente trabajo de tesis, se observó que la lectina aglutina ambos tipos de eritrocitos con el mismo título específico (Tabla 2-1), en una concentración mínima ensayada de 0.587 µg/mL, correspondiente a 3.4, 6.5 o 60 veces las concentraciones requeridas de las lectinas Tn-específicas de *Salvia bogotensis* (LSBo) (Vega & Pérez G, 2006), *Vicia villosa* (isoelectina VVAB4) y *Wistaria floribunda* (WFA) (Piller et al, 1990). Teniendo en cuenta los títulos específicos y las concentraciones CMA obtenidos en el presente trabajo (Tabla 2-1 y Tabla 3-8) y aquellos obtenidos por Pérez G (1998), se propone el siguiente orden de tipo de eritrocitos que son aglutinados de mayor a menor grado de actividad por LDG-I:

**caballo > conejo, perro > cerdo, T, Tn > A, B ≥ oveja > O.**

**Tabla 3-8. Concentración mínima aglutinante (CMA) de las lectinas (µg/mL)**

Lectina	Tipo de Eritrocito						
	A	B	O	T	Tn	C	Ov
LDG-I	0.58	0.58	1.17	0.58	0.58	0.58	1.17
LDG-II	NA	NA	NA	0.11	NA	1.82	NA
LGL-II	28 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	1.11	2.17	4.34	ND	NA

A, B, O, T y Tn: eritrocitos de origen humano. T y Tn fueron producidos como esta descrito en la metodología. C y Ov: eritrocitos de cerdo y oveja, respectivamente. NA: no se observó aglutinación. ND: no determinado. <sup>a</sup> Datos de aglutinación de eritrocitos A y B para LGL-II reportados por Almanza et al, 2004.

En cuanto a la fracción DEAE-R obtenida a partir del extracto de semillas de *D. grandiflora*, ésta mostró la habilidad de aglutinar eritrocitos T, así como la LDG-II pura con un título específico 5 veces mayor que el determinado con LDG-I (Tabla 2-1). La concentración mínima aglutinante (CMA) ensayada de LDG-II para eritrocitos T fue 0.11 µg/mL (2.8 ng), concentración que fue 3 veces menor con respecto a la encontrada para la lectina T-específica de *Scylla Serrata* (Pramanik et al; 2010), y 20 veces menor que la de LGL-II (Tabla 3-8). La actividad de LDG-II sobre eritrocitos de cerdo fue más débil, y los demás tipos de eritrocitos ensayados no fueron aglutinados por esta lectina (Tabla 2-1 y Tabla 3-8). Se ha observado que otras lectinas tipo II de la tribu *Diocleae* si aglutinan eritrocitos humanos normales (Almanza et al, 2004; Fukuda et al, 1994; Pérez G, 1998; Sierra & Pérez G, 1999). La lectina LGL-II de *G. lindenii* mostró CMA de 1.1 µg/mL, 2.17 µg/mL y 4.34 µg/mL, para eritrocitos tipo O, T y Tn, respectivamente (presente trabajo), así como de 28 µg/mL para eritrocitos A y 7 µg/mL para eritrocitos B (Almanza et al, 2004). De manera similar a LGL-II con respecto a eritrocitos O y A, LePendu et al (1986) reportaron que la lectina de *Galactia tenuiflora* (LGTe-II) aglutina eritrocitos de cordón umbilical de recién nacido de grupo sanguíneo O en mayor proporción que aquellos de cordón umbilical de recién nacido de grupo sanguíneo A, aunque no hay datos cuantitativos disponibles. La lectina LDL-II de *D. lehmanii* aglutina eritrocitos

humanos ABO requiriéndose de 0.2–0.3  $\mu\text{g}$  de lectina (Pérez G, 1998) y la lectina de *Galactia tashiroi* (LGTas-II) aglutina eritrocitos ABO usando una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Fukuda *et al*, 1994). Por otro lado, Melgarejo *et al* (2005) observaron aglutinación de eritrocitos O por LDG-II usando una concentración más alta de lectina que la usada en el presente trabajo ( $\approx 300 \mu\text{g}/\text{mL}$ ).

La preferencia de las lectinas tipo II hacia eritrocitos de diferentes animales también varía; e.g., LGL-II ha mostrado diferencias marcadas en los títulos específicos para eritrocitos de rata y conejo, requiriendo de 3.7 y 50 veces más, con respecto a la concentración necesaria para aglutinar eritrocitos tipo O; y no aglutina eritrocitos de vaca, caballo, perro ni oveja, usando hasta 1.4  $\text{mg}/\text{mL}$  de lectina (Almanza *et al*, 2004). LGTas-II aglutina eritrocitos de rata y muy débilmente los de conejo (Fukuda *et al*, 1994); LCR-II aglutina eritrocitos de conejo con una CMA  $< 2 \mu\text{g}/\text{mL}$  (Rocha *et al*, 2009); LDL-II aglutina eritrocitos de oveja y no de conejo (Pérez G, 1998); mientras que LDG-II no muestra actividad sobre eritrocitos de conejo (Melgarejo *et al*, 2005) ni de oveja (Tabla 2-1). De manera similar, LDL-II aglutina eritrocitos de caballo mientras que LGL-II no (Almanza *et al*, 2004; Pérez G, 1998).

A partir de los datos obtenidos en el presente trabajo y complementando con los estudios previos sobre eritroaglutinación por LGL-II y LDG-II; las lectinas tipo II tienen la habilidad de aglutinar ciertos tipos de eritrocitos así: LGL-II aglutina  $\text{O} > \text{T} > \text{Tn} > \text{B} > \text{rata, A}$ , mientras que no aglutina eritrocitos de oveja (presente trabajo y Almanza *et al*, 2004), ni de vaca, ni caballo ni perro (Almanza *et al*, 2004); y LDG-II aglutina  $\text{T} \gg \text{cerdo}$  (presente trabajo), mientras que no aglutina eritrocitos de conejo (Melgarejo *et al*, 2005); ni eritrocitos ABO, ni de oveja (Tablas 2-1 y 3-6 del presente trabajo).

Según la literatura revisada, con éste trabajo se aporta en la caracterización de la actividad aglutinante de las dos lectinas de *D. grandiflora*, donde LDG-I aglutinó en mayor grado los eritrocitos de cerdo mientras que la LDG-II aglutina específicamente eritrocitos T en mayor grado que LDG-I y LGL-II; y también en la caracterización de la actividad aglutinante de la LGL-II, la cual aglutinó, además de los eritrocitos O, los T y Tn, con CMA menores a las concentraciones necesarias para aglutinar otros tipos de eritrocitos. De todo lo descrito se puede inferir que las lectinas Diocleae estudiadas hasta el momento, tienen preferencias específicas por eritrocitos de diferente perfil glicómico.

## 3.5. Discusión

### 3.5.1. Especificidad de las lectinas

**Glicotopes GalNAc/GlcNAc (HexNAc).** Varias unidades estructurales que ocurren en mamíferos están basadas en glicotopes HexNAc, y comúnmente pueden estar galactosiladas: GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr (núcleo Tn) y Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1-R (glicotope T $\alpha$  o antígeno Thomsen–Friedenreich), ambos presentes en O-glicanos; Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\beta$ 1-R (glicotope T $\beta$ ) en O/N-glicanos y glicoesfingolípidos; Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1-R (glicotope I $\beta$ ) y Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1-R (glicotope II $\beta$ ) en O/N-glicanos (Dam *et al*, 2007; Leppänen *et al*, 2005; Piller *et al*, 1990; Wu *et al*, 2010). Las lectinas que reconocen GalNAc a menudo muestran alguna de las dos siguientes especificidades: (i) amplio

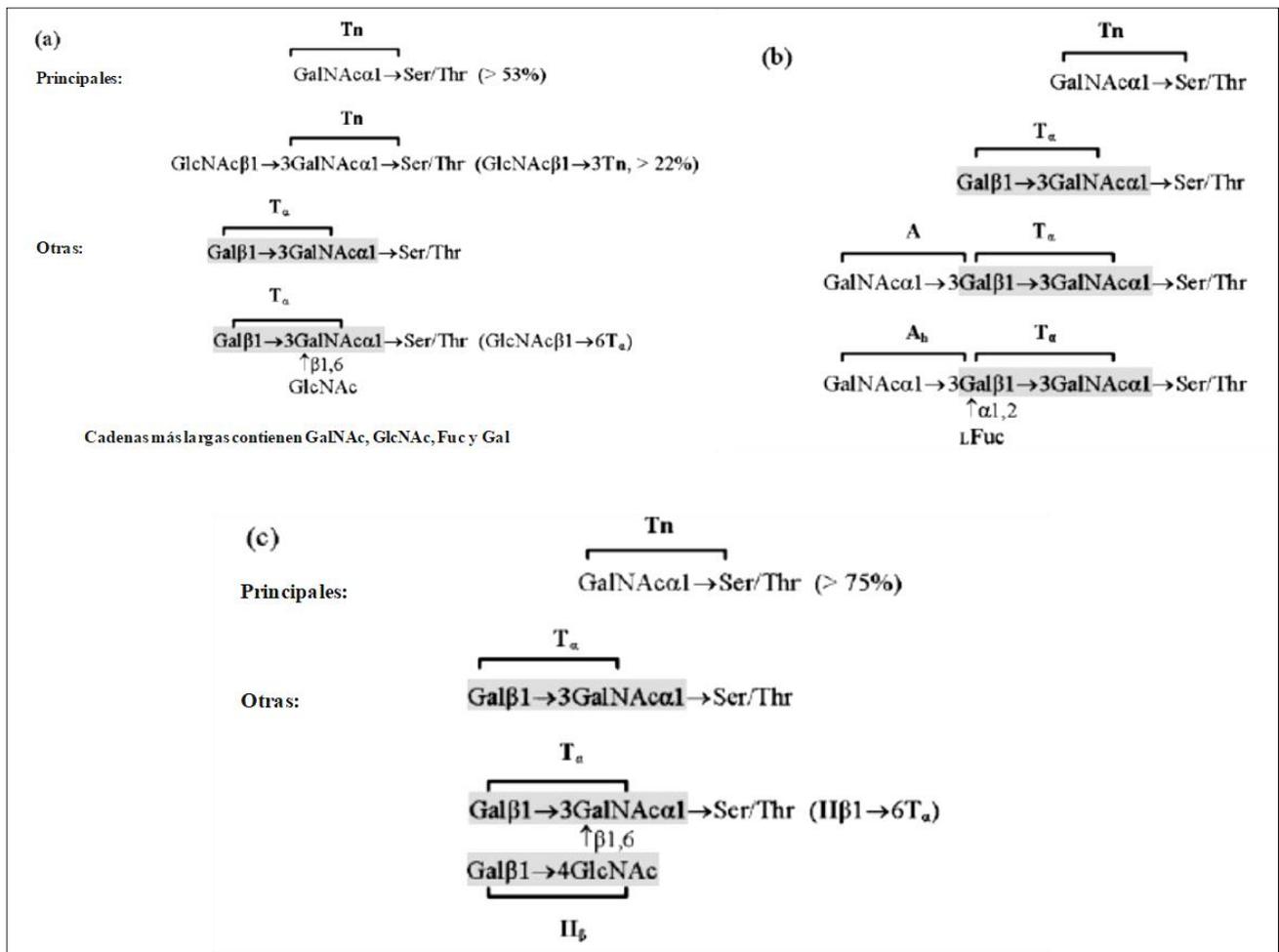
rango con especificidad por la estructura GalNAc unida a través de enlaces  $\alpha$  o  $\beta$ , donde GalNAc puede ser interna o externa; o (ii) solo reconocen  $\alpha$ GalNAc terminal con alguna participación de los azúcares subterminales (Iskratsch *et al*, 2009; Piller *et al*, 1990; Sousa *et al*, 2015; Vega & Pérez G, 2006). Además, al igual que sucede con varios glicotopes, el modo de presentación de GalNAc influye fuertemente en la interacción, *i.e.*, la interacción con determinadas lectinas depende de si la presentación del glicotope es monovalente, o polivalente (multiantenaria o en *clúster*) (Wu *et al*, 2011).

Los resultados nos permitieron observar que la lectina LDG-I reconoce estructuras que exhiben GalNAc expuesta sin importar el tipo de glicano o de enlace (*i.e.*, la N-glicofoma  $\beta$ GN $\beta$ GN de la transferrina remodelada; y los eritrocitos Tn, A y de oveja). Lo que indica que LDG-I puede reconocer glicanos con GalNAc( $\alpha/\beta$ ) externa (incluyendo probablemente el glicotope Tn en las O-glicofomas de la asialoagalactofetina F2), y glicanos con GalNAc en las posiciones tanto terminal como subterminal de manera simultánea como ocurre en el antígeno Forssman GalNAc $\alpha$ 1,3GalNAc( $\alpha/\beta$ )- presente en la superficie de eritrocitos de oveja, aunque no de humanos ni de conejo (Yamamoto & Yamamoto, 2017). Por otro lado, LDG-II reconoció de manera muy débil la O-glicofoma F2 que contienen GalNAc $\alpha$  encriptado por GlcNAc en enlace  $\beta$ 6 y el núcleo Tn, y no se observó interacción de esta lectina con ninguna estructura que tuviera GalNAc( $\alpha/\beta$ ) terminal (Tabla 2-1, Fig. 3-7).

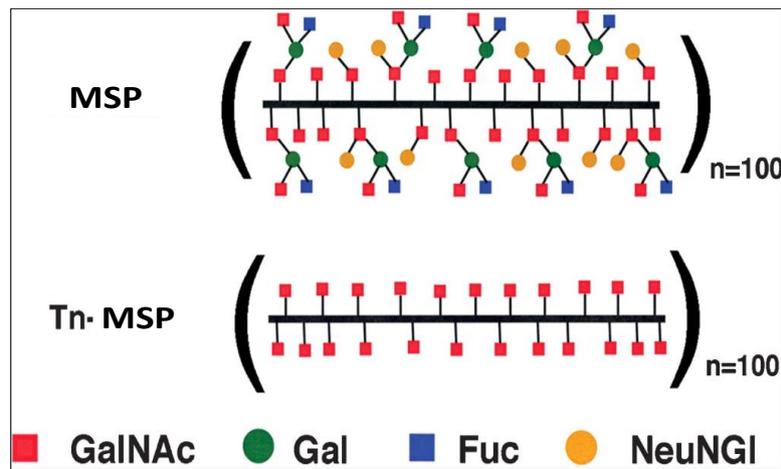
Acerca de la interacción de la lectina LGL-II con GalNAc, Almanza *et al* (2004) observaron que entre los 20 monosacáridos probados, GalNAc fue aquel que inhibió la actividad de la lectina en mayor proporción con una CMI de 12.5 mM; sin embargo, por otro lado, ellos notaron que la asialomucina submaxilar bovina (aMSB) acoplada a *Sepharose* 4B no mostró la habilidad de retener a LGL-II a pesar de la abundancia de GalNAc $\alpha$  unida a los hidroxiaminoácidos de la proteína (O-glicano); aunque, por ELLSA la LGL-II se unía a aMSB y sugirieron que el reconocimiento de GalNAc $\alpha$  requiere que el azúcar se encuentre accesible y en mayor densidad para la unión de la lectina (Almanza *et al*, 2004). En el presente trabajo se pudo inferir que LGL-II interactúa con glicanos que contienen GalNAc pero dicha interacción depende del enlace con el cual GalNAc se une al residuo siguiente; es así como, LGL-II interactuó con estructuras que contienen GalNAc proximal, es decir, el residuo GalNAc más interno en el glicano y más próximo a la proteína (glicotopes T $\alpha$  y Tn en ramificaciones de las O-glicofomas F3 y F4, en eritrocitos T y Tn, y en el determinante H-tipo III) o GalNAc terminal (eritrocitos A), todos con GalNAc en enlace  $\alpha$ , pero su interacción disminuye o es nula con glicanos que contienen GalNAc terminal o reductor en enlace  $\beta$  (glicofoma  $\beta$ Gn $\beta$ Gn y determinante H-tipo IV, respectivamente); y además, no interactúa con el antígeno Forssman que contiene GalNAc $\alpha$  terminal pero también GalNAc $\beta$  subterminal (eritrocitos de oveja) (Tabla 3-3). Por otro lado, en la aproximación bioinformática de acople molecular, la interacción LGL-II con el monosacárido GalNAc mostró menor afinidad que la interacción con los di- y trisacáridos ensayados (Tabla 3-6).

Para lectinas que muestran especificidad única por el glicotope Tn se ha observado que la mejor interacción con este ligando es aquella cuando éste se presenta en forma polivalente, como en el caso de las mucinas (Figura 3-17). Más del 75% de los glicanos en la mucina de la glándula submaxilar ovina (MSO) contienen el núcleo Tn (Fig. 3-17c), y MSO inhibió la lectina B4 de *Vicia villosa*  $1.6 \times 10^3$  veces más que el núcleo GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr monovalente (Wu, A.M., 2004). En contraste, en el acople molecular se observó que la afinidad en la interacción de la lectina LGL-II

con el disacárido Gal $\beta$ 1,4GlcNAc (presente en el glicotipe II $\beta$ ) es mayor que aquella con el monosacárido GalNAc (presente en el núcleo Tn) (Tabla 3-6). De acuerdo con lo anterior y con los resultados de interacción con glicofomas (presente trabajo) y de eritroaglutinación (presente trabajo y Almanza *et al*, 2004); la interacción de LGL-II con la aMSB por ELLSA, puede deberse también a la interacción con otras estructuras, dado que, además de T $\alpha$  y Tn expresados de manera polivalente en dicha macromolécula (Fig. 3-17a), ésta contiene, aunque en menor proporción molar (D'Arcy *et al*, 1989; Savage *et al*, 1991), otros glicotipes que también interactúan con LGL-II, como el determinante H tipo II (uno de los principales ligandos de esta lectina) y el glicotipe II $\beta$  externo (en O-glicanos). Por su parte, la mucina submaxilar porcina (MSP) también posee el grupo histo-sanguíneo A (Fig. 3-17b), a parte del glicotipe Tn sialilado y no sialilado (Figs. 3-17b y 3-18).



**Figura 3-17. Unidades estructurales de carbohidratos presentes en mucinas salivares.** Las mucinas pueden contener los glicotipes Tn, T $\alpha$ , II $\beta$  y algunas secuencias que representan determinantes histo-sanguíneos, dependiendo de la mucina. (a) asialo MSB (Tn, GlcNAc $\beta$ 1,3Tn), (b) asialo MSP (A, Ah, T $\alpha$ , Tn) y (c) asialo MSO (Tn, T $\alpha$ , II $\beta$ ). Las zonas sombreadas son glicotipes reactivos para lectinas T o II $\beta$ -específicas, según el caso; y las zonas enmarcadas con las letras Tn, Ah o A son las zonas con glicotipes reactivos para lectinas Tn, Ah o A-específicas, según el caso. MSB, MSP y MSO: asialomucinas submaxilares bovina, porcina y ovina, respectivamente. La representación estructural de los glicanos es la propuesta por el *Consortium for Functional Glycomics* ([www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org)) y aceptada por IUPAC. Recuperado de Wu *et al*, 2009.

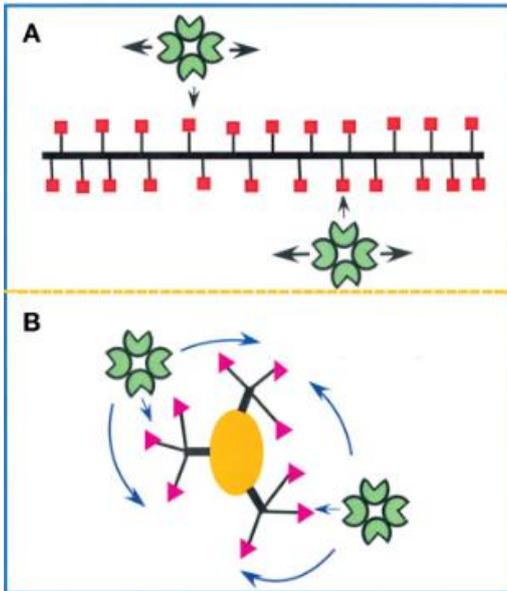


**Fig. 3-18. Representación esquemática de la mucina submaxilar porcina nativa (MSP) y la asialo-MSP solo con residuos  $\alpha$ -GalNAc (Tn-MSP).** La MSP nativa contiene residuos Tn sialilados y no sialilados, así como el grupo histo-sanguíneo A. MSP y Tn-MSP pueden contener 100 repeticiones del dominio del polipéptido en tándem y un total  $\sim$ 2300 cadenas de O-glicanos. Recuperado y adaptado de Dam T.K. & Brewer, 2010.

Las mucinas al ser polivalentes son una buena fuente de carbohidratos para realizar estudios de interacción de lectinas. En un estudio se postuló que el mecanismo de difusión interna es coherente con datos termodinámicos y la dependencia de la afinidad de las lectinas, con respecto a la longitud de las cadenas polipeptídicas y a la densidad de los glicotopes de los glicanos en las mucinas. Por medio de dicho mecanismo, una molécula de lectina "se une y salta" de glicotope a glicotope a lo largo de la molécula de mucina antes de la disociación completa (Fig. 3-19A). La afinidad de la lectina aumenta con el número y el espaciamiento (densidad) de los glicotopes en la mucina (Dam, T.K. & Brewer, 2010). Las interacciones de la lectina LGL-II con la aMSB (Almanza et al, 2004) también podrían ocurrir por este mecanismo. El mecanismo de difusión interna se ha observado en otros sistemas biológicos que incluyen proteínas de unión al ADN, proteínas motoras moleculares que se unen y "caminan" a lo largo de proteínas filamentosas, y proteínas de unión a fosfato que muestran un umbral de unión a proteínas que se someten a la adición de múltiples grupos fosfato (Revisado en Dam T.K. & Brewer 2008).

Se ha observado que las interacciones de lectinas con GalNAc se dan a través de una red de puentes de hidrógeno entre los hidroxilos del carbohidrato y unos pocos aminoácidos hidrofílicos, además, de las interacciones de apilamiento entre GalNAc y residuos de aminoácidos aromáticos localizados en la vecindad del sitio de unión del monosacárido, los cuales complementan y refuerzan la interacción (Poiroux *et al*, 2017). Dependiendo de la lectina, los puentes de hidrógeno pueden ocurrir usualmente con los O3, O4, O6 y el O7 del N-acetil del carbono 2 de GalNAc, además, el número de puentes de hidrógeno puede variar entre 7 y 10, dependiendo de la lectina (Poiroux *et al*, 2017; Rougé *et al*, 2011). Rougé y colaboradores (2011) observaron que el reconocimiento del glicotope Tn por lectinas Tn-específicas no difiere marcadamente del reconocimiento del monosacárido GalNAc. Entre las similitudes de las interacciones de la lectina LGL-II con GalNAc y lectinas Tn-específicas, en el acople molecular se observó interacción con un aminoácido básico y cuatro aminoácidos polares (Arg46, Thr97, Thr 109, Asn117 y Asn118), a través de 8 puentes de hidrógeno en total, incluyendo puentes con

O7 del N-acetil del C2 de GalNAc (con Arg46), e interacción del tipo pi-sigma con un aminoácido aromático (Phe119); así como el O3 de GalNAc estuvo implicado en dos de los puentes de hidrógeno (Fig. 3-16). Entre las diferencias encontradas, se observó que LGL-II forma también otros puentes de hidrógeno a través de H de los C1, C5 y C6 del monosacárido (Tabla 3-7), y no se observaron puentes de hidrógeno con residuos Asp o Gly, como si se observan en otras lectinas que interactúan con GalNAc (Rougé *et al*, 2011).



**Figura 3-19. Representación esquemática de lectinas que se unen a glicoproteínas vía el mecanismo de difusión interna.** A. Interacción de lectinas con glicoproteínas lineales como las mucinas; B) Interacción de lectinas con glicoproteínas globulares como la asialofetina. Recuperado de Dam, T.K. & Brewer, 2010.

En cuanto a las glicoproteínas con GlcNAc $\beta$  terminal, las N-glicofomas GnGn y GnGnF6, y las O-glicofomas en F2 interactuaron con LDG-I, pero la unión con las lectinas tipo II fue muy baja o nula (Fig. 3-7). La interacción de LDG-I con GnGn se debe en mayor proporción a la antena GlcNAc $\beta$ 1,2Man $\alpha$ 1,3 que a GlcNAc $\beta$ 1,2Man $\alpha$ 1,6, como se explica más adelante en la sección *Núcleo GN2Man3*. Por otro lado, se ha reportado que el disacárido presente en la quitina (GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc), encontrado en la porción interna de los carbohidratos en N-glicoproteínas, no inhibió la actividad eritroaglutinante de LDG-I (Ramos *et al*, 1996).

De los tres azúcares que conforman el determinante H-tipo II, GlcNAc fue el que presentó más interacciones con LGL-II a través de cuatro puentes de hidrógeno (Tabla 3-7). En los ensayos con eritrocitos, el monosacárido GlcNAc no inhibió la aglutinación, aún a una concentración tan alta como 100 mM (Almanza *et al*, 2004), pero la presencia de GlcNAc en di- y trisacáridos aporta a la afinidad en las interacciones en comparación a monosacáridos (Tabla 3-6). Las dos observaciones anteriores indican que la interacción de LGL-II con GlcNAc depende del contexto, siendo importante el tipo de enlace que GlcNAc presente con otros azúcares circundantes, y está en concordancia con el hecho de que se presenta alta afinidad cuando Gal y GlcNAc están unidos por un enlace  $\beta$ 1,4.

**Glicotopes que contienen galactosa (Gal).** A pesar de que el monosacárido  $\alpha$ -D-Gal no es un ligando fuerte para LDG-I (Gupta *et al*, 1996; Moreira *et al*, 1983; Ramos *et al*, 1996) ni para LGL-II (Almanza *et al*, 2004), ambas lectinas pudieron interactuar con las glicofomas de asialofetina bovina (F3 y F4) que contienen el glicotope T $\alpha$  expuesto (Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ -) (Fig. 3-7); y además,

mostraron la habilidad de aglutinar eritrocitos T (LDG-I > LGL-II) (Tabla 3-8). Mientras que, LDG-II no mostró interacción con F3 ni con F4, sin embargo, su actividad hacia eritrocitos T fue aquella que obtuvo el título específico más alto (Fig. 3-7; Tabla 2-1, respectivamente). Es decir, las tres lectinas ensayadas pudieron reconocer estructuras que presentan el glicotipe T $\alpha$ ; sin embargo, el reconocimiento por LDG-II puede estar influenciado por el modo de presentación del glicotipe como ocurre con otras lectinas, en donde la identificación de la especificidad diferencial depende de si el glicotipe se presenta en forma monovalente, polivalente o en *clusters*, además de encontrarse expuesto o encriptado, obteniéndose una contribución diferencial del mismo glicotipe en diferentes presentaciones (Wu *et al*, 2009), y lo anterior puede relacionarse también con el método al utilizar glicanos sobre determinada superficie o en solución (Kamili *et al*, 2016; Leppänen *et al*, 2005; Nasir *et al*, 2017).

Teniendo en cuenta que la asialofetina bovina (glicofomas F3 y F4, usadas en el *dot blot*) contiene 5 sitios de O-glicosilación espaciados (Uniprot; Windwarder & Altmann, 2014), mientras que en la superficie de los eritrocitos T, cada molécula de asialoglicoforina A contiene 16 O-glicanos y siete de ellos se presentan en grupo o *cluster* sobre 3 o 4 residuos de Ser/Thr adyacentes (Aoki, 2017; Pisano *et al*, 1993; Podbielska *et al*, 2004; Uniprot), se puede inferir que las lectinas LDG-I y LGL-II reconocen el disacárido T monovalente o en grupos, mientras que LDG-II lo reconoce solo en *cluster*. Eso también se ha observado en otras lectinas T-específicas de la familia Fabacea como la lectina de *Vicia graminea*, la cual requiere un receptor que contenga al menos dos *clusters* del disacárido Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$  unidos a residuos adyacentes Ser/Thr, e interactúa con glicoforinas pero no con la glicoproteína anticongelante del pez antártico *Trematomus borchgrevinki*, la cual tiene cadenas de múltiples Gal $\beta$ 1,3GalNAc localizadas sobre cada tercer residuo de aminoácido (Duk *et al*, 1982); la lectina de *Amaranthus caudatus* (ACL) reconoce el glicotipe T $\alpha$  monomérico o polivalente, y la aglutinina de *Arachis hypogea* (PNA) reconoce una combinación de los anómeros  $\alpha/\beta$  del disacárido T y sus complejos polivalentes (Wu *et al*, 2008).

Las lectinas con especificidad por el glicotipe T también pueden diferir entre sí en su unión a los monosacáridos. Por ejemplo, ACL y PNA comparten la especificidad por el glicotipe T $\alpha$  pero difieren en su unión a los monosacáridos constituyentes así: GalNAc >> Gal (inactiva) para ACL, y Gal >> GalNAc para PNA (Wu *et al*, 2011); en este sentido, el comportamiento de la lectina LGL-II es, GalNAc (12.5 mM) >> Gal (100 mM) (Almanza *et al*, 2004). En el caso de LDG-I, la actividad aglutinante no es inhibida por el monosacárido Gal incluso a 100 mM mientras que los monosacáridos con mayor poder inhibitorio de la actividad aglutinante de esta lectina sobre eritrocitos O son Man (2.1 mM) y su derivado Me- $\alpha$ Man (0.5 mM) (Gupta *et al*, 1996; Moreira *et al*, 1983; Ramos *et al*, 1996). También, la actividad LDG-I sobre eritrocitos O puede ser inhibida por GlcNAc (16.7 mM) (Ramos *et al*, 1996), mientras que este monosacárido no inhibe la actividad de LGL-II sobre ese mismo tipo de eritrocitos ni la interacción de la lectina tipo II con el determinante H-tipo II (Almanza *et al*, 2004). Por su parte, la actividad de LDG-II fue la más específica sobre el glicotipe T en *cluster*, y no es inhibida por monosacáridos, pero sí por algunos di- o trisacáridos (Melgarejo *et al*, 2005).

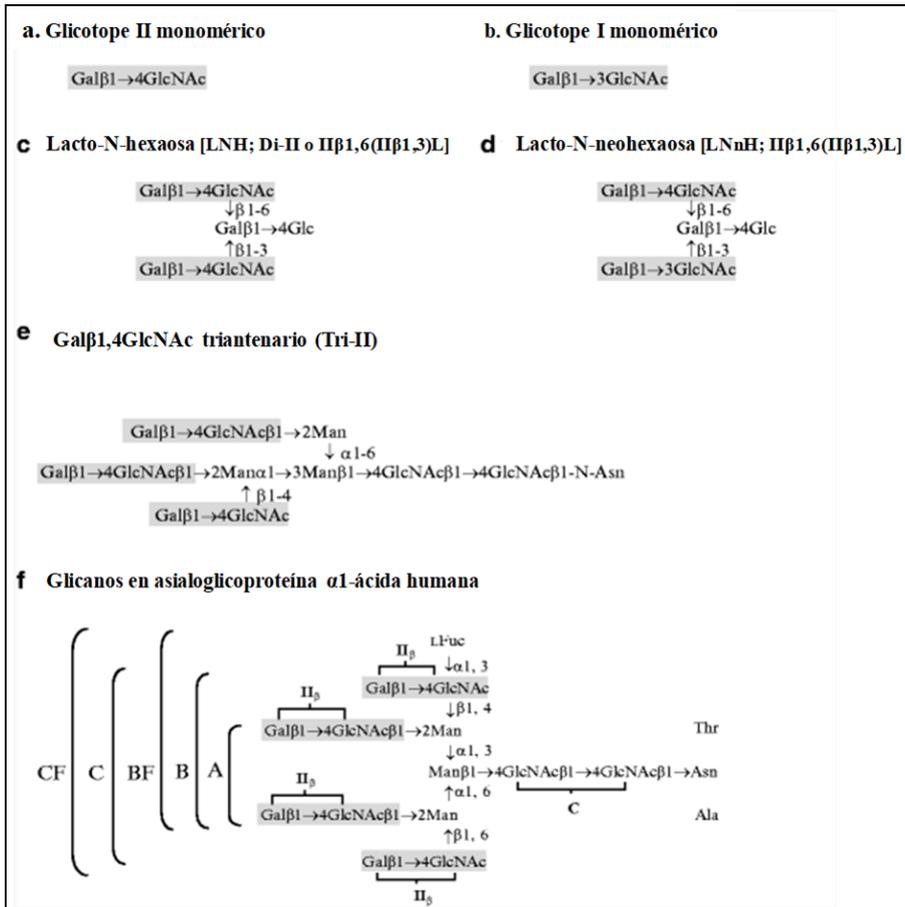
Algunas lectinas vegetales pueden interactuar tanto con el glicotipe T $\alpha$  como con el núcleo Tn; ese es el caso de la aglutinina Morniga G de *Morus nigra*, la cual prefiere dichos ligandos en presentación polivalente o en *cluster* (Singh *et al*, 2007). En el presente trabajo se observó que las lectinas LDG-I y LGL-II pueden reconocer estructuras que contienen ambos glicotipes (LDG-I >

LGL-II), mientras que, la lectina LDG-II reconoció específicamente el glicotopo T en *cluster* y no interactuó con Tn. Así mismo, otras lectinas T-específicas interactúan poco o nada con Tn, como la lectina ACL que puede ser inhibida por el monosacárido GalNAc pero las formas polivalentes de Tn son inhibidores muy débiles; y para la lectina del maní (PNA), el ligando Tn, en sus formas monomérica o polivalente, es inactivo (Wu *et al*, 2011).

Otros de los glicotopes galactosidados existentes en la naturaleza son el antígeno Galili o antígeno  $\alpha$ Gal (Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ ); y los glicotopes I $\beta$ /II $\beta$  representados por el disacárido N-acetilactosamina LacNAc (Gal $\beta$ 1,3/4GlcNAc) (Fig. 3-20). Ninguna de las tres lectinas ensayadas en el presente trabajo mostró interacción con las N-glicofomas  $\alpha$ Gal $\alpha$ Gal y GalGal las cuales contienen Gal( $\alpha$ / $\beta$ ) expuesta, y contienen el antígeno Galili o el glicotopo II $\beta$  expuestos en N-glicanos, respectivamente. Lo anterior está de acuerdo con el hecho de que el glicano presente en la glicofoma GalGal no inhibió la actividad LDG-I incluso a una concentración de 1.6 mM (Gupta *et al*, 1996); el título específico alto obtenido para la actividad LDG-I sobre eritrocitos de cerdo usados en el presente estudio y sobre eritrocitos de conejo observado previamente (Pérez G, 1998), podría no deberse a la presencia del glicotopo  $\alpha$ Gal sino a otros glicotopes como se explicará más adelante.

Por otro lado, el glicotopo II $\beta$  en la fetuina nativa (F5) y en los glicanos de la superficie de algunos de los eritrocitos probados (Tablas 2-1 y 3-3; Gupta *et al*, 1996; Moreira *et al*, 1983) no es compatible con la unión de LDG-I, aunque la interacción observada probablemente se debe a que en dichas estructuras este glicotopo este encriptado. La interacción de LGL-II con estructuras que contenían el glicotopo II $\beta$  expuesto dependió del tipo de glicano, *i.e.*, LGL-II interactuó con la glicofoma F4 que posee N/Oglicanos con el glicotopo II $\beta$  expuesto en presentación monovalente (en tres O-glicanos) y divalente (en un N-glicano) o trivalente (en dos N-glicanos), pero no interactuó con la N-glicofoma GalGal que contiene di-II $\beta$  expuesto; indicando preferencia por II $\beta$  expuesto en O-glicanos. Se ha sugerido el mecanismo de difusión interna para las afinidades aumentadas de las galectinas LGALS-1, -2, -3, -4, -5 y -7, cuando se unen a la asialofetuina (Dam T.K *et al*. 2005b). La asialofetuina representa una glicoproteína globular multivalente que posee varias unidades de LacNAc en sus N-glicanos di- y triantenarios, así como en una de las antenas de sus O-glicanos (glicofomas F4 en Fig. 3-4). Las interacciones de la lectina LGL-II con la asialofetuina (presente trabajo; Fig. 3-7) también podrían ocurrir por este mecanismo (Fig. 3-19B).

La interacción de LGL-II con glicofomas que poseen II $\beta$  encriptado dependió del azúcar terminal, interactuando con eritrocitos O y otros determinantes tipo H (Fuc $\alpha$ 1,2 externo), mientras que la interacción disminuyó o no hubo interacción con glicanos sialilados (transferrina y fetuina nativas, eritrocitos de caballo y perro) o con glicanos  $\alpha$ -galactosidados (N-glicofoma  $\alpha$ Gal $\alpha$ Gal, eritrocitos B y de conejo, determinantes Le<sup>a</sup>). La LDG-II interactúa con estructuras que poseen el glicotopo II $\beta$  encriptado (glicanos sialilados en enlace  $\alpha$ 2,3 presentes en eritrocitos de cerdo y en glicanos de F5; y glicanos fucosilados en enlace  $\alpha$ 1,2 como el determinante H-tipo II). La interacción con carbohidratos sialilados, galactosidados o fucosilados también se ha visto influida en algunas lectinas mamíferas, donde la presencia o ausencia de esos residuos terminales sobre el mismo glicotopo puede aumentar o disminuir la interacción, dependiendo de la lectina (Rapoport *et al*, 2008; Stowell *et al*, 2008). *In silico* se observaron algunas características que tienen en común las interacciones de LGL-II y de la galectina LGALS3 con LacNAc, tales como la intervención de átomos en los hidroxilos 6-OH de galactosa y 3-OH de GlcNAc, y que además un residuo de Trp es esencial para el contacto con galactosa vía interacciones C-H (Figura 3-15).



**Figura 3-20. Estructuras con glicotopos LacNAc [Galβ1,3/4GlcNAc (Iβ/IIβ)] monoméricos, di-antenarios, tri-antenarios y multivalentes.** (a) LacNAc II monomérico; (b) LacNAc I monomérico; (c) Lacto-N-neohexaosa [LNnH; IIβ1,6(Iβ1,3)L]; (d) Lacto-N-hexaosa [LNH; Di-II o IIβ1,6(IIβ1,3)L]; (e) LacNAc II triantenaria (Tri-II), como en dos N-glicanos presentes en la asialofetina (F4) usada en el presente trabajo; (f) Asialo glicoproteína α1-ácida humana presentando estructuras de las clases A (biantenaria), B (triantenaria sin fucosa), BF (triantenaria con un residuo de fucosa), C (tetraantenaria sin fucosa) y CF (tetraantenaria con un residuo de fucosa). La letra C más pequeña, al lado derecho de la estructura de la glicoproteína representa el disacárido de quitina. Las áreas sombreadas (I/II) en a-f son glicotopos reactivos propuestos para las lectinas LacNAc I/II-específicas. La representación estructural de los glicanos es la propuesta por el Consortium for Functional Glycomics ([www.functionalglycomics.org](http://www.functionalglycomics.org)) y aceptada por IUPAC. Recuperado de Wu *et al*, 2011.

**Acido siálico (Sia).** En las membranas celulares, las glicoproteínas y glicolípidos pueden estar sialilados; y varias lectinas de plantas y animales pueden reconocerlos (Ahmad *et al*, 2012; Haseley *et al*, 1999; Schauer *et al*, 1997; Suzuki *et al*, 1985; Thorpe *et al*, 1984; Varki *et al*, 2012; Zou *et al*, 2011). Las membranas celulares pueden contener cerca de  $10^6$  glicanos unidos a residuos de Asn y Ser/Thr, con una concentración de ácido siálico terminal de aproximadamente 100 mM (Cummings & Pierce, 2014). Por otro lado, los contenidos de ácido siálico (nmol/mL) han sido reportados para eritrocitos de diferentes especies, así: caballo 1130; rata 910, ratón 970; humanos 450-700; oveja 360 y pollo 200; en eritrocitos de pollo entre el 10-20% del ácido siálico puede presentarse como 9-OAc-NeuAc (Rogers *et al*, 1986). Los resultados de interacción con las diferentes glicofomas, mostraron que LDG-I y LDG-II reconocen la fetuina no tratada (F5), pero no

la transferrina nativa, sugiriendo que el ácido siálico (Neu5Ac) en enlace  $\alpha 2,3$  (encontrado en fetuina pero no en transferrina) es un ligando de las lectinas de *D. grandiflora*. El mismo comportamiento ha sido observado para la lectina de *Triticum vulgare* (WGA) con respecto a éstas dos glicoproteínas (Iskratsch *et al*, 2009), y en concordancia con los resultados de esta tesis, datos previos indicaron no inhibición de LDG-I en presencia de apotransferrina (Ramos *et al*, 1996). El monosacárido ácido N-acetilneuramínico inhibe la actividad LDG-I sobre eritrocitos de conejo a una concentración de 8.3 mM, que corresponde a la mitad y a cuatro veces la CMI de Glc y Man, respectivamente (Ramos *et al*, 1996). LDG-I aglutina eritrocitos de caballo, perro y conejo mostrando títulos específicos mucho más altos en comparación con aquellos para eritrocitos humanos, y entre todos los eritrocitos ensayados, esta lectina aglutinó eritrocitos de caballo con el título más alto (Pérez G, 1998), lo que podría indicar una preferencia por ácido glicolilneuramínico (Neu5Gc); dado que contienen altas cantidades de ácido en la forma Neu5Gc $\alpha 2,3$ , mientras que los eritrocitos de perro contienen NeuAc $\alpha 2,3$ Gal (Varki *et al*, 2012). LDG-I también aglutinó eritrocitos de cerdo (presente trabajo), los cuales cuentan en su superficie con glicoproteínas sialiladas (Tan *et al*, 2010), además de gangliosidos expresando NeuAc $\alpha 2,3/6$  y NeuGc $\alpha 2,3/6$  terminales (Suzuki *et al*, 1985; Thorpe *et al*, 1984).

A partir de los resultados del presente trabajo y de los títulos específicos de aglutinación de eritrocitos de algunos animales para LDG-I obtenidos por Pérez, G., (1998), se puede concluir que la interacción de LDG-I y LDG-II con la fetuina nativa y con los eritrocitos de cerdo puede ser debida al reconocimiento de glicoconjugados que contengan ácido siálico terminal en enlace  $\alpha 2,3$  y no a la presencia del antígeno Galilli (presente en eritrocitos de cerdo y conejo). Por otro lado, LGL-II aglutina eritrocitos de rata en menor grado que los eritrocitos humanos O y B (Almanza *et al*, 2004 y presente trabajo). La aglutinación de eritrocitos murinos ha sido relacionada con la presencia de 9-OAc-NeuAc (Ito *et al*, 1997; Rogers *et al*, 1986; Suzuki *et al*, 1985), y se ha observado que algunas lectinas exhiben preferencia de unión por este tipo de ácido siálico, *e.g.*, una lectina de sangre de cangrejo (revisado en Rogers *et al*, 1986). Como se mencionó previamente, la LGL-II puede reconocer el glicotipe I $\beta$  externo o interno, entonces, su interacción con la glicofoma F5 y con los eritrocitos de rata puede ser debida al reconocimiento de LacNAc interna, pero la presencia de ácidos siálicos externos en esas estructuras disminuye su unión. En el acople molecular se observó que los valores de afinidad de LGL-II por di- o trisacáridos sialilados en enlace  $\alpha 2,3$  es muy similar, y que la interacción es más específica con el determinante H tipo II que con los carbohidratos sialilados (Tabla 3-6).

Por otra parte, la presencia de Neu5Ac terminal en enlace  $\alpha 2,6$  (*eg.*, transferrina nativa) inhibió completamente el reconocimiento de las tres lectinas de la tribu Diocleae estudiadas en este trabajo, de manera similar a lo que ocurre con la galectina LGALS1 (Rapoport, *et al*, 2008).

**Glicotopes fucosilados.** El núcleo  $\alpha 1,6$ -Fuc (Fuc $\alpha 1,6$ GlcNAc) redujo la interacción de LDG-I con N-glicanos, como se observa al comparar los resultados de interacción con las glicofomas GnGnF6 y GnGn (Fig. 3-7); este mismo comportamiento se ha observado en la interacción de la lectina de *Ricinus communis* RCA-I con esas dos glicofomas; mientras que para la lectina de *Lens culinaris* (LCA), la presencia de  $\alpha 1,6$ -Fuc promueve significativamente la interacción (Iskratsch *et al*, 2009).

La sustancia H (Fuc $\alpha 1,2$ Gal-R, donde R = cadenas I $\beta$ /II $\beta$ , *i.e.*, 3/4GlcNAc $\beta$ , o cadenas T $\beta$ , *i.e.*, 3/4GalNAc $\beta$ ) puede encontrarse en glicoproteínas y en glicolípidos (Nasir *et al*, 2017; Ogawa &

Galili, 2006; Ravn & Dabelsteen, 2000). Los glicanos que cuentan con la sustancia H expuesta, como en los determinantes histo-sanguíneos tipo H (Tabla 1-6), fueron reconocidos por LGL-II y LDG-II en glicoproteínas, mostrándose una mayor afinidad para ambas lectinas cuando la fucosa se une al glicotopo subterminal  $\text{II}\beta$ , es decir, como en el trisacárido determinante del grupo H-tipo II, ( $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta\text{-O-R}$ ) (Almanza *et al*, 2004, Melgarejo *et al*, 2005); y en el acople molecular *in silico*, la interacción LGL-II con el H-tipo II mostró mayor afinidad que su interacción con los otros cinco carbohidratos ensayados, incluyendo el disacárido  $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}$  (Tabla 3-6). Es de notar que, la concentración CMA de LGL-II hacia eritrocitos O fue de 1.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que en el rango de concentraciones de LDG-II usadas en el presente trabajo (0.1 – 233  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), no se observó actividad aglutinante de LDG-II hacia este tipo de eritrocitos. Además, aunque ambas lectinas tipo II muestran preferencia por el determinante H-tipo II sobre los otros grupos tipo H, la unión de LGL-II al glicoconjugado H-tipo II-BSA fue mucho más específica que aquella de LDG-II (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005).

También, hay diferencias en las preferencias de unión de LGL-II y LDG-II hacia glicanos que cuentan con  $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}$  y a la vez con ramificaciones de los grupos histo-sanguíneos A y B; éstos previnieron el reconocimiento por LDG-II pero no por LGL-II (Tabla 3-8). Por otro lado, la CMA de LDG-I sobre eritrocitos O fue entre 2-5 veces mayor a la necesaria para aglutinar los demás tipos de eritrocitos ensayados (excepto los de oveja en los que se necesitó la misma concentración que para los de tipo O) (Tabla 2-1 del presente trabajo, y Pérez, G., 1998).

En cuanto a los determinantes histo-sanguíneos Lewis, la presencia del núcleo  $\alpha 1,3\text{-Fuc}$  disminuyó la interacción de LGL-II y de LDG-II con el determinante Lewis  $\text{Le}^y$  [ $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}\beta 1,4(\text{Fuc}\alpha 1,3)\text{GlcNAc}\beta\text{-O-R}$ ], en comparación con su interacción con el determinante H-tipo II (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005); dicha disminución también se ha observado con otras lectinas H-tipo II-específicas (en relación a otros determinantes H y a los grupos  $\text{Le}^a$  y  $\text{Le}^y$ ) como LDL-II de *Dioclea lehmanni*, CE-II de *Canavalia ensiformis* (Melgarejo *et al*, 2005) y LCR-II de *Cymbosema roseum* (Dam *et al*, 2011). En otros ensayos una inhibición de hasta el 42.8% de la interacción de LGL-II con el determinante H-tipo II se evidenció usando saliva de secretor (1:10) con fenotipo  $\text{OLe}^b$ , la cual contiene el determinante  $\text{Le}^b$  que posee el núcleo  $\alpha 1,4\text{-Fuc}$  [ $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}\beta 1,3(\text{Fuc}\alpha 1,4)\text{GlcNAc}\beta\text{-O-R}$ ], pero no se observó la inhibición usando saliva de secretor (1:10) con fenotipo  $\text{OLe}^a$ , la cual contiene el determinante  $\text{Le}^a$  que también posee el núcleo  $\alpha 1,4\text{-Fuc}$  [ $\text{Gal}\alpha 1,3(\text{Fuc}\alpha 1,4)\text{GlcNAc}\beta\text{-O-R}$ ] (Almanza *et al*, 2004); este mismo comportamiento fue descrito para LCR-II (Dam *et al*, 2011).

La falta de interacción de LGL-II y LDG-II con  $\text{Le}^a$  probablemente es debido a que este determinante posee el residuo galactosa expuesto en enlace  $\alpha 1,3$ , recordemos que en los ensayos con glicofomas estas lectinas no interactuaron con glicanos que contienen Gal expuesta en enlace  $\alpha$  (Fig. 3-7). En estudios previos se determinó que las lectinas presentaron actividad diferencial en el reconocimiento de los demás determinantes tipo H; entre LGL-II, LDL-II, LDG-II y CE-II, la lectina LGL-II mostró la interacción más específica con el grupo H-tipo II, con  $\text{Abs}_{415} \approx 1.8$  usando 70 ng de lectina; mientras que las interacciones de LDL-II, LDG-II y CE-II mostraron  $\text{Abs}_{415} \approx 1.2$ ; 0.85; y 0.4 (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005).

Los resultados *in silico* de la interacción de LGL-II con diferentes carbohidratos (Tabla 3-6) concuerdan con resultados experimentales en los que se demostró que el determinante H-tipo II es

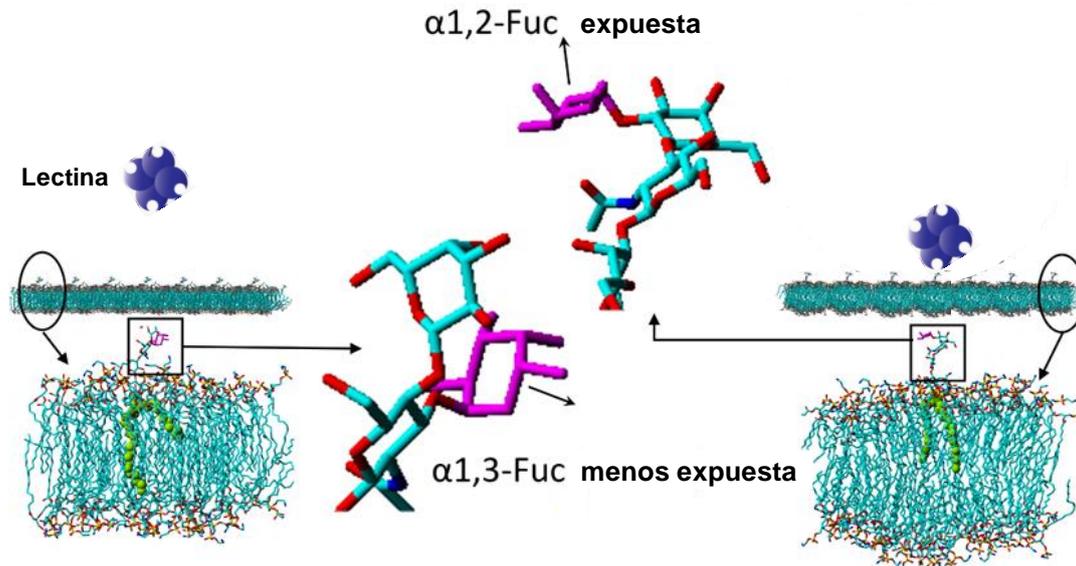
reconocido por LGL-II en mayor grado que los demás determinantes tipo H y Lewis, y que esta lectina aglutina eritrocitos O con mayor especificidad que eritrocitos de otro perfil glicómico (Almanza *et al*, 2004; y presente trabajo). Las interacciones con el disacárido más expuesto (Fuc $\alpha$ 1,2Gal) o encriptado (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) en el determinante H tipo II, mostraron una disminución en la afinidad en comparación con el determinante trisacárido completo, lo cual indica el requerimiento de la estructura formada por los tres residuos de azúcar (trisacárido) para una mayor interacción de la lectina. De manera similar, Dam *et al* (2011) observaron que la constante de afinidad para la interacción de la lectina de *C. roseum* (LCR-II) con el trisacárido H-tipo II es mayor que la obtenida para los disacáridos Fuc $\alpha$ 1,2Gal y Gal $\beta$ 1,4GlcNAc. Las energías de afinidad corroboran los resultados experimentales obtenidos, donde la LGL-II interactuó con glicoproteínas con glicanos que tienen el glicotope II $\beta$  (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) encriptado por Fuc $\alpha$ 1,2 pero con disminución en la interacción de glicanos con II $\beta$  sialilado (Tabla 3-6).

El segundo determinante fucosilado de tipo H con el cual LGL-II y LDL-II muestran mayor interacción, después del H-tipo II, fue con el determinante H-tipo III (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005), el cual posee Fuc $\alpha$ 1,2 expuesta, el glicotope T $\alpha$  encriptado y, al igual que el H-tipo II, carece de núcleos Fuc $\alpha$ 1,3/4; y el segundo ligando para LDG-II y CE-II, entre dichos determinantes, fue el grupo H-tipo I (Melgarejo *et al*, 2005), con Fuc $\alpha$ 1,2 expuesta, el glicotope subterminal I $\beta$ , e igualmente sin núcleos Fuc $\alpha$ 1,3/4. La actividad eritroaglutinante de LCR-II fue inhibida por los determinantes H-tipo I, H-tipo II y Le<sup>b</sup>, aunque la concentración mínima inhibitoria (CMI) del H-tipo II (18  $\mu$ M) fue 25 y 277 veces menor que la CMI de H-tipo I y Le<sup>b</sup>, respectivamente; y los grupos Le<sup>a</sup>, Le<sup>y</sup> y Le<sup>x</sup> no inhibieron la actividad de LCR-II, usando concentraciones de hasta 15-18 mM (Dam *et al*, 2011).

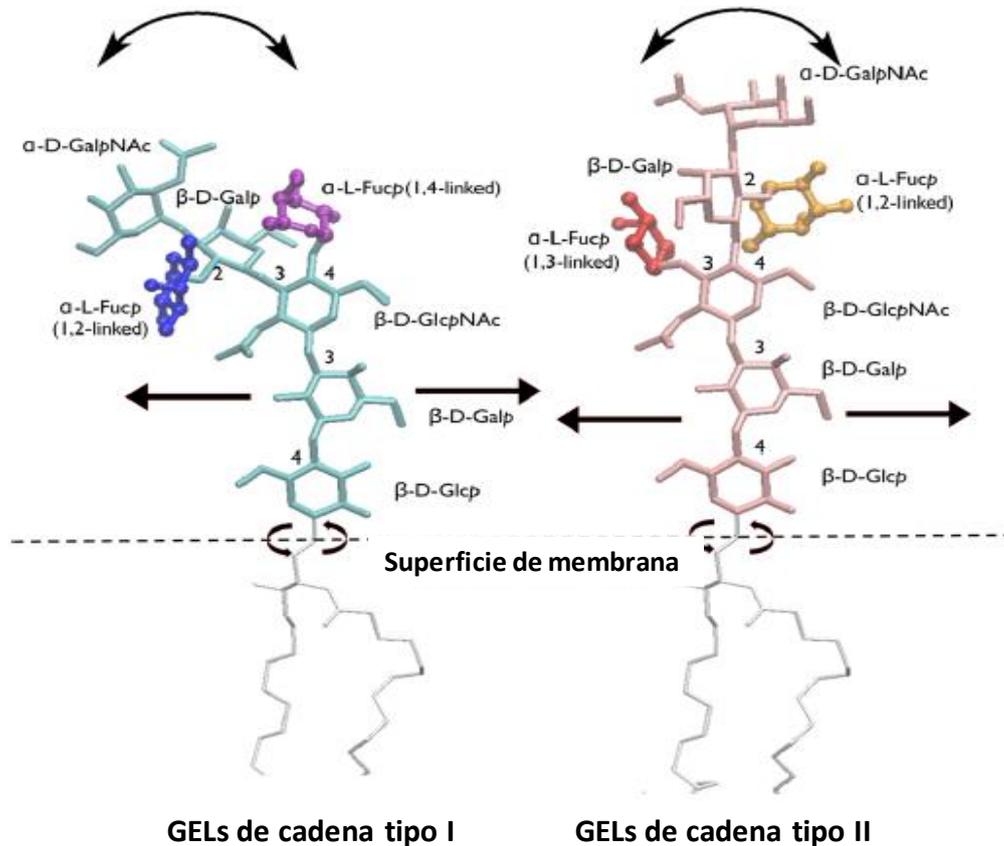
La preferencia de las lectinas tipo II por glicanos fucosilados que presentan Fuc $\alpha$ 1,2 expuesta, en comparación a los glicanos fucosilados que presentan los núcleos  $\alpha$ 1,3/4-Fuc (Almanza *et al*, 2004; Dam *et al*, 2011; Melgarejo *et al*, 2005) o glicanos con el núcleo  $\alpha$ 1,6-Fuc (Fig. 3-7), puede deberse a la posición de los enlaces entre los residuos Fuc y Gal/GlcNAc, y también a que los núcleos  $\alpha$ 1,3/4/6-Fuc están menos expuestos (antenas más cortas) que la sustancia H (Fuc $\alpha$ 1,2Gal) en algunos glicoconjugados (Fig. 3-21). También, en la interacción de las lectinas tipo II con los neoglicoconjugados determinantes H tipo III/IV - ASB, se observó que el tipo de enlace del residuo GalNAc proximal con la proteína, puede influir en la interacción, por ejemplo, la lectina LDG-II interactuó con el determinante H-tipo IV > H-tipo III (GalNAc proximal en enlace  $\beta$  > GalNAc proximal en enlace  $\alpha$ ), mientras que LGL-II prefirió GalNAc proximal en enlace  $\alpha$ , como ya se discutió arriba en la sección de la interacción de las lectinas con glicotopes HexNAc.

Estudios de microscopía de fluorescencia de reflexión interna y simulaciones de dinámica molecular (DM) en membrana, usando glicoesfingolípidos (GELs) con los determinantes que tienen residuos de  $\alpha$ -L fucosa, mostraron que la accesibilidad para el reconocimiento de las lectinas depende de la flexibilidad conformacional de los enlaces glicosídicos, la orientación y la exposición de los residuos de los carbohidratos (determinantes). Con el modelo de los glicolípidos embebidos en una membrana fosfolipídica usando GELs con ramificaciones Fuc $\alpha$ 1,3/4, encontraron que en aquellos de cadena precursora I $\beta$  (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ ), los residuos 1,2 $\alpha$ -L-Fuc y 1,4 $\alpha$ -L-Fuc se muestran más expuestos, y que en los GELs de cadena precursora II $\beta$  (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ ), la accesibilidad al residuo 1,3 $\alpha$ -L-Fuc es restringida (Figs. 3-20; 3-21); lo que disminuye la interacción, por ejemplo como sucede con la lectina Fucosa específica de norovirus (Nasir *et al*, 2017). Las lectinas Diocleae tipo II muestran preferencia por glicanos con Fuc $\alpha$ 1,2 expuesta, y de acuerdo con los

resultados las interacciones de LGL-II, LCR-II y de la lectina Fuc-específica del norovirus, se ven disminuidas con glicanos que poseen el núcleo  $\alpha 1,3$ -Fuc menos expuesto.



**Figura 3-20. Esquema de interacción de lectinas con glicosfingolípidos que presentan Fuc $\alpha 1,2$  expuesta o el núcleo  $\alpha 1,3$ -Fuc menos expuesto.** Las interacciones de las lectinas tipo II de la tribu Diocleae, LGL-II y LCR-II, y de la lectina Fuc-específica del norovirus se ven disminuidas con glicanos que poseen el núcleo  $\alpha 1,3$ -Fuc menos expuesto, en comparación a la interacción con glicanos con Fuc $\alpha 1,2$  expuesta. Adaptado de Nasir *et al*, 2017.



**Figura 3-21. Estructuras de grupos histo-sanguíneos presentes en glicosfingolípidos (GELs) de membrana de células epiteliales.** GELs con cadenas tipo I ( $ALe^b$ , izquierda) y tipo II ( $ALe^y$ , derecha). Residuos de  $\alpha$ -L-Fuc representados en diferentes colores según el tipo de GELs y de enlace. Línea punteada representa el plano imaginario de la membrana pasando por el átomo de oxígeno glicosídico del C1 del residuo de Glc. La rotación de los GELs embebidos en membranas se indica con flechas en círculo. Las flechas rectas indican el movimiento en el plano x-z, y las flechas dobladas el movimiento en los ángulos internos de torsión de los enlaces glicosídicos que brindan el espacio conformacional de los glicanos. La cadena completa del carbohidrato tiene grados limitados de libertad pero no se comporta como un cuerpo rígido. No hay correlación entre la orientación del residuo más interno del carbohidrato con la orientación del residuo más externo; es decir, la orientación de la Glc proximal que está parcialmente expuesta al solvente y no se extiende más allá de la capa polar de la membrana, y que además se une a la ceramida a través del oxígeno glicosídico, no se correlacionó con la orientación de la  $\alpha$ -L-Fuc terminal. Recuperado de Nasir *et al*, 2017.

**Núcleo Man3GlcNAc2 (MM).** La LDG-I reconoció la glicofoma MM ( $Man\alpha 1,6(Man\alpha 1,3)Man\beta 1,4GlcNAc\beta 1,4GlcNAc\beta 1-Asn$ ) (Fig. 3-7). Esta estructura contiene el motivo  $Man\alpha 1,3(Man\alpha 1,6)Man$ , el cual es un ligando fuerte reconocido por LDG-I ( $K_a = 122 \times 10^{-4} M^{-1}$ ; inhibición completa con  $12 \mu M$  del trimanósido) (Gupta *et al*, 1996), y por otras lectinas tipo I de la tribu *Diocleae*, incluyendo aquellas de especies de *Canavalia* y *Cratylia* (Dam *et al*, 1998). En el presente trabajo se ha demostrado que LDG-I es sensible a la naturaleza del enlace o de los residuos de carbohidratos adyacentes a la estructura del trimanósido en siete N-glicofomas; con 4 de ellas se observó interacción mientras que con las otras tres no (Fig. 3-7). Por medio de titulación por microcalorimetría isotérmica (TCI) se observó el efecto de multivalencia para la interacción con LDG-I, usando carbohidratos análogos di-, tri- y tetravalentes que contienen el glicotopo trimanósido en posición terminal (Dam *et al*, 2000). Los resultados mostraron aumentos en los

valores de  $K_a$  de los carbohidratos multivalentes en relación con los análogos monovalentes, con valores desde  $122 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$  para el trimanósido monovalente hasta  $6500 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$  para un análogo tetravalente. También se ha sugerido el mecanismo de difusión interna (Fig. 3.8) para las altas afinidades de LDG-I y ConA por N-glicanos bi-, tri- y tetraantenarios que poseen glicotopes de manosa terminal (Dam T.K, *et al.* 2000). Por otro lado, las actividades LDG-II y LGL-II no son inhibidas por Man (Almanza *et al.*, 2004; Melgarejo *et al.*, 2005) y en todo caso, estas lectinas tipo II no interactuaron con glicoformas que contenían solamente N-glicanos (Fig. 3-7).

**Núcleo GN2Man3.** Los N-glicanos biantenarios complejos pueden presentar la región  $\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,3(\text{GlcNAc}\beta 1,2\text{Man}\alpha 1,6)\text{Man}$ , y las actividades relativas de unión de las lectinas *Diocleae* por éste núcleo, a su vez, se relacionan directamente con su efecto sobre la liberación de histamina por mastocitos peritoneales de rata (Dam *et al.*, 1998). Gn2Man3 se encuentra expuesta o encriptada en 6 de las 7 N-glicoformas usadas en el presente trabajo, y su reconocimiento por LDG-I dependió de los residuos de carbohidratos subyacentes (Figs. 3-7); las glicoformas GnGn y GnGnF6 con  $\text{GlcNAc}\beta 1$  terminal fueron reconocidas por esta lectina, mientras que las formas galactosiladas no lo fueron, lo cual concuerda con el trabajo de Gupta *et al.*, (1996), en el cual se observó inhibición de LDG-I usando el pentasacárido GN2Man3 (400  $\mu\text{M}$ ), mientras que la glicoforma biantenaria GalGal no inhibió dicha actividad (usando hasta 1.6 mM).

Experimentos de inhibición de eritroaglutinación y de titulación por microcalorimetría isotérmica (TCI) demostraron una diferencia sustancial en las afinidades relativas de distintas lectinas *Diocleae* por GN2Man3, y un CMI en un rango de 6-790 mM, dependiendo de la lectina (Dam *et al.*, 1998, 2000). Por ejemplo, GN2Man3 a 400  $\mu\text{M}$  inhibió la actividad aglutinante de LDG-I hacia eritrocitos de conejo, mientras que la inhibición de la lectina tipo I de *Canavalia ensiformis* (ConA) se obtuvo con 6  $\mu\text{M}$  de éste oligosacárido. Igualmente, LDG-I mostró una afinidad reducida por GN2Man3 ( $K_a = 4.7 \text{ M}^{-1} \times 10^{-4}$ ) en comparación con ConA ( $K_a = 140 \text{ M}^{-1} \times 10^{-4}$ ), a pesar de la identidad de secuencia del 83% entre las dos lectinas (Tabla 1-1). La disimilitud observada en las especificidades de unión de estas dos lectinas tipo I hacia GN2Man3 se ha explicado por interacciones de contacto relativamente desfavorables entre LDG-I y el residuo  $\beta 1,2\text{GlcNAc}$  sobre la rama  $\alpha 1,6$  del carbohidrato complejo (Dam *et al.*, 1998, 2000; Gupta *et al.*, 1996; Rozwarski *et al.*, 1998). Estudios de difracción de rayos X revelaron que contactos apropiados entre LDG-I y Gn2Man3 también son prevenidos debido a las diferencias en el tipo de residuos en las posiciones 226 (Thr en ConA, Gly en LDG-I) y 168 (Ser en ConA, Asn en LDG-I), y cambios en la cadena de residuos en las posiciones 222–227 (Rozwarski *et al.*, 1998).

### 3.5.2. Esquemas funcionales propuestos a partir del refinamiento de la especificidad de las lectinas

Con los resultados del presente trabajo y de estudios previos, sugerimos los siguientes esquemas funcionales del reconocimiento de carbohidratos por LDG-I, LDG-II y LGL-II (Fig. 3-22). En ellos se observa el impacto de la modificación de glicótopes básicos que se encuentran en mamíferos, la cual puede mejorar, permitir o inhibir el reconocimiento por los dominios DRC de cada una de las lectinas. Las interacciones de los glicoconjugados con las lectinas están influenciadas por la forma como se presenta el glicotopo del glicano (de forma monovalente, polivalente, en *cluster*); además, cabe anotar que la interacción de las lectinas con células depende también del reconocimiento biomolecular en la superficie de las membranas celulares. La presentación de glicanos asociados a

membrana es más restringida que la de los glicanos en solución, particularmente debido a las restricciones de orientación impuestas al glicoconjugado a través de sus interacciones laterales con otras moléculas, como lípidos y proteínas de la membrana (Nasir *et al*, 2017).

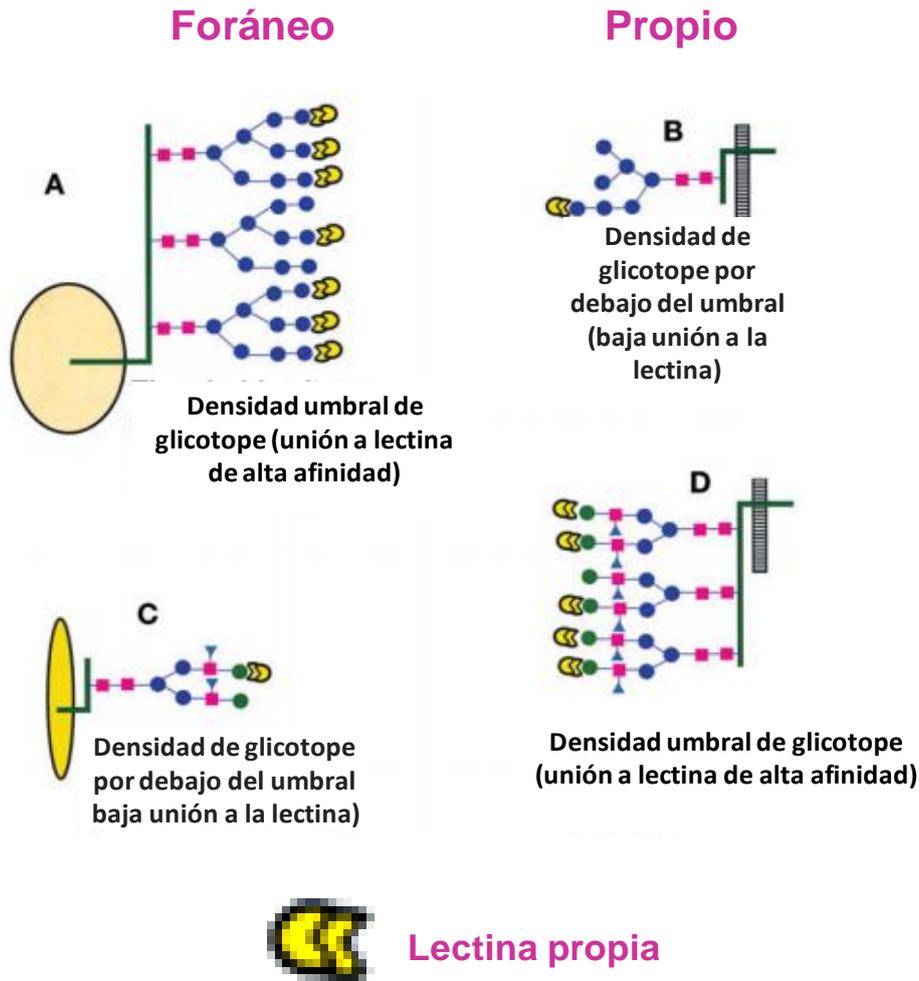
Lectina	Residuo de carbohidrato expuesto	Glicotipe T $\alpha$	Lectina	Residuo de carbohidrato expuesto	Glicotipe II $\beta$
LDG-I	NeuAc $\alpha$ 2,3 NeuGc $\alpha$ 2,3 Ninguno	Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$	LDG-I	NeuAc $\alpha$ 2,3 NeuGc $\alpha$ 2,3 NeuAc $\alpha$ 2,6 Gal $\alpha$ 1,3 Fuca1,2 Ninguno	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$
LDG-II	NeuAc $\alpha$ 2,3 Ninguno		LDG-II	NeuAc $\alpha$ 2,3 NeuAc $\alpha$ 2,6 Gal $\alpha$ 1,3 Fuca1,2 Ninguno	
LGL-II	NeuAc $\alpha$ 2,3 Ninguno		LGL-II	NeuAc $\alpha$ 2,3/6 NeuGc $\alpha$ 2,3/6 Gal $\alpha$ 1,3 Fuca1,2 Ninguno	
Interacción LDG-I con otros glicotipes externos		Interacción LDG-II y LGL-II con otros glicotipes externos			
Man5-Asn Man9-Asn GalNAc $\alpha$ / $\beta$		HexNAc $\beta$ Fuca1,2 + Fuca1,3 Fuca1,2Gal $\beta$ 1,3/4GlcNAc-R GalNAc $\alpha$ (LDG-II); GalNAc $\alpha$ (LGL-II)			
Interacción de LDG-I con N-glicanos					
Residuo(s) de carbohidrato expuesto(s)		Glicotipe: trimanósido	Porción del glicano más cercana a Asn		
Ninguno GlcNAc $\beta$ 1,2 GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,2 Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,2 Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,2 NeuAc $\alpha$ 2,6Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,2		Man $\alpha$ 1,3(Man $\alpha$ 1,6)Man	$\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4GlcNAc-Asn $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,4(Fuca1,6)GlcNAc-Asn		

**Figura 3-22. Esquemas funcionales de la especificidad de las lectinas.** En los paneles de la izquierda se muestra la interacción de las lectinas con el glicotipe T $\alpha$  expuesto o encriptado, y con otros glicotipes externos. En el panel de la derecha se muestra la interacción de las lectinas con el glicotipe II $\beta$  expuesto o encriptado. En el panel de abajo se muestra uno de los ligandos más activos de la lectina LDG-I, el trimanósido, que se encuentra expuesto o encriptado en todas las N-glicofomas usadas en el presente trabajo, y su interacción con la lectina es influida por los residuos de carbohidratos circundantes. Nota: La presencia Gal $\alpha$ 1,3 expuesta interfiere con la unión de LDG-I a N-glicanos. En los glicolípidos de eritrocitos de conejo y cerdo también está presente Gal $\alpha$ 1,3 expuesta; sin embargo, LDG-I aglutina este tipo de eritrocitos y ello probablemente se deba a la presencia adicional de Neu5Ac $\alpha$ 2,3Gal terminal en glicoproteínas. En los esquemas, los residuos en **verde** son aquellos que permiten o promueven la interacción; y los residuos en **rojo** son aquellos que disminuyen o con los que no hay interacción. La palabra “ninguno” significa ausencia de otros residuos más expuestos. Asn: residuo de asparragina.

### 3.5.3. Consideraciones del reconocimiento lectina – glicotipe propio o foráneo

Varios estudios indican que la forma de presentación, la densidad y el número de glicotipes en carbohidratos multivalentes y en glicoproteínas receptoras, determinan la afinidad de las lectinas y sus funciones efectoras en los organismos, incluyendo el reconocimiento de estructuras propias o foráneas (Fig. 3-23). En organismos multicelulares, los glicotipes propios pueden ser reconocidos

por lectinas del mismo organismo y dicho reconocimiento está involucrado en funciones que incluyen desarrollo, regulación inmunológica y homeostasis; por otro lado, lectinas de un organismo también pueden reconocer glicotopes en organismos que representen algún tipo de situación adversa, e.g., patógenos o depredadores (Dam & Brewer, 2010), o en otros organismos con los que tienen relaciones simbióticas mutualistas (De Vasconcelos *et al*, 2013).



**Figura. 3-23. Ejemplos esquemáticos de reconocimiento de glicanos propios o foráneos, dependiente de densidad.** (A) Molécula de adhesión intercelular DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*) es un receptor con actividad lectina tipo-C que puede unirse con alta afinidad a oligomanósidos que se presentan en alta densidad sobre una glicoproteína de superficie viral, pero interactúa débilmente con el tipo de oligomanósidos que se presentan en baja densidad sobre las células propias (B). La afinidad de la lectina DC-SIGN por un patógeno que cuenta con glicotopes Lewis<sup>x</sup> no agrupados (densidad en nivel subumbral) puede ser baja (C) y preferencialmente se une a glicoproteínas propias que contienen glicotopes Lewis<sup>x</sup> en una densidad alta (D). Recuperado de Dam & Brewer, 2010.

Es así como, a pesar de la especificidad de varias lectinas vegetales por los glicotopes T $\alpha$  o T $n$ , las plantas no parecen tener dichas estructuras (Wilson, 2002), pero pueden actuar sobre glicanos de otros organismos que si los posean; como el caso de las lectinas estudiadas en el presente trabajo, LDG-I y LGL-II, las cuales interactuaron con glicoproteínas de origen mamífero y eritrocitos de origen humano, que contenían los glicotopes T $n$  y T $\alpha$  en formas monovalente o multivalente (además de su interacción con otros glicotopes); y LDG-II que interactuó con el glicotopo T $\alpha$

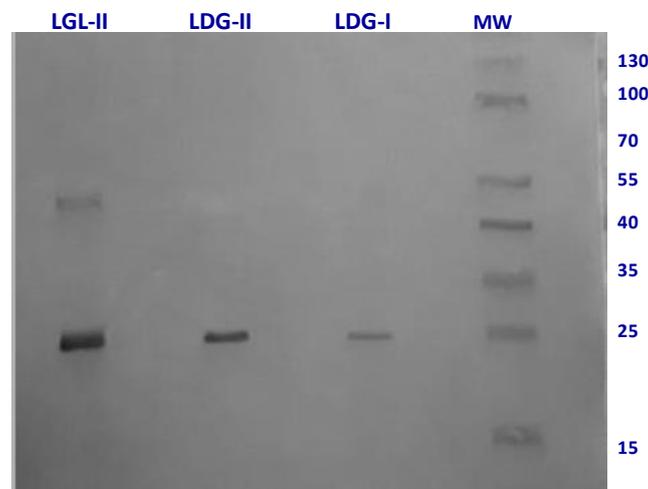
cuando se presenta en alta densidad. Altas densidades de glicotopes Tn y T $\alpha$  se cuentan como biomarcadores tumorales aprobados por la FDA (Díaz-Fernández *et al*, 2018), y lectinas Tn o T $\alpha$ -específicas pueden ser usadas para el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer. Los insectos también expresan Tn en mucinas u otras O-glicoproteínas de su tracto digestivo, las cuales son receptoras de lectinas Tn-específicas que se ingieren en la dieta, y dichas interacciones pueden provocar efectos deletéreos causando daño en el sistema digestivo de los insectos depredadores (Vandenborre *et al*, 2009; Wang *et al.*, 2003). De manera similar, lectinas T-específicas de hongos han mostrado efecto insecticida en insectos chupadores (homópteros) y masticadores (lepidópteros) (Vanti *et al*, 2018). *Drosophila* (mosca de la fruta) y algunas lombrices expresan el glicotope T $\alpha$  expuesto o encriptado (Wilson, 2002; Tran & Ten Hagen, 2013); dicho glicotope está involucrado en procesos de polaridad y adhesión celular durante el desarrollo del insecto, y la interacción con lectinas T-específicas podría influir en dichos procesos (Tran & Ten Hagen, 2013).

Por otro lado, la presencia de los núcleos  $\alpha$ 1,3-Fuc y  $\alpha$ 1,4-Fuc en los determinantes histo-sanguíneos Le<sup>y</sup> y Le<sup>a</sup>, respectivamente, no promovieron la interacción con LDG-II (Melgarejo *et al*; 2005), ni con otras lectinas vegetales tipo II tales como CEL-II de *Canavalia ensiformis*, LDL-II (Melgarejo *et al*; 2005) y LCR-II (Dam *et al*, 2011); a pesar de que dichos núcleos pueden encontrarse en otro tipo de glicanos en plantas e invertebrados (Fig. 3-1; Wilson, 2002; Smit *et al*, 2015). De manera interesante, por medio de ELLSA se observó la inhibición de la lectina LGL-II con saliva de un individuo con fenotipo secretor del determinante Le<sup>b</sup>, el cual contiene el núcleo  $\alpha$ 1,4-Fuc (Almanza *et al*, 2004), glicotope que se puede encontrar en N-glicanos de plantas dentro de secuencias como Gal $\beta$ 1,3(Fuc $\alpha$ 1,4)GlcNAc $\beta$  (Wilson, 2002). También, existen lectinas vegetales con especificidad por el núcleo  $\alpha$ 1,6-Fuc (Fuc $\alpha$ 1,6GlcNAc), como la LCA de la lenteja, y éste glicotope es una característica generalizada en N-glicanos presentes en invertebrados y vertebrados (Wilson, 2002). El segundo determinante tipo H con el cual lectinas tipo II del género *Galactia*, *i.e.*, LGL-II y LGTe-II, muestran mayor interacción, después del H-tipo II, es con el determinante H-tipo III (Almanza *et al*, 2004), y en O-glicanos del nemátodo *Toxocara*, parásito que produce reacciones inflamatorias en humanos, y que puede encontrarse en tierra o arena contaminada, se ha encontrado la secuencia de dicho determinante (Wilson, 2002).

Algunas lectinas vegetales que reconocen Man/Glc o Gal, estimulan el crecimiento de la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium tropici*, simbionte común en los nódulos de las raíces de varios tipos de granos de consumo humano (De Vasconcelos *et al*, 2013); esta bacteria posee polisacáridos en su superficie que contienen Man, Glc, Gal y ramnosa, carbohidratos que también están presentes en tejidos vegetales, sin embargo, las interacciones con lo propio y lo foráneo estarán determinadas por la forma de presentación de los glicotopes de los que esos residuos de carbohidratos hagan parte, como ya se ha mencionado.

Adicionalmente al modo de presentación de los glicotopes, existen lectinas vegetales que se expresan de manera constitutiva y pueden acumularse en alta concentración en tejidos de almacenamiento durante ciertos periodos del desarrollo, y otras lectinas que son inducibles ante situaciones ambientales y que se pueden acumular en menor concentración (Vandenborre *et al*, 2009). Este podría ser el caso de las dos lectinas de *D. grandiflora* purificadas a partir del mismo extracto de semillas en el presente trabajo, donde se observó que la concentración de LDG-I es 5 veces mayor que la aquella de la lectina LDG-II en el extracto (Tabla 2-1).

A su vez, se han reportado lectinas que presentan glicosilación en su estructura (Almanza *et al*, 2004; García-Maldonado *et al*, 2017; Melgarejo *et al*, 2005; Romo-Arévalo *et al*, 2016). Las plantas poseen glicoconjugados con N-glicanos truncados o complejos que pueden presentar núcleos  $\beta$ 1,2-xilosa y  $\alpha$ 1,3-fucosa (Fig. 3-1), los cuales son elementos antigénicos presentes en invertebrados (Hoffmann-Sommergruber *et al*, 2011; Smit *et al*, 2015; Wilson & Altmann, 1998). Se ha observado que el anticuerpo anti-peroxidasa de rábano (rb $\alpha$  HRP = anti-HRP) reconoce el núcleo  $\alpha$ 1,3-fucosa en glicanos de plantas e invertebrados (Paschinger *et al*, 2005). En el presente trabajo se evaluó la interacción de las tres lectinas vegetales con dicho anticuerpo teniendo en cuenta que se ha reportado que las bandas en SDS-PAGE de LGL-II y LDG-II muestran tinción con ácido periódico-Schiff indicando que son lectinas glicosiladas, y los contenidos de azúcares neutros son de 7% y 2.1%, respectivamente (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005).



**Figura 3-24. Interacción de las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II con el anticuerpo anti-peroxidasa de rábano.** Se realizó electroforesis SDS-PAGE usando 20  $\mu$ g de cada lectina, luego se procedió con la transferencia a membrana de celulosa. La solución de bloqueo fue Tris buffer salino con Tween 20 al 0.05% (TTBS) y albumina de suero bovino (ASB) al 0.5%. El anticuerpo primario rb $\alpha$  HRP (AB1 P7899 de Sigma-Aldrich) se usó en dilución 1:10000 en TTBS con ASB al 0.5% durante 1 h. El anticuerpo secundario fue anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (AP1000 de VectorLab), usado a 1:2000 durante 1h. La solución de revelado contenía una tableta de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y azul de nitro tatrafolio (B5655 de Sigma-Aldrich) disuelta en 10 mL de agua desionizada; la solución de parada de reacción fue ácido acético al 5%. LDG-I y LDG-II: lectinas en semillas de *Dioclea grandiflora*; LGL-II: lectina tipo II en semillas de *Galactia lindenii*. MW: marcadores de peso molecular (kDa).

Las tres lectinas mostraron interacción con el anticuerpo anti-HRP (LGL-II > LDG-II > LDG-I) indicando la presencia de glicanos con el núcleo  $\alpha$ 1,3-Fuc en la estructura de las lectinas. Una banda que se corresponde con el peso del dímero de la LGL-II también mostró interacción. No se había observado glicosilación en la lectina LDG-I (Moreira *et al*, 1983), sin embargo, los resultados de su interacción con el anticuerpo anti-HRP indicaría que podría contar glicanos en su estructura, aunque en menor cantidad que los encontrados en las lectinas tipo II (Fig. 3-24).

## 4. Efecto de las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II sobre los procesos de migración y proliferación de queratinocitos epidérmicos

En el presente capítulo se presentan los métodos, resultados y discusión de los efectos de tres lectinas de la tribu Diocleae de la familia Fabaceae (*i.e.*, lectinas LDG-I y LDG-II de *D. grandiflora*, y LGL-II de *G. lindenii*), sobre los procesos de proliferación y migración en queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat. También, se realiza una comparación entre estas tres lectinas vegetales con la lectina LGALS3 de origen mamífero que esta involucrada en procesos de migración y proliferación celular, así como en reepitelización de heridas.

### 4.1. Hallazgos

Las lectinas LDG-II y LGL-II, con especificidad por ciertos galactósidos, mostraron efectos tanto proliferativo como migratorio en los queratinocitos (1.5 – 25 µg/mL, dependiendo del proceso y de la lectina); mientras que, la lectina LDG-I con especificidad por manósidos, mostró efecto proliferativo solo a una dosis de 1.5 µg/mL por 24 h e inhibió la migración de células HaCat en todas las condiciones ensayadas. En los lisados de los queratinocitos cultivados en presencia de LDG-II, LGL-II y LGALS3r se observó la inmunodetección del EGFR a nivel basal y también fosforilado. La presencia de LGL-II en los cultivos duplicó la expresión del factor EGF en los sobrenadantes celulares. Se encontraron algunos ligandos compartidos entre la galectina LGALS3 (revisados en la bibliografía), y las lectinas LDG-II y LGL-II, tales como los glicotopes LacNAc, Lac y Tα. La interacción de dichos ligandos con cada lectina es dependiente del tipo y de la forma de presentación del glicano (*i.e.*, externo o encriptado; monovalente, polivalente, en *cluster*), así como de los residuos de carbohidratos circundantes. En la membrana de los queratinocitos epidérmicos están presentes receptores glicosilados tales como el EGFR e integrinas, cuya actividad puede ser modulada por la unión de LGALS3, y eventualmente de las lectinas vegetales, a glicotopes específicos de cada receptor.

### 4.2. LGALS3 como modulador de la proliferación y migración celular

LGALS3 es una lectina soluble, no glicosilada, perteneciente a la familia de galectinas evolutivamente conservada en vertebrados, invertebrados y hongos, y que posee dominios de unión a β-galactósidos (Ahmad *et al.*, 2002; Di Lella *et al.*, 2011; Krzeminski *et al.*, 2011; Vasta *et al.*, 2012). LGALS3 se expresa de forma ubicua en tejidos adultos; se puede encontrar en el núcleo y en el citoplasma, así como en la superficie celular y en el espacio extracelular (Liu *et al.*, 2002; Ochieng *et al.*, 2004). Realiza sus funciones de manera regulada y temporal, dependiendo de la fase de desarrollo, participando en procesos de proliferación (Liu *et al.*, 2012), adhesión y migración (Friedrichs *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Saravan *et al.*, 2009), diferenciación, supervivencia, apoptosis (Yang *et al.*, 2003; Zhuo *et al.*, 2008), respuesta inmune (Chung *et al.*, 2013; Cooper *et al.*, 2012) y tráfico de proteínas (Lajoie *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2002). El uso de LGALS3 exógena ha mostrado promover proliferación y migración en varios tipos de células

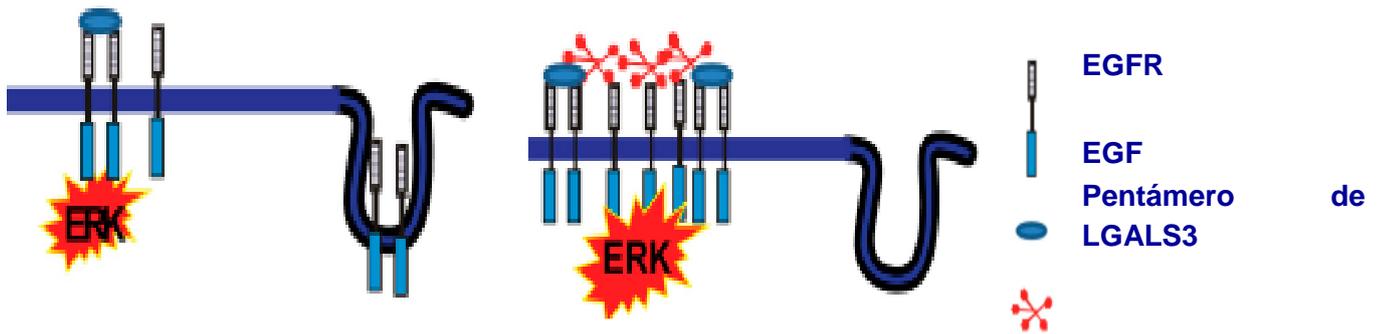
normales (Inohara *et al.*, 1998; Kiwaki *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2011); y se han observado cambios en la expresión y localización de LGALS3 en células cancerosas (Newlaczył *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2017), incluyendo carcinoma de piel humana (Kapucuoglu *et al.*, 2009).

LGALS3 interviene en rutas celulares mediante el entrecruzamiento de receptores en *cis*, o enlazando los receptores con ligandos extracelulares en *trans* (Yang *et al.*, 2017). A través de sus dominios de unión a carbohidrato, LGALS3 interactúa con glicanos multivalentes de los receptores en la superficie celular formando microdominios de membrana (Fig. 4-1), los cuales se consideran esenciales para ensamblar componentes de transducción de señales en la membrana plasmática (Ravinovich *et al.*, 2007). En dichos microdominios se disminuye la tasa de eliminación de los receptores por endocitosis constitutiva y se ve aumentada la señalización celular (Lajoie P *et al.* 2009).

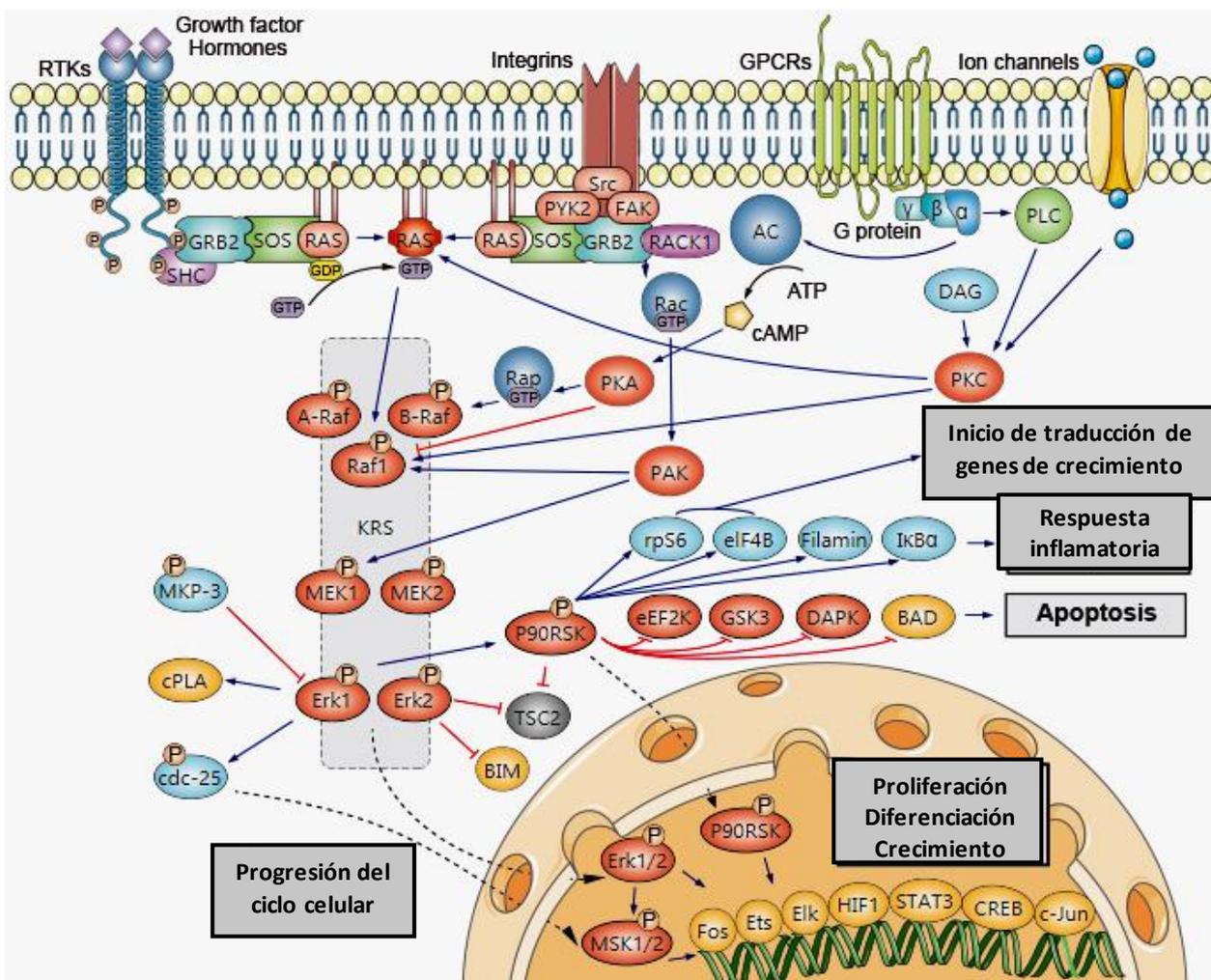


**Figura 4-1. Interacción de glectina-3 polimérica con glicanos de receptores transmembranales.** LGALS3 interactúa con glicoproteínas multivalentes transmembranales formando dominios de membrana, regulando así la tasa de difusión de los receptores que captan las señales extracelulares. Recuperado de de Lajoie *et al.* 2009.

En la piel, LGALS3 es expresada en varios tipos celulares incluyendo queratinocitos, fibroblastos, células dendríticas y leucocitos (Cao *et al.*, 2002; Panjwani, 2014). Durante la ocurrencia de lesiones, LGALS3 se encuentra sobreexpresada en los bordes delanteros de las heridas y juega un papel primordial en reepitelización debido a sus múltiples interacciones con moléculas involucradas en migración y proliferación celular (Friedrichs *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Saravanan *et al.*, 2009). Entre los receptores de membrana con los que interactúa LGALS3 se encuentran el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y las integrinas. El secuestro del EGFR en redes con LGALS3 potencia el agrupamiento de los receptores y la señalización inducidos por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Lajoie *et al.* 2009; Partridge *et al.*, 2004; Fig 4-2). Así, la presencia de LGALS3 puede promover la activación de la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), también conocida como la vía Ras-Raf-MEK-ERK, que conlleva a proliferación celular (Kariya *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Fig. 4-3); o puede actuar como una lectina anti-apoptótica induciendo la activación de la vía PI3K-AKT (*phosphatidylinositol 3-kinase/Akt protein kinase B*; Fig. 4-4) en queratinocitos epidérmicos normales (Saegusa *et al.*, 2008). En carcinomas y melanomas, se ha observado que puede ocurrir la activación simultánea de las proteínas ERK y AKT, y que ambas vías convergen en la regulación de elementos efectores comunes que integran sus funciones durante la tumorigenesis y metastasis (Ye & She, 2013).

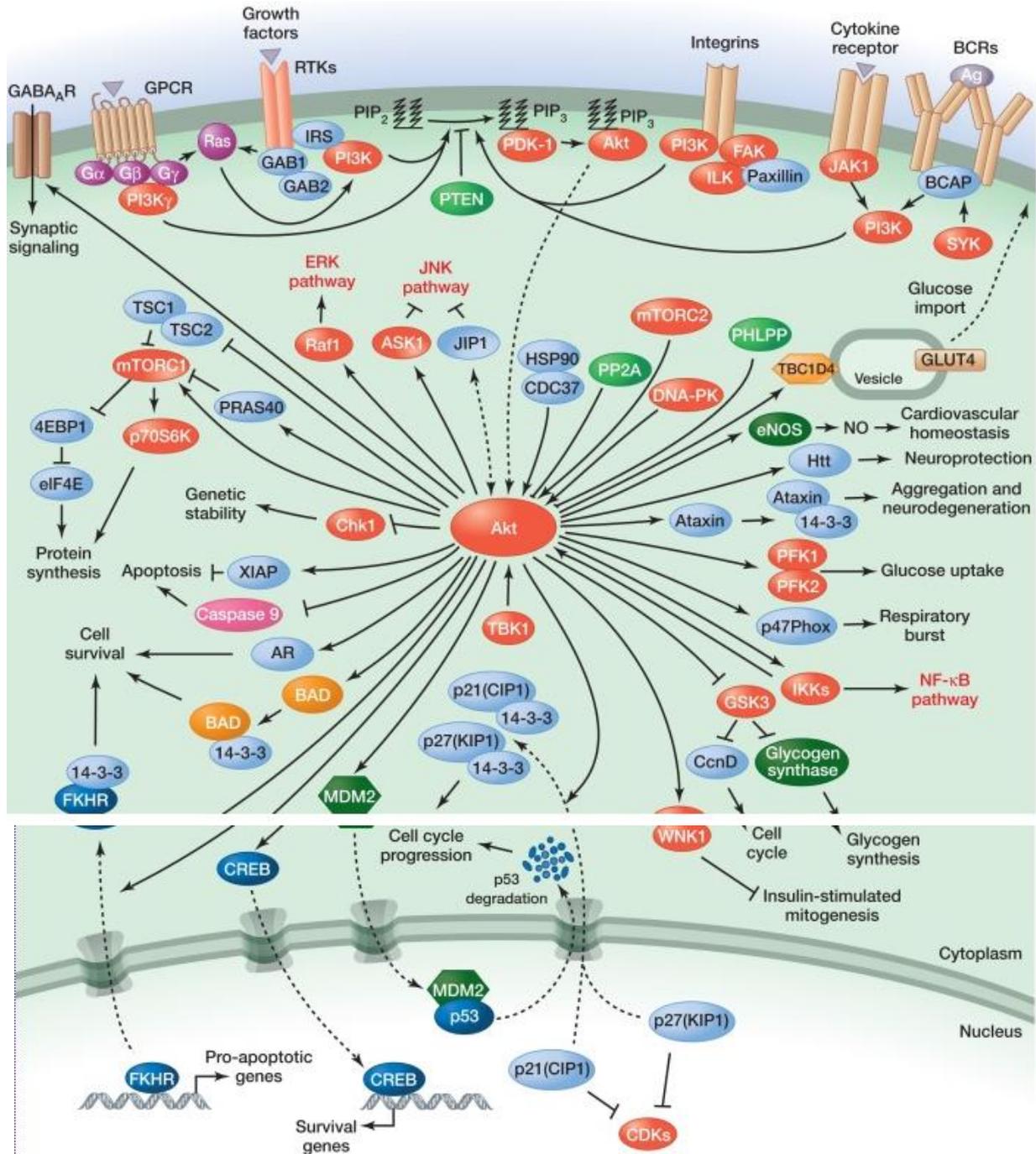


**Figura 4-2. Secuestro de EGFR en redes con LGALS3.** Izquierda: reclutamiento de receptores vía endocitosis constitutiva con consecuente disminución de sensibilidad a señales extracelulares y de señalización. Derecha: secuestro de receptores por redes LGALS3 - glicanos del EGFR promueve activación y señalización por la quinasa ERK. EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico; EGF: factor de crecimiento epidérmico; Gal-3: LGALS3 pentamérica extracelular. Recuperado de Lajoie *et al.* 2009.



**Figura 4-3. Cascadas de señalización por proteína quinasa regulada por señal extracelular ERK** inician en receptores de membrana tirosina quinasa (RTKs), receptores acoplados a proteína G (GPCR) o canales iónicos. Grb2: proteína adaptadora; SOS: factor de intercambio; Ras: GTPasa; Rafs: proteína quinasas; MEK1/2: proteína quinasa activada por mitógenos. *Proliferación celular*: activación de factores de transcripción. *Desarrollo y diferenciación*: regulados por la activadora de proteínas de transcripción STAT. *Ciclo celular*: control por Cdc25. *Oncogenesis*: degradación de Bim, secuestro de Bad, inhibición de

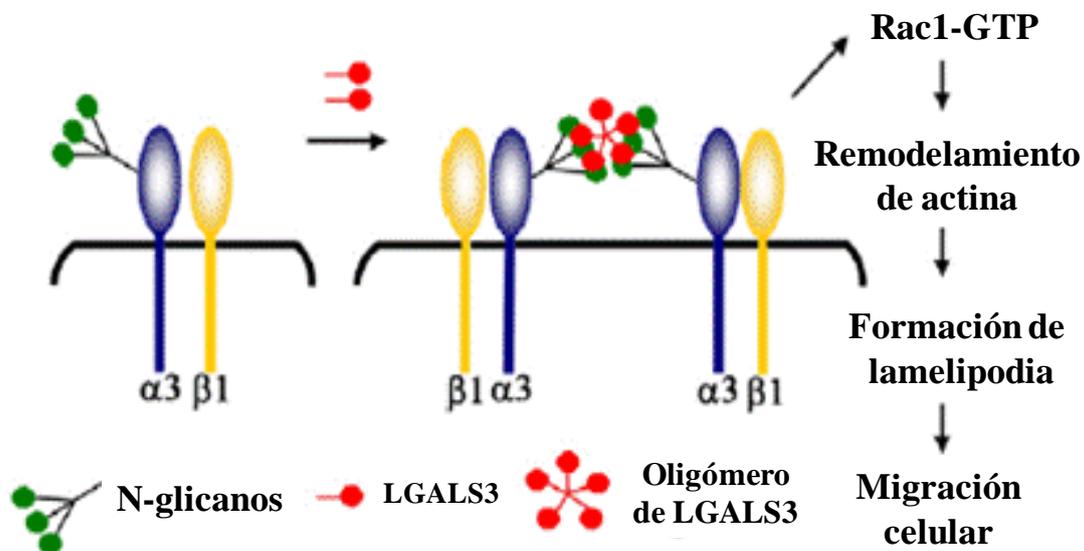
apoptosis. Recuperado de <https://www.creative-diagnostics.com/Erk-Signaling-Pathway.htm>. Fecha de consulta: 4 Octubre de 2018.



**Figura 4-4. Cascadas de señalización PI3K-PKB/Akt.** Receptores activados estimulan PI3K la cual convierte fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) en fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato (PIP<sub>3</sub>). PKB/Akt se une a PIP<sub>3</sub> permitiendo que la quinasa 1 dependiente de 3-fosfoinositoles (PDK1) active parcialmente a PKB/Akt, suficiente para activar mTORC1 (blanco 1 de rapamicina) inactivando a PRAS40 y la proteína 2 de esclerosis tuberosa (TSC2). Sustratos de mTORC1: proteína de unión al factor de inicio de traducción eucariótica 4EBP1; y quinasa ribosomal S6K1 que promueve síntesis de proteínas y proliferación celular. Fosforilación de Akt por mTOR o por quinasa DNA-PK, estimula su actividad total que lleva a inhibición de proteínas proapoptóticas FOXO. PKB/Akt media angiogénesis, metabolismo, crecimiento, proliferación, supervivencia, síntesis de proteínas, transcripción y apoptosis. Desfosforilación por fosfatasas PP2A y PHLPP1/2, y

conversión de PIP3 a PIP2 por fosfatasa homóloga de tensina (PTEN) antagonizan la señalización de Akt. Recuperado de Hemmings, B.A. & Restuccia, D.F. 2012. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(9): a011189. doi: 10.1101/cshperspect.a011189. Fecha de consulta: 7 Octubre de 2018.

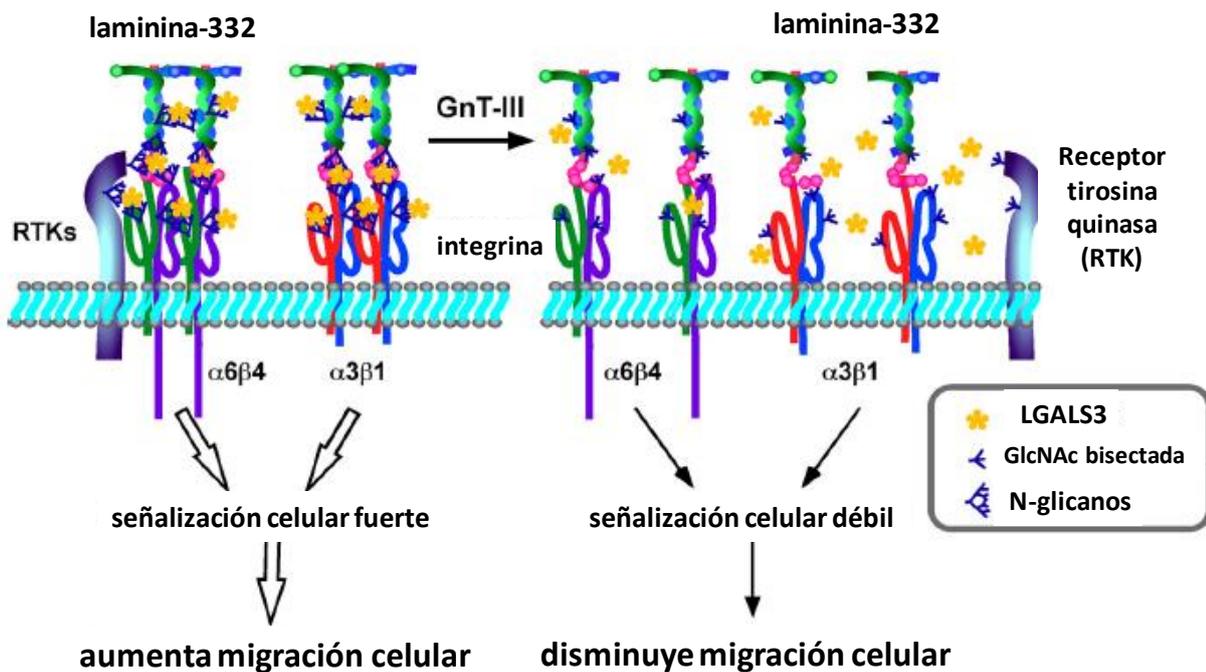
Por otro lado, LGALS3 promueve la adhesión y migración celular a través de interacciones LGALS3-carbohidrato de glicoproteína de membrana (eg., receptores de factores de crecimiento, integrinas) o de glicoproteína de la MEC, tales como laminina, fibronectina y vitronectina (Friedrichs *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Saravanan *et al.*, 2009). Existen receptores de superficie para cada glicoproteína de la MEC, con patrones de glicosilación específicos, influyendo así sobre los efectos de adhesión y migración. En células tratadas con LGALS3 exógena se ha observado disminución en el movimiento lateral de las integrinas de  $1.4 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{sec}^{-1}$  a  $1.0 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{sec}^{-1}$ , y su reorganización en grupos (*clusters*); mientras que la adición de ligandos oligosacáridos que contienen la N-acetilactosamina (LacNAc) como unidad disacárida, aumenta la movilidad a  $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{m}^2\text{sec}^{-1}$  (Yang *et al.*, 2017). LGALS3 promueve el agrupamiento de integrinas  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$  estabilizando adhesiones focales y regulando el remodelamiento de la MEC. En queratinocitos la interacción de LGALS3 con glicanos de la integrina  $\alpha 3\beta 1$  activa la señalización de las enzimas efectoras quinasa de adhesiones focales (FAK); y proteína G, miembro de la familia de GTPasas *Rho* (Rac1 GTPasa); las cuales participan en el traslado de integrinas a los sitios de la adhesión modulando la adhesión celular a glicoproteínas de la MEC; reorganización del citoesqueleto de actina; la formación de lamelipodios y la migración celular (Fig. 4-5).



**Figura 4-5. Componentes del proceso de migración.** LSGAL3 entrecruza y agrupa moléculas de integrina  $\alpha 3\beta 1$  en la superficie del borde delantero del queratinocito migrante. La agrupación de integrinas  $\alpha 3\beta 1$  activa FAK y la Rac1 GTPasa, promoviendo así la formación de lamelipodia, la migración celular y la reepitelización de heridas. Recuperado de Saravanan *et al.*, 2009.

Durante la cicatrización de heridas, la LGALS3 interactúa con la laminina 332 (Lm332), la cual forma parte de la membrana basal de los epitelios escamosos estratificados, incluyendo la epidermis (Kariya *et al.*, 2010). Lm332 se asocia con los hemidesmosomas, estructuras que unen los queratinocitos a la membrana basal, a través de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  (Kariya *et al.*, 2010). LGALS3 modula la formación del complejo Lm332-integrinas-EGFR en balsas lipídicas en la superficie de

los queratinocitos, las cuales son plataformas de señalización (Fig.4-6). El acople entre la integrina  $\alpha6\beta4$  y el EGFR, mediado por LGALS3, es necesario para la activación de la proteína quinasa *Src*, la cual previene la incorporación de la integrina  $\alpha6\beta4$  a los hemidesmosomas y promueve migración celular (Kariya *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Saravanan *et al.*, 2009). También se ha observado que modificaciones en la glicosilación de Lm332 pueden modular los complejos mediados por lectinas; por ejemplo, la adición de ramificaciones bisectadas con N-acetilglucosamina (GlcNAc) terminal sobre los N-glicanos de la Lm332 reduce la migración celular (Kariya *et al.*, 2010).



**Figura 4-6. El complejo laminina Lm332-integrinas-EGFR promovido por LGALS3 induce la migración celular.** LGALS3 se une a integrinas, a proteínas de la MEC y al EGFR, para formar un complejo en la superficie celular. La actividad N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT-III) suprime la adición de poli-LacNAc en estas glicoproteínas evitando la formación de las plataformas de señalización inducidas por LGALS3 inhibiendo así la señalización y la migración en queratinocitos. Adaptado de Kariya *et al.*, 2010.

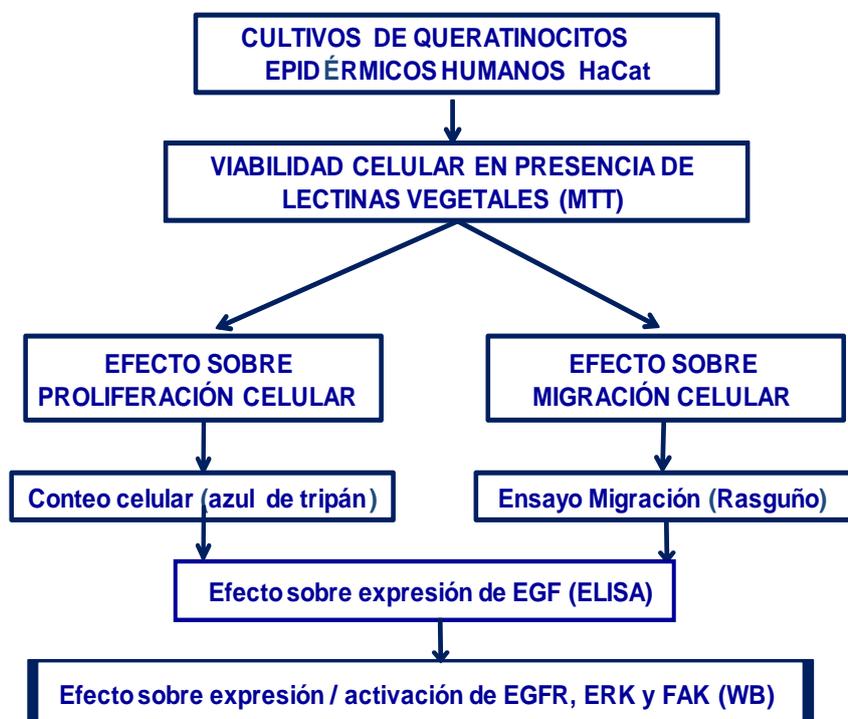
La estructura terciaria de LGALS3, al igual que el de las lectinas de la tribu Diocleae, está representada por el plegamiento tipo "lectina de legumbre" (Loris, 2002). El monómero de LGALS3 cuenta con 251 residuos de aminoácidos y posee un peso molecular de 31 kDa. Su extremo C-terminal conforma el dominio DRC y consiste de ~130 aminoácidos que forman dos hojas  $\beta$  antiparalelas (de 5 y 6 hebras  $\beta$ ) constituyendo un  $\beta$ -sandwich (Capítulo 1). La LGALS3 posee afinidad por los disacáridos lactosa Gal $\beta$ 1,4Glc (Lac,  $K_d = 1$  mM), y N-acetil-lactosamina (LacNAc;  $K_d = 0,2$  mM); y se une preferentemente a glicanos compuestos por unidades repetitivas de LacNAc (Gal $\beta$ 1,3/4GlcNAc), presentes como unidades de disacáridos en los extremos de N-glicanos complejos, o como unidades repetitivas en cadenas de poli-N-acetil-lactosamina (poli-LacNAc) en N/O-glicanos que se encuentra en la estructura de varias moléculas de la matriz extracelular (MEC) y de la superficie celular (Rapoport *et al.*, 2008; Seetharaman *et al.*, 1998; Krzeminski *et al.*, 2011), o en glicolípidos que también son reconocidos por LGALS3 (Collins *et al.*, 2014). La afinidad de

unión de la LGALS3 a los N-glicanos complejos es proporcional al contenido de LacNAc y al número de ramificaciones que contengan dicho glicotopo (Ravinovich *et al* 2007).

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1. Evaluación del efecto de las lectinas LDG-I y LDG-II de *Dioclea grandiflora*, y LGL-II de *Galactia lindenii* sobre los procesos de proliferación y migración en queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat

Con el fin de evaluar el efecto de las lectinas LDG-I, LDG-II, y LGL-II sobre los procesos de proliferación y migración en queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat, se llevó a cabo la estrategia experimental descrita en el Diagrama 4-1. Inicialmente se realizaron ensayos de viabilidad en las células HaCat usando MTT. Se evaluó el número de células viables usando azul de tripán en cultivos expuestos a cada una de las tres lectinas vegetales a la menor concentración usada en el ensayo MTT, concentración en la que el porcentaje de viabilidad celular fue más alto o mayor que en cultivos sin lectina. También, se evaluó la migración por medio de ensayos de cierre de rasguño en monocapa celular a 3 concentraciones de lectina dentro de un rango menor a aquella concentración de cada lectina en la que se disminuyó el 50% de la viabilidad celular (CI50). Aquellas lectinas que mostraron un carácter proliferativo y migratorio se usaron para evaluar el efecto en la expresión o activación de proteínas relacionadas con estos dos procesos a través de ensayos de ELISA y *Western blot* (WB).



**Diagrama 4-1. Estrategia experimental para el estudio de la proliferación y la migración celular de queratinocitos epidérmicos.** MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; EGF: factor de

crecimiento epidérmico; EGFR: receptor del EGF; ERK: quinasa de la vía de señalización de las MAPK; FAK: quinasa de adhesiones focales; ELISA: ensayo de inmunoabsorción evidenciada por enzima ligada; WB: ensayos de inmunodetección por Western blot.

#### 4.3.1.1. Cultivos de queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat

El mantenimiento de las células de la línea celular de queratinocitos humanos no tumorigénica HaCat se realizó en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Adicionalmente, se incorporaron al medio los antibióticos penicilina 100 U/mL y estreptomina 100 µg/mL. Las células se mantuvieron a  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , en atmósfera húmeda, con  $\text{CO}_2$  al 5%.

El vial que contenía las células (CLS 300493) se obtuvo en pase # 26, de la compañía de Biotecnología *Cell Lines Services* (CLS GmbH, Eppelheim, Alemania), en hielo seco, el día 25 de agosto de 2017; y fue congelado inmediatamente en nitrógeno líquido. Días después, las células se removieron del tanque de nitrógeno y se dejaron descongelar lentamente para procurar obtener una mayor viabilidad (Tirabassi, 2013). Inmediatamente, el volumen de 1 mL del vial que contenía las células se transfirió a 15 mL de medio de cultivo previamente calentado a  $37^\circ\text{C}$ . El volumen total con las células se dividió en tres frascos pequeños para dar inicio al cultivo. Se evitó centrifugar las células el primer día debido a que se ha reportado que las células recién descongeladas son muy frágiles y la centrifugación puede aumentar la muerte celular (Tirabassi, 2013). A las 24 h, luego de observar la adherencia celular bajo microscopio, se realizó cambio de medio de cultivo. Al tercer día se realizó cambio de medio, y al cuarto día unas células fueron congeladas y otras se usaron para abrir cultivos en frascos medianos.

Las células adheridas se desprendieron usando 2 mL de una solución de tripsina 0.025% - EDTA 0.03% en PBS pH 7.4. En cabina, luego de la incubación a  $37^\circ\text{C}$  durante cinco minutos, las paredes de los frascos se golpearon suavemente para facilitar el desprendimiento de las monocapas celulares. Posteriormente, se adicionaron a cada frasco 5 mL de PBS suplementado con SFB para inactivar la tripsina. El contenido de los frascos se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, las células se suspendieron en 3 mL de medio de cultivo suplementado y se realizó conteo celular. Las células a congelar ( $1 \times 10^6$  células por vial) se dispusieron en un vial de congelación en 1 mL que contenía medio de cultivo con SFB al 20% y el crioprotector DMSO al 10%, y se guardaron en el tanque de nitrógeno líquido. El resto de las células se dividieron en tres frascos medianos y se dejaron en cultivo en 15 mL totales de medio/frasco mediano. El cambio de medio se realizó cuando se observó alteración en el medio de cultivo.

Las células HaCat se obtuvieron y propagaron por primera vez por Boukamp *et al* (1988), y representa una línea de queratinocitos epidérmicos humanos con propiedades de crecimiento de tipo adherente, que mantiene la capacidad de proliferación y diferenciación epidérmica normal, con un carácter genético estable, no tumoral, que fue inmortalizada *in vitro* espontáneamente a partir de piel humana (Boukamp *et al*, 1988; Boukamp *et al*, 1997). Estas células expresan marcadores de diferenciación tales como queratinas K1 y K10, así como los marcadores de queratinocitos epidérmicos involucrina y filagrina. Sus ciclos de división en cultivo pueden durar entre 18-20 horas

(Gurskaya *et al*, 2016). La designación HaCat indica su origen y las condiciones iniciales de cultivo (Ha = humano adulto, Ca = concentración reducida de calcio, T= temperaturas elevadas). La acción concertada de mutaciones en el gen *p53*, las temperaturas elevadas de cultivo y un incremento en la actividad telomerasa, se han señalado como los mayores inductores de la inmortalización en esta línea celular (Fusenig & Boukamp, 1998). El comportamiento normal de las células HaCat ha permitido la comparación con células derivadas de piel en estados patológicos (Colombo *et al*, 2017).

#### 4.3.1.2. Evaluación de la viabilidad y proliferación celular en presencia de las lectinas

El efecto de las lectinas LDG-I, LDG-II, y LGL-II sobre la actividad metabólica de los queratinocitos epidérmicos humanos se determinó mediante ensayo colorimétrico usando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, MTT (Anexo VIII). Los queratinocitos se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad aproximada de  $1,2 \times 10^4$  células / pozo en 100  $\mu$ L de medio de cultivo con SFB, y se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda y CO<sub>2</sub> al 5%, durante 24 h. Pasado este tiempo, las placas se inspeccionaron bajo microscopio invertido para evidenciar la adherencia de las células. Para observar efectos dosis respuesta sobre la viabilidad celular, las células se trataron con las lectinas en un rango de concentraciones entre 1.5 - 200  $\mu$ g/mL, por triplicado. Al finalizar la exposición a las lectinas durante 12, 24, 48 y 72 h, se adicionaron 10  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) a cada pozo, y las células se incubaron nuevamente por 3h. Luego, se procedió a eliminar el medio de cultivo de los pozos y a disolver los cristales formados con 100  $\mu$ L/pozo de dimetil sulfóxido (DMSO). Se realizó la lectura de absorbancia a 540 nm en lector de microplaca.

Los resultados se analizaron teniendo en cuenta los valores de supervivencia que se obtuvieron a partir de las absorbancias arrojadas de la lectura espectrofotométrica aplicando la fórmula % Supervivencia = (Abs muestra – Abs medio) x 100/ (Abs blanco celular – Abs medio), considerando la absorbancia dada por células sin tratamiento como la viabilidad celular del 100%. Además de los tratamientos, cada placa de ensayo tenía sus pozos de células sin tratamiento durante el tiempo evaluado. Se realizaron curvas dosis-respuesta con el fin de hallar las concentraciones CI50 de las lectinas usando el programa GraphPad v7.

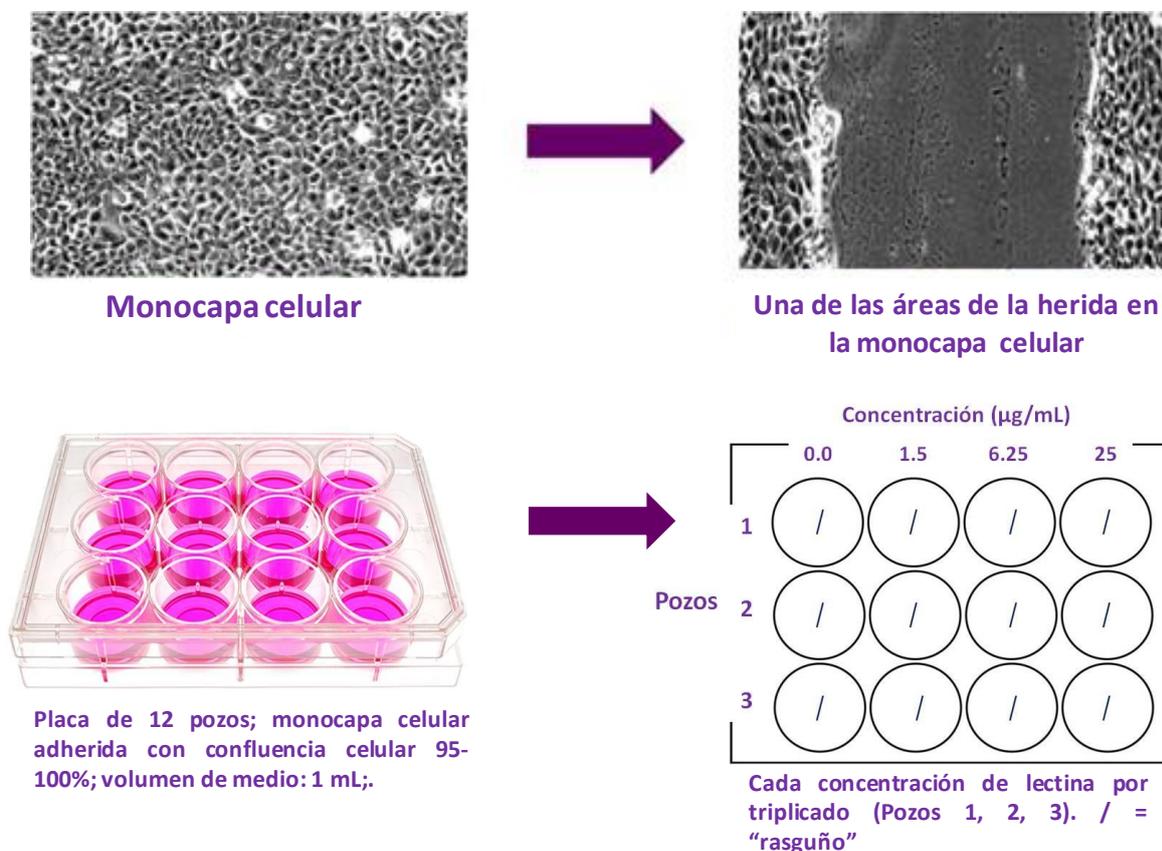
#### 4.3.1.3. Evaluación de la proliferación celular usando azul de tripán

Con el fin de determinar el número de células viables en suspensiones de células sembradas en placas de 12 pozos (densidad inicial  $5 \times 10^4$  queratinocitos/pozo), en presencia o ausencia (control) de las lectinas durante 24, 48 y 72 h. Cada placa de ensayo tenía sus pozos de células sin tratamiento durante el tiempo evaluado cuyo promedio de proliferación corresponde al 100%. Se realizó el conteo celular usando el colorante azul de tripán, el cual atraviesa las membranas celulares no selectivas de las células muertas, tiñendo su citoplasma de color azul, permitiendo así el conteo de las células vivas con membranas selectivas y citoplasmas no teñidos (Strober, 2015). Para obtener las suspensiones celulares se llevó a cabo un proceso de tripsinización, que facilitó el desprendimiento de las células, usando solución de tripsina 0,025% - EDTA 0,03% en PBS pH 7,4; durante 5 min, a 37 °C. Luego, a las células se les adicionó medio de cultivo suplementado con suero al 5% para inactivar la tripsina, y se centrifugaron a 1500 rpm en una centrifuga refrigerada *Sorvall RC5C* durante 5 min. Se eliminaron los sobrenadantes, los botones celulares se suspendieron en medio de cultivo suplementado, y se homogenizó para obtener la suspensión celular de la cual se tomaron alícuotas para realizar los conteos celulares. El conteo celular se

realizó en suspensiones teñidas en relación 1:1, bajo microscopio óptico, usando una cámara de Neubauer y calculando el número de células viables por mL multiplicando (número de células/ 0,1 mm<sup>3</sup>) \* (factor de conversión) \* (factor de dilución) = número de células \* 10<sup>4</sup> \* 2.

#### 4.3.1.4. Evaluación de la migración celular (*Scratch assay*)

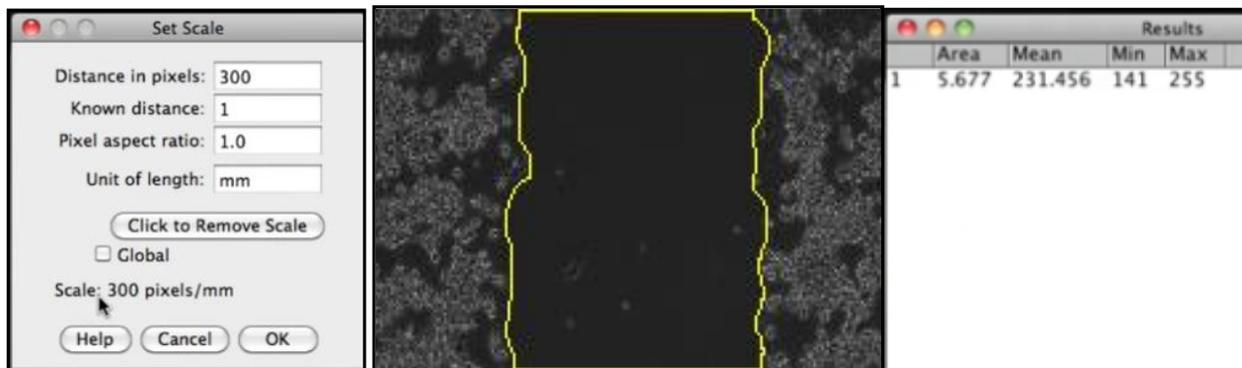
Se llevó a cabo el ensayo de “rasguño” sobre monocapas celulares. Los queratinocitos epidérmicos se cultivaron en placas de 12 pozos hasta alcanzar una confluencia del 95 – 100 % (Haas *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2012). Las monocapas se lavaron con PBS y luego se realizó una herida de 0.5 cm en la monocapa celular, a lo largo del diámetro del pozo, usando una punta amarilla de micropipeta y con ayuda de una plantilla con líneas de 0.5 cm que se colocó debajo de la placa (Fig. 4-7). Las células desprendidas *post* herida se retiraron con PBS.



**Figura 4-7. Ensayo “cierre de rasguño”.** Células HaCat cultivadas hasta confluencia del 95 – 100%. Rasguño sobre cada monocapa y captura de imágenes en los tiempos 0, 3, 6 y 9 h *post* rasguño, en presencia de las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II, ensayadas a tres concentraciones por triplicado.. Imágenes capturadas en aumento 10x bajo microscopio invertido Leica DM IL, con condensador S40/apertura 0.45, deslizador S40-slider 11521253 B7 01 y adaptador de montaje de cámara C-Mount 0.70x; usando el programa LAS v4.5 aplicación *Leica LAS Core*.

Luego, las células adheridas se incubaron en presencia de las lectinas LDG-I, LDG-II o LGL-II, en tres concentraciones que no afectaron la viabilidad celular. Se capturaron imágenes en los tiempos 0, 3, 6 y 9 h *post* realización de rasguño, comparando las tasas de migración celular en presencia y ausencia de las lectinas por determinación del ancho del rasguño. Se capturaron en promedio siete

fotos a lo largo de cada rasguño por tiempo de control, por concentración de lectina y por triplicado, y fueron analizadas con el programa Image J (Fig. 4.8).



**Figura 4.8. Análisis de imagen de rasguño de monocapa.** El área del rasguño se trazó manualmente como se muestra en la figura. El programa arroja el dato del área y de la altura. El ancho de la herida se calculó dividiendo el dato de área sobre el dato de altura en cada caso. Promedio de fotos analizadas/lectina = 7 fotos x 3 (triplicado) x 4 tiempos (0, 3, 6 y 9 h) x 4 concentraciones (incluida concentración cero) = 336 fotos/lectina

#### 4.3.1.5. Expresión endógena del factor de crecimiento epidérmico

La acumulación del factor del crecimiento epidérmico EGF en sobrenadantes celulares se evaluó luego de 24 horas de incubación de células HaCat en presencia de las lectinas. Para la obtención de los sobrenadantes celulares se siguió una metodología modificada de Timoshenko *et al* (2010). Las células HaCat se cultivaron en placas de 12 pozos hasta alcanzar un 80-90% de confluencia, y luego se incubaron en presencia de las lectinas (10 µg/mL) en medio de cultivo DMEM sin suero y sin antibióticos, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>; durante 24 h, por ser ese tiempo de control en el que se obtuvieron los mayores valores de absorbancia durante los ensayos de viabilidad celular. Los sobrenadantes celulares se colectaron en alícuotas de 0,5 mL y se congelaron a -30°C hasta su uso posterior. La determinación cuantitativa del factor EGF en los sobrenadantes se llevo a cabo por ensayo de ELISA de sándwich en fase sólida, usando un kit para el EGF humano y siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Cat. # KHG0061). Durante la primera incubación de 2 h a temperatura ambiente, el EGF presente en los sobrenadantes es capturado por un anticuerpo inmovilizado en los pozos de la placa (Fig. 4-9). Luego de lavados consecutivos con buffer de lavado, se adiciona a los pozos otro anticuerpo específico, esta vez monoclonal biotinilado que se une al EGF capturado durante la primera incubación. Luego de la segunda incubación de 1h con el anticuerpo biotinilado y de los lavados para remover el exceso, se adiciona a los pozos estreptavidina-peroxidasa. Esta enzima se une al anticuerpo biotinilado durante 30 min de incubación, completando el sándwich de cuatro miembros. Luego de los lavados para remover la enzima no unida, se adiciona la solución del sustrato tetrametil bencidina estabilizada con cromógeno, la cual se une a la enzima durante 25 min de incubación. El líquido en los pozos se torna de color azul. Posteriormente, se adiciona la solución de parada a cada pozo, y el color azul de la solución cambia a color amarillo. La intensidad del producto coloreado es directamente proporcional a la concentración de EGF humano en la muestra. Se realiza la lectura de densidad óptica a 450 nm usando como blanco de la lectura la absorbancia en los pozos que contienen solo cromógeno estabilizado y solución de parada; y se hallan las concentraciones de EGF en las

muestras usando la ecuación de la curva estándar de densidades ópticas de concentraciones conocidas de EGF.

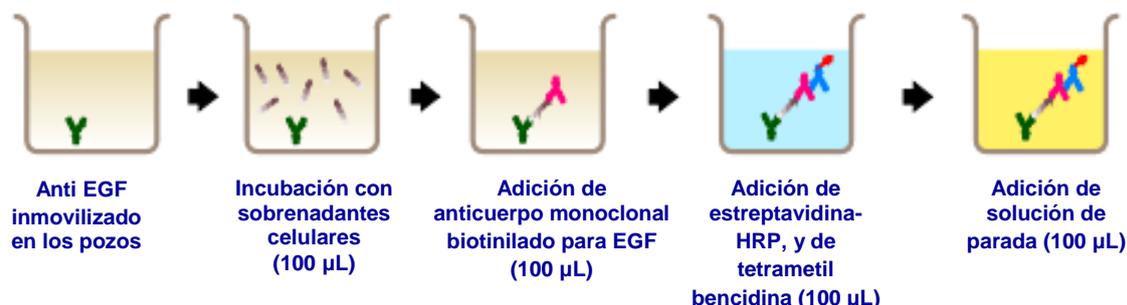


Figura 4-9. Ensayo ELISA para EGF humano. Imagen recuperada del manual Invitrogen, Cat. # KHG0061.

#### 4.3.1.6. Expresión y activación de quinasas en presencia de las lectinas

Las células se cultivaron en presencia de EGF solo (20 ng/mL), o EGF y lectina, durante 0, 5, 10, 30 y 60 min. Las lectinas se usaron a 3.12 µg/mL, concentración no citotóxica según MTT y conteo por azul de tripán. En el tiempo de control respectivo, se produjeron los lisados celulares usando 50 µL de buffer de lisis por cada  $1 \times 10^6$  células (Pullar *et al*, 2006). Los lisados se transfirieron a tubos de 1.5 mL, incubados sobre hielo durante 20 min, y luego se centrifugaron a 14000 g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se guardaron a -30°C. El buffer de lisis celular consistió en PBS con IGEPAL CA-630 al 1% (detergente no iónico y no denaturante); ortovanadato de sodio  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1 mM (inhibidor de fosfatasas); ácido etilendiaminotetraacético EDTA 1 mM (agente quelante); leupeptina 10 µg/mL (inhibidor de cisteína- serina- y treonina- proteasas); fenilmetilsulfonil fluoruro 1 mM (PMSF, inhibidor de algunas serina proteasas) y coctel de inhibidores de proteasas ácidas y aminopeptidasas para uso en células y extractos de tejidos de origen mamífero 10 µL/mL (Sigma-Aldrich, P8340, incluido justo antes de uso). Se realizaron ensayos de inmunodetección por WB, luego de la transferencia de las bandas de los lisados celulares a membranas de nitrocelulosa, con el fin de detectar quinasas involucradas en proliferación o migración; y  $\alpha$ -tubulina como proteína constitutiva. La transferencia se realizó usando buffer Towbin para proteínas menores a 100 kDa y buffer Towbin + SDS 0.025% para proteínas mayores a 100 kDa (según recomendación en Guías *Biorad*); durante 20 min a 25 V, 200 mA, 5W. Los anticuerpos se usaron a la dilución inicial recomendada por los proveedores (Tabla 4-1).

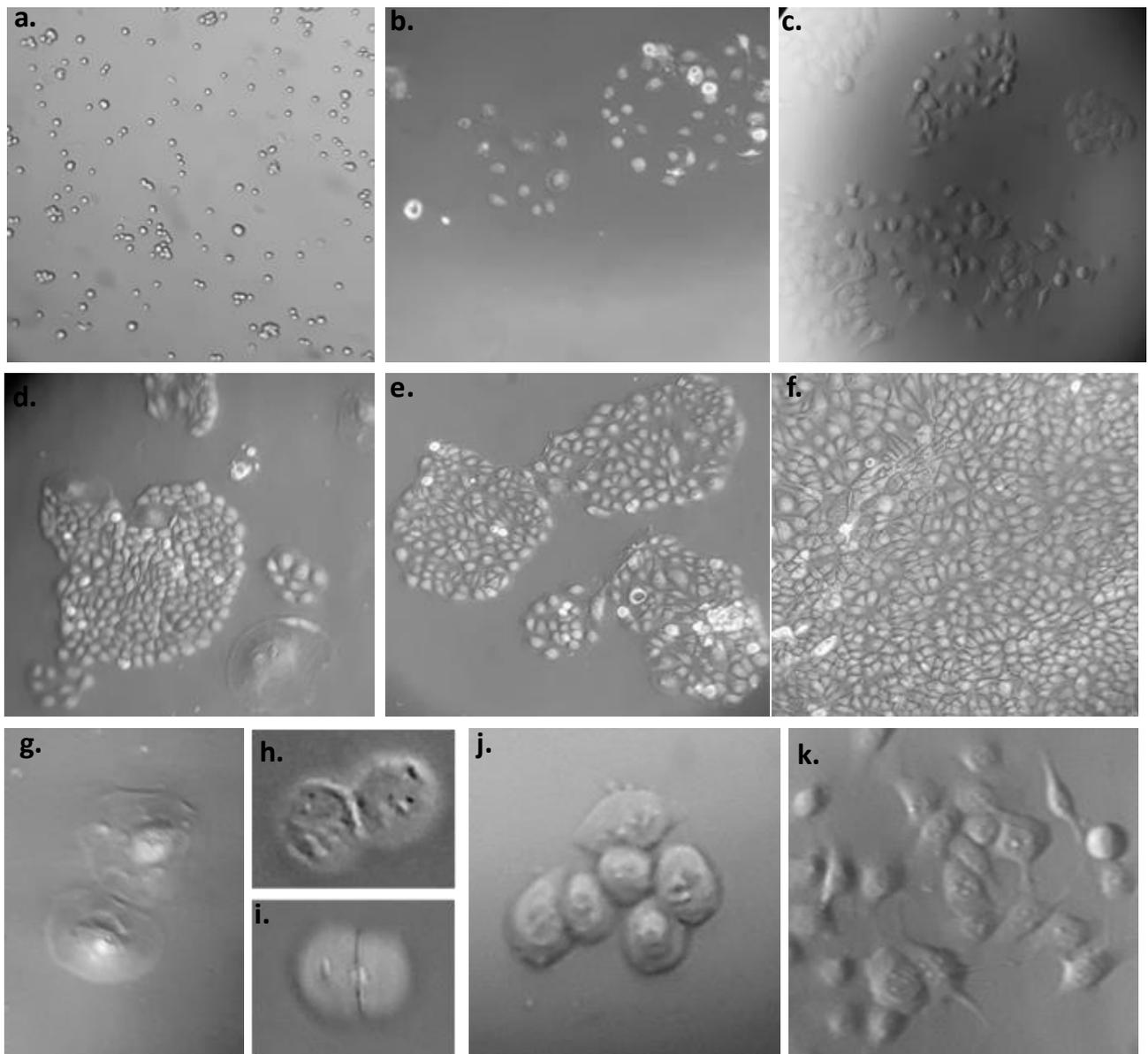
**Tabla 4-1. Anticuerpos usados en la inmunodetección de proteínas en lisados de queratinocitos humanos HaCat**

Anticuerpo	Epitope	Dilución recomendada para WB	Especie detectada	MW de proteína detectada	Cantidad en vial	Marca/Referencia
mAb EGFR	aa 129-160 N-terminal extracelular humano	Inicial 1:100; rango 1:100 - 1:1000.	ratón, rata, humano	170 kDa	1 mL; 200 µg/mL	sc-365829; D8
Ab ERK 1/2	aa 101-172 cerca del N-terminal humano	Inicial 1:100; rango 1:100 - 1:1000.	ratón, rata, humano, ave	42 kDa 44 kDa	1 mL; 200 µg/mL	sc-292838; H72
mAb pTyr	fosfotirosina	1:2000	Rango amplio de especies	/	300 µg (40 WB)	Cell Signalling, 9411
Ab pSer/Thr	fosfoserina	1:1000	Rango amplio de especies	/	100 µL (10 WB)	Cell Signalling, 9631
mAb α-tubulina	aa 149-448 α-tubulina humana	Inicial 1:200; rango 1:100 - 1:1000	ratón, rata, humano	50,14 kDa	200 µg/mL	sc-5286; B7
Goat anti-mouse IgG-HRP	cadena de Ig	Inicial 1:2000; rango 1:500 - 1:10000.	ratón	/	0.5 mL; 400 µg/mL	sc-2005
Goat anti-rabbit IgG HRP	nr	1:2000	Rango amplio de especies	/	2 mL	Sigma-Aldrich AP307P

## 4.4. Resultados

### 4.4.1. Viabilidad y proliferación de queratinocitos epidérmicos humanos de la línea HaCat en presencia de las lectinas

Después del descongelamiento, las células HaCat pasaron de una forma esferoidal no adherida (Fig. 4-10a), a una forma expandida sobre el sustrato a las 7 h de cultivo (Fig. 4-10b y g). Pasadas las 24 h, los queratinocitos estaban completamente adheridos, y mostrando prolongaciones citoplásmicas (Fig. 4-10c y k). Se observó la formación de pequeños grupos celulares (Fig. 4-10j) con evolución paulatina hacia monocapas, con una confluencia cercana al 100% a los cinco días de cultivo (Fig. 4-10d-f), fenotipo que representa el comportamiento normal de células adherentes que forman monocapas celulares. Bajo aumento 40x se observaron células en etapas del ciclo celular (Fig. 4-10h-i).



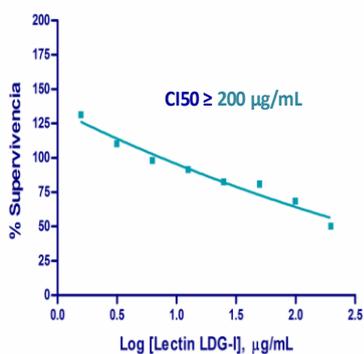
**Figura 4-10. Cultivo de queratinocitos epidérmicos humanos HaCat.** a) Células recién descongeladas. b) Células con 7 h de cultivo. c) Células a las 24h de cultivo, adheridas al sustrato y con prolongaciones celulares. d y e) Formación paulatina de monocapas aisladas de células poligonales. f) Formación de una sola monocapa, confluencia cercana al 100% en frasco a los 5 días de cultivo. Acercamientos: g) Extensión inicial pasiva de la célula sobre el sustrato (*early spreading*). h-i). Células en telofase. j) Grupo aislado de células. k). Células con prolongaciones. Imágenes capturadas bajo microscopio invertido; a-f en aumento 20x; g-k en aumento 40x, y adicional 2x adicional con dispositivo celular.

Se evaluó la viabilidad de células HaCat en presencia de tres lectinas de la tribu Diocleae (LDG-I y LDG-II de *D. grandiflora*; y LGL-II de *Galactia lindenii*), con diluciones consecutivas de lectina en el rango de concentraciones 200 - 1,56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y en los tiempos de control de 12, 24, 48 y 72 h, usando el método colorimétrico MTT. La escogencia del rango de concentraciones se tomó teniendo en cuenta estudios de lectinas usadas en varias líneas celulares normales probadas con MTT (Jaques *et al*, 2013; Ju *et al*, 2014; Liu *et al*, 2008; Sell *et al*, 2003; Singh *et al*, 2014; Wan *et*

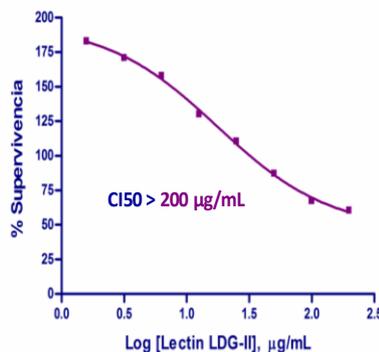
al, 2011). Las curvas dosis-respuesta obtenidas se muestran en la Fig. 4-11, y los datos de CI50 se registraron en la Tabla 4-2.

Las tres lectinas vegetales mostraron efectos sobre la viabilidad de los queratinocitos, dependiendo de la concentración. Usando el método MTT se observó que a la concentración más baja utilizada (1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de las tres lectinas, las células mostraron mayor actividad metabólica a las 12 y 24 h, en relación a las células control sin lectina (100%). Los porcentajes de viabilidad fueron de 131%; 183% y 175%, a las 12 h; y de 114%; 161% y 137% a las 24h, en presencia de LDG-I, LDG-II y LGL-II, respectivamente. El efecto de la lectina LDG-I no fue significativo en las demás concentraciones ni en los otros tiempos. LDG-I mostró disminución en la viabilidad celular en el rango de concentraciones 50-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 12 y 24h, y entre 25-200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 48 y 72h. En presencia de la lectina LDG-II, el aumento significativo del porcentaje de la viabilidad se observó hasta la concentración de 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 12h, hasta 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 24h y a 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 48h. Una disminución en la viabilidad celular en presencia de LDG-II se observó desde los 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hasta las 48h, y desde los 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 72h. La lectina LGL-II mostró aumento en la viabilidad celular en las dosis bajas a las 12 y 24h. En general, LGL-II mostró efectos citotóxicos con concentraciones CI50 más bajas, en los diferentes tiempos, en comparación con las dos lectinas de *D. grandiflora*. LGL-II disminuyó la viabilidad de los queratinocitos desde los 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 12h, desde los 12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 24h, y desde los 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a las 48h y 72h (Fig. 4-11 y Tabla 4-2).

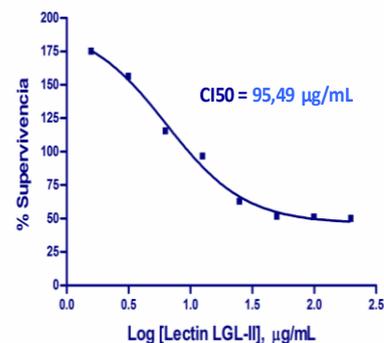
% Supervivencia de queratinocitos epidérmicos HaCat en presencia de lectina LDG-I (12h)



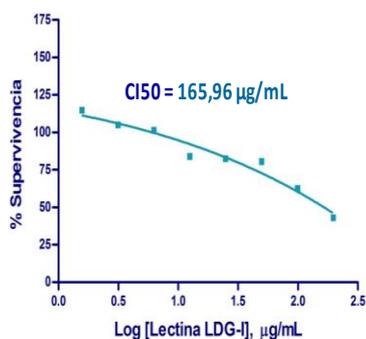
% Supervivencia de queratinocitos epidérmicos HaCat en presencia de lectina LDG-II (12h)



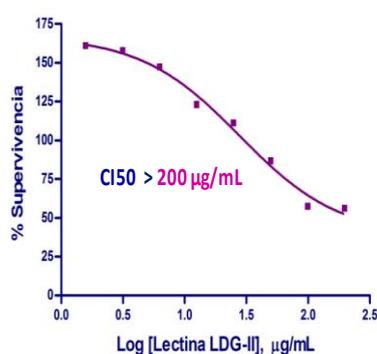
% Supervivencia de queratinocitos epidérmicos HaCat en presencia de lectina LGL-II (12h)



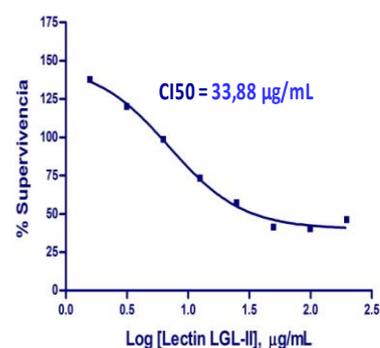
% Supervivencia de queratinocitos epidérmicos HaCat en presencia de lectina LDG-I (24h)

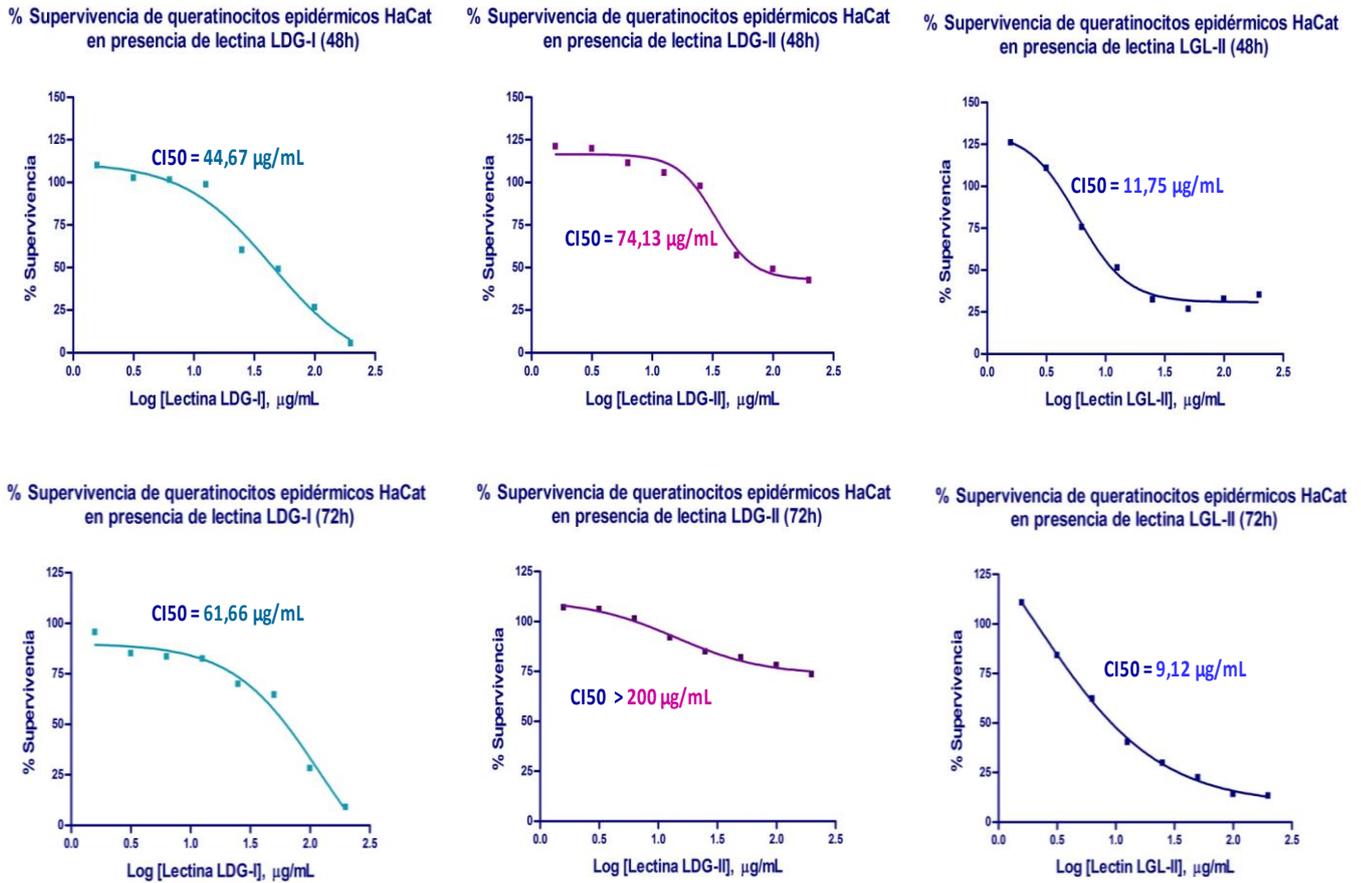


% Supervivencia de queratinocitos epidérmicos HaCat en presencia de lectina LDG-II (24h)



% Supervivencia de queratinocitos epidérmicos HaCat en presencia de lectina LGL-II (24h)



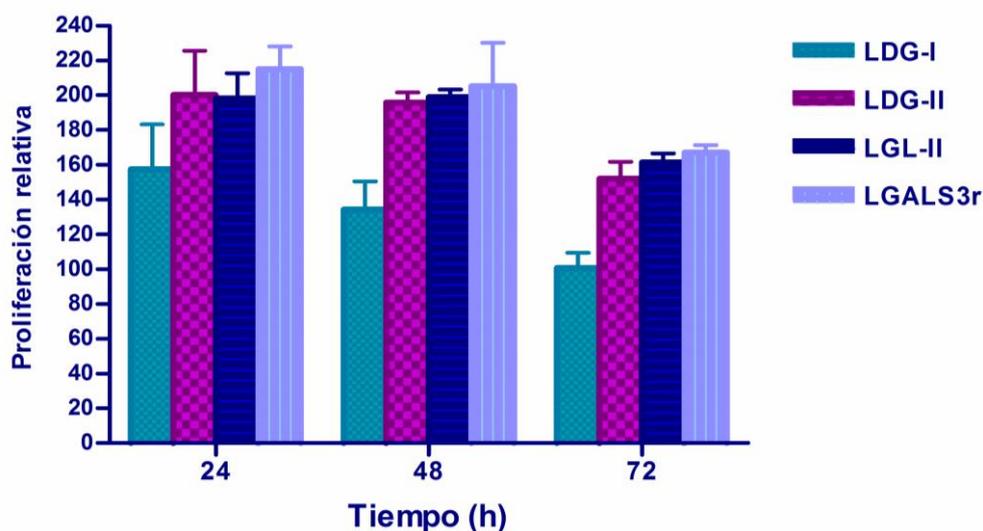


**Figura 4-11. Concentración CI50 de las lectinas sobre queratinocitos epidérmicos HaCat.** Células incubadas en presencia de lectina (1.56 - 200 µg/mL) por triplicado, durante 12, 24, 48 y 72h. Viabilidad estimada por MTT. Células sin tratamiento = viabilidad del 100%. CI50: concentración a la cual la supervivencia celular es del 50%, calculada con el programa GraphPad v7, partiendo de graficas XY de regresión no lineal correspondientes a curvas dosis-respuesta con pendiente variable. Los datos de CI50 son los inversos de los logaritmos en base 10 de las concentraciones que dieron el 50% de supervivencia celular, a partir de los datos obtenidos conocidos y de los datos interpolados en la curva, para cada lectina. LDG-I y LDG-II: lectinas de *D. grandiflora*, LGL-II: lectina de *G. lindenii*.

Tabla 4.2. Concentración CI50 de las lectinas sobre queratinocitos epidérmicos humanos HaCat			
Tiempo	Lectina (µg/mL)		
	LDG-I	LDG-II	LGL-II
12 h	≥ 200	> 200	95.49
24h	165.96	~ 200	33.88
48h	44.67	74.13	11.75
72h	61.66	> 200	9.12

LDG-I y LDG-II: lectinas de *D. grandiflora*, LGL-II: lectina de *G. lindenii*. CI50: concentración de lectina en la que se observa el 50% de viabilidad celular, hallada usando GraphPad v7.

Para realizar el ensayo del conteo celular se escogió la concentración de 1.5 µg/mL (Fig. 4-12), teniendo en cuenta que a ésta concentración la presencia de ninguna de las tres lectinas vegetales disminuyó significativamente la viabilidad, y además la actividad metabólica se vió aumentada en relación a las células cultivadas en ausencia de lectina. En éste ensayo de conteo celular también se usó galectina-3 humana recombinante (LGALS3r), la cual ha mostrado estimulación de la proliferación celular cuando se usa de manera exógena en células normales desde 1 µg/mL, a través de los métodos de conteo celular e incorporación de nucleósidos, así como no afecta la viabilidad según ensayos de MTT (Inohara *et al*, 1998; Wan *et al*, 2011). En la Tabla 4-3 se observan los porcentajes de viabilidad/proliferación celular obtenidos con los ensayos MTT y el conteo con azul de tripán, respectivamente. Los resultados de ambas metodologías muestran que las lectinas vegetales tipo II (LDG-II y LGL-II) no disminuyen la viabilidad celular y además poseen un efecto proliferativo mayor que aquel observado para la lectina de tipo I (LDG-I), a una concentración de 1.5 µg/mL. El conteo de células que habían sido cultivadas en presencia de LGALS3r mostró que ésta lectina, al igual que las lectinas LDG-II y LGL-II, promueve la proliferación de las queratinocitos epidérmicos humanos HaCat a 1.5 µg/mL, en concordancia con la información encontrada en literatura sobre los efectos de dicha galectina en queratinocitos de mamíferos, como se mencionó anteriormente.



**Figura 4-12. Proliferación relativa de queratinocitos HaCat en presencia de lectinas a 1.5 µg/mL.** Células sembradas en placas de 12 pozos ( $5 \times 10^4$  queratinocitos/pozo), en presencia de lectinas durante 24, 48 y 72 h, por triplicado. Luego de tripsinización, se realizó el conteo de células viables que excluyen el colorante azul de tripán. Las placas de cada tiempo evaluado tenían 12 pozos de células sin tratamiento (control), cuyo promedio de proliferación se tomó como el 100%. Se hallaron los porcentajes de proliferación relativa al control sin lectina (100%) en cada tiempo. Los datos representan la media  $\pm$  D.E. LDG-I y LDG-II, lectinas de *D.grandiflora*; LGL-II: lectina de *G. lindenii*, LGALS3r: galectina-3 humana recombinante.

Tabla 4-3. Supervivencia celular por los métodos MTT y azul de tripán con lectinas a 1.5 µg/mL

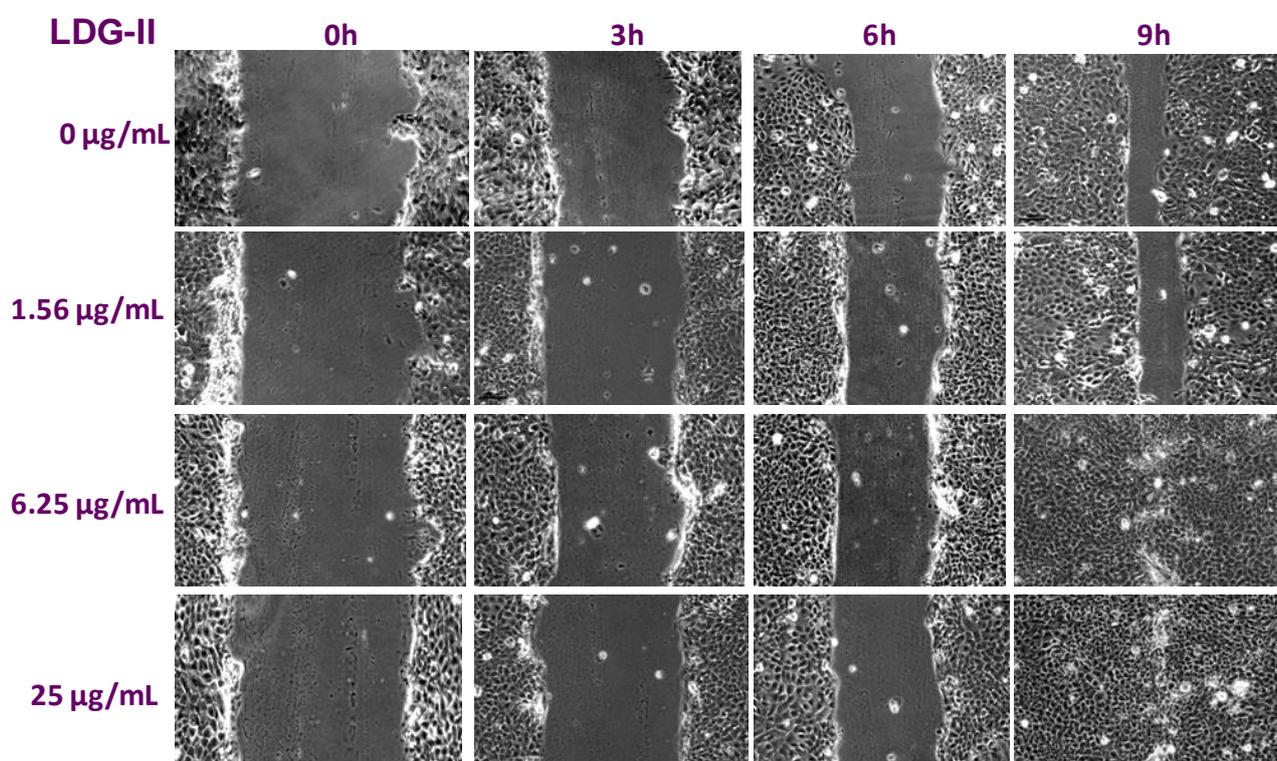
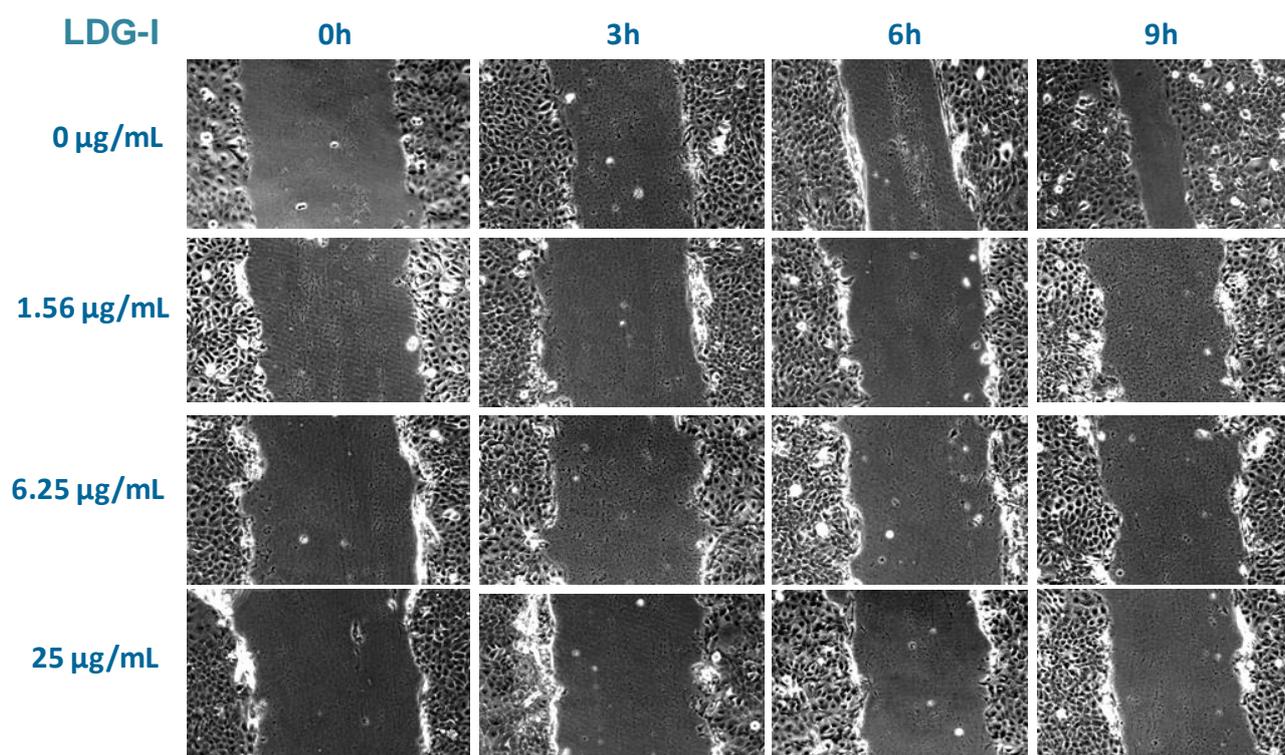
Lectina	Tiempo	% Supervivencia celular en presencia de lectina a 1.5 µg/mL	
		MTT	Azul tripan
LDG-I	24 h	114 ± 13	158 ± 26
	48 h	110 ± 14	134 ± 16
	72 h	96 ± 9	101 ± 9
LDG-II	24 h	161 ± 21	200 ± 26
	48 h	121 ± 15	196 ± 6
	72 h	107 ± 12	152 ± 10
LGL-II	24 h	137 ± 11	198 ± 15
	48 h	126 ± 22	199 ± 4
	72 h	111 ± 7	161 ± 5
LGALS3r	24 h	nd	215 ± 13
	48 h	nd	205 ± 25
	72 h	nd	167 ± 4

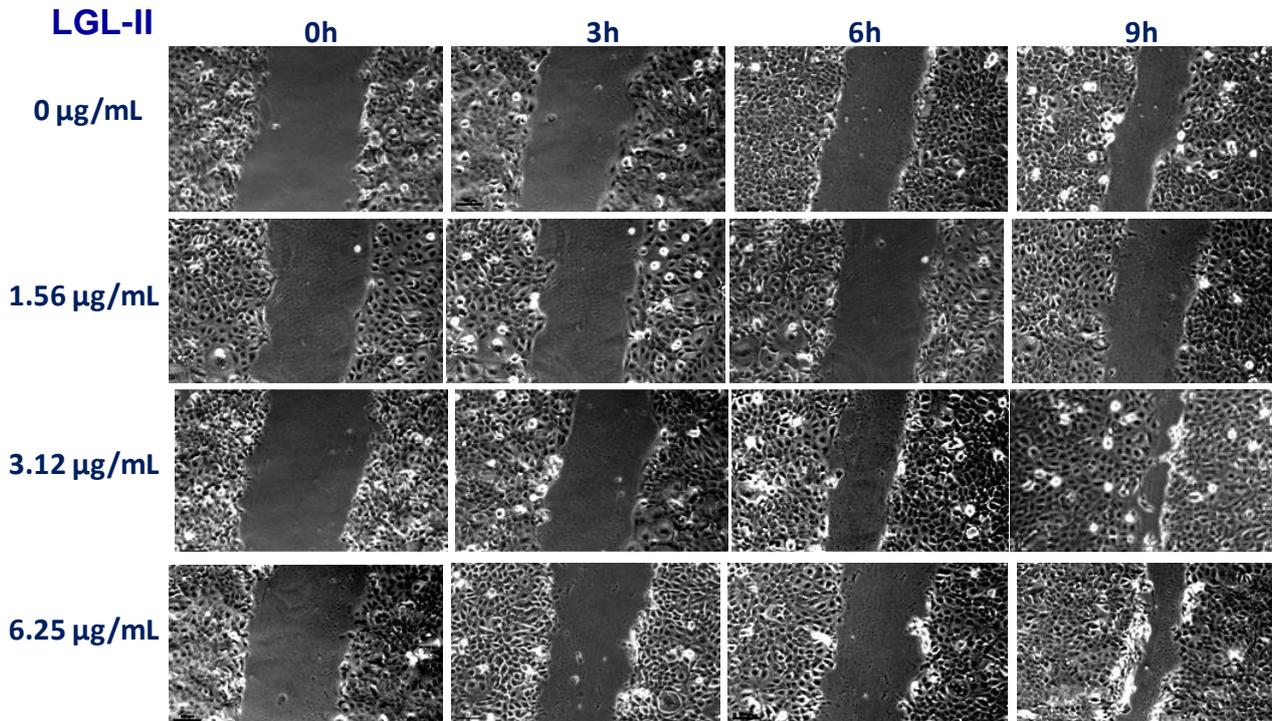
LDG-I y LDG-II, lectinas de *D.grandiflora*; LGL-II: lectina de *G. lindenii*, LGALS3r: galectina-3 humana recombinante; nd: no determinado. Datos promedio (media ± D.E).

#### 4.3.3. Migración celular en presencia de lectinas

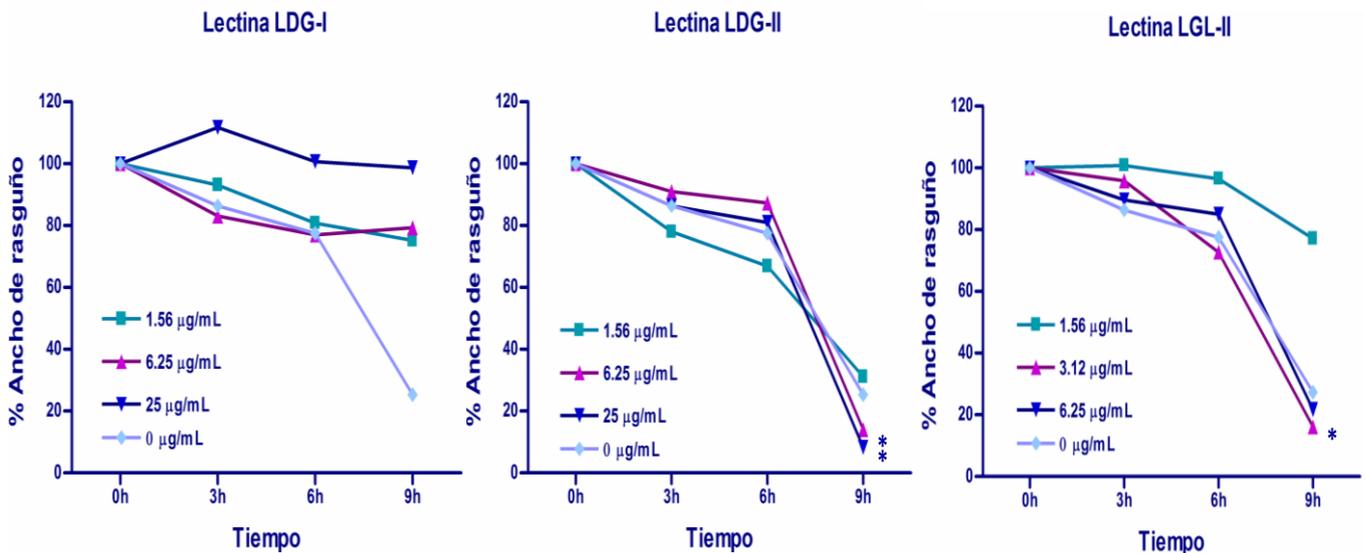
Se seleccionaron tres concentraciones de cada lectina, con las cuales no se vió disminución significativa de la viabilidad celular a las 12 h, según los resultados obtenidos por MTT. Las tres concentraciones usadas para las dos lectinas de *D.grandiflora* fueron 1,56 µg/mL; 6,25 µg/mL y 25 µg/mL, lo anterior teniendo en cuenta que a estas mismas concentraciones la galectina-3 exógena ha mostrando efectos sobre la migración de queratinocitos humanos y murinos (Kariya *et al*, 2010; Liu *et al*, 2012; Saravan *et al*, 2009). Por otro lado, debido a que la lectina LGL-II afectó significativamente la viabilidad celular a las 12h a partir de 25 µg/mL, las concentraciones seleccionadas para esta lectina fueron 1,56 µg/mL; 3,12 µg/mL y 6,25 µg/mL.

La presencia de la lectina LDG-I inhibió la migración celular de los queratinocitos en todo el rango de concentraciones y tiempo observados; mientras que, las lectinas tipo II, *i.e.*, LDG-II y LGL-II, promovieron el cierre de la herida en la monocapa de queratinocitos HaCat a las 9h, a concentraciones de 6,25 µg/mL y 25 µg/mL; y 3,12 µg/mL y 6,25 µg/mL, respectivamente. La promoción de la migración de LDG-II fue proporcional a su concentración, mientras que para LGL-II se encontró que a 3,12 µg/mL el cierre de la herida fue mayor que aquel a 6,25 µg/mL; y que a la concentración de 1,56 µg/mL LGL-II inhibió la migración celular (Figs. 4-13 y 4-14).



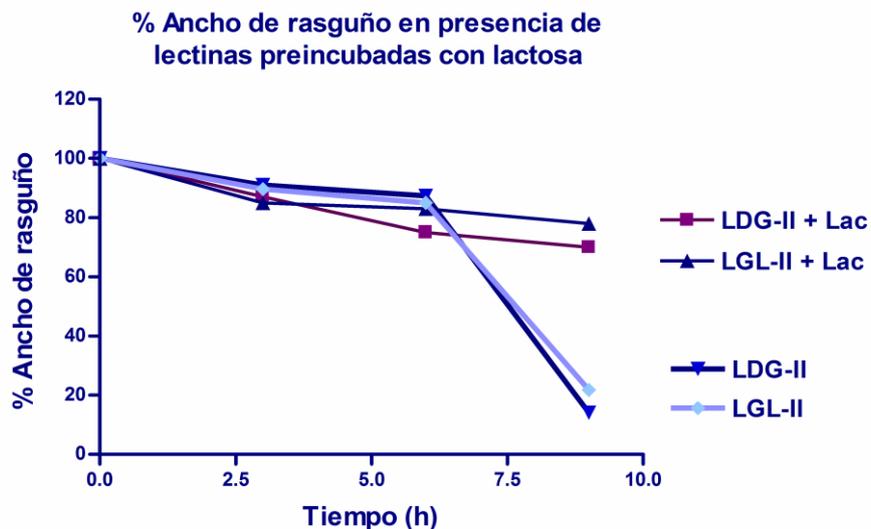
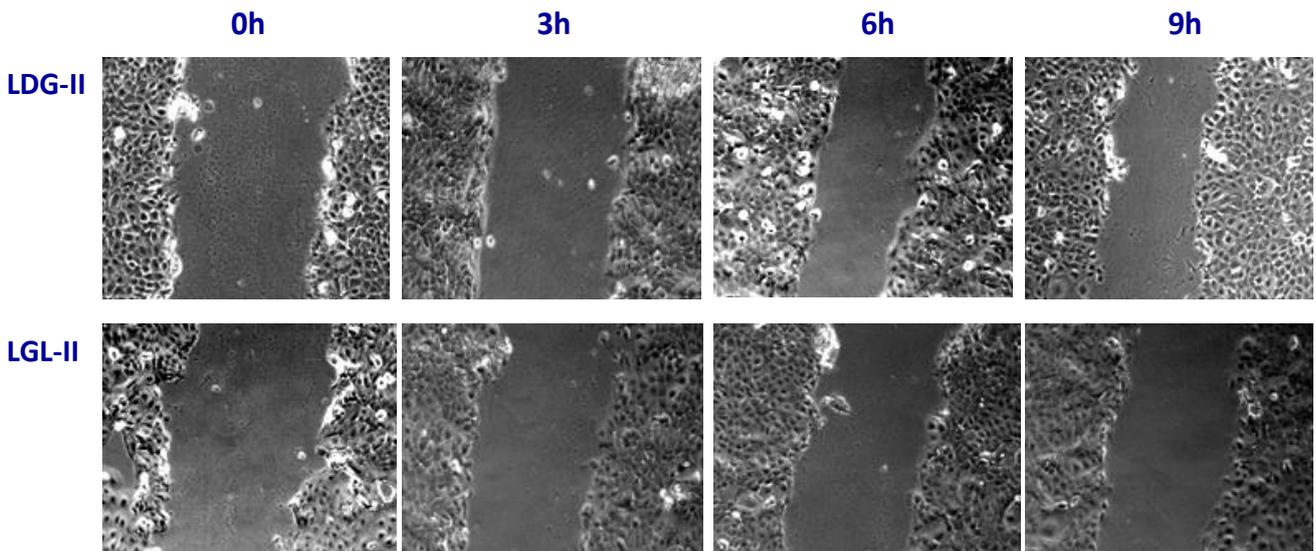


**Figura 4-13. Efecto de las lectinas sobre la migración de queratinocitos epidérmicos humanos HaCat.** Células HaCat cultivadas en placas de 12 pozos hasta confluencia del 95 – 100 %. Luego, se realizó un rasguño de 0.5 cm sobre cada monocapa y las células se cultivaron en presencia de las lectinas. Imágenes capturadas en aumento 10x bajo microscopio invertido Leica DM IL, con condensador S40/apertura 0.45, deslizador S40-slider 11521253 B7 01 y adaptador de montaje de cámara C-Mount 0.70x; usando el programa LAS v4.5 aplicación Leica LAS Core.

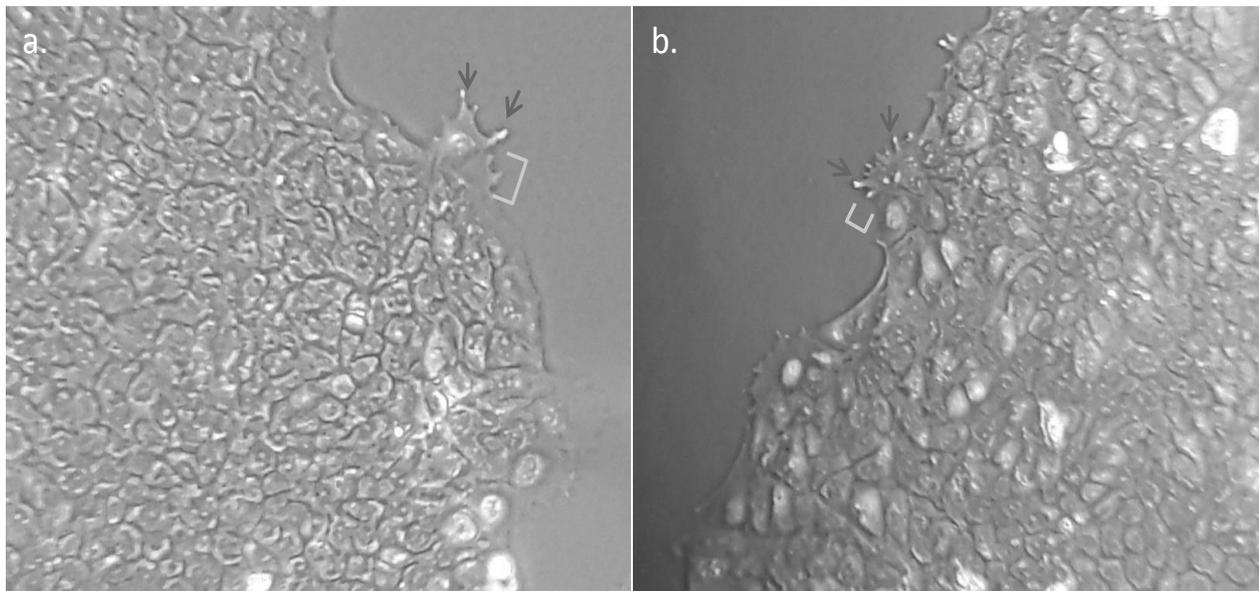


**Figura 4-14. Porcentaje de ancho del rasguño** en los tiempos 0, 3, 6 y 9 h *post* rasguño, en presencia de las lectinas LDG-I, LDG-II y LGL-II, a las concentraciones indicadas (0h: ancho 100%), por triplicado, calculado a partir de la división del área sobre el altura usando el programa Image J como se describe en la metodología. Prueba *t-student* pareada con 95% de confianza. \*Diferencia estadísticamente significativa en el efecto de cierre de herida con relación a control 0 µg/mL,  $p < 0.05$ .

Con el fin de observar si el efecto migratorio de las lectinas LDG-II y LGL-II esta mediado por su interacción con carbohidratos, se realizaron ensayos de migración en presencia de las lectinas preincubadas con lactosa (Lac) dado que se han observado inhibición de efectos de LDG-II y LGL-II en presencia de dicho disacárido (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005). Antes de incubar los cultivos celulares en presencia de las lectinas LDG-II y LGL-II (6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), éstas fueron incubadas durante 30 min en PBS-Lac 50 mM, a 37°C. La presencia del disacárido inhibió en gran medida el efecto de ambas lectinas vegetales sobre la migración de los queratinocitos (Fig. 4-15). También se observaron lamelipodia y filopodia en células de los bordes de las monocapas celulares cuando se cultivaron en presencia de estas dos lectinas tipo II de la Tribu Diocleae de la familia de leguminosas (Fig. 4-16).



**Figura 4-15. Migración de queratinocitos en presencia de las lectinas LDG-II y LGL-II preincubadas o no con lactosa.** Arriba: Antes de incubar los cultivos celulares en presencia de las lectinas LDG-II y LGL-II (6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), éstas fueron incubadas 30 min en PBS-Lac 50 mM, a 37°C. Abajo: Porcentaje de ancho del rasguño en presencia de lectinas preincubadas con o sin Lac (0 h: ancho 100%).



**Figura 4-16. Protuberancias en la membrana celular de queratinocitos HaCat cultivados en presencia de las lectinas LDG-II y LGL-II.** Imágenes 40x de borde de monocapa celular. a.) LDG-II (6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y b.) LGL-II (3.12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Corchete: lamelipodia; flechas: filopodia.

#### 4.3.4. Secreción endógena del factor EGF en presencia de las lectinas

Dado que en cultivos de queratinocitos HaCat en presencia de las lectinas vegetales y de la galectina LGALS3r humana, se vieron efectos sobre la proliferación; y que el factor de crecimiento epidérmico EGF ha mostrado tener efecto en la proliferación en células HaCat (Hoesl *et al*, 2018), y en la modulación de la migración celular (Boscher & Nabi, 2013; Shi & Wang, 2018); mediante ensayo de ELISA se evaluó si la producción del factor EGF podría ser estimulada por la presencia exógena de alguna(s) de esas lectinas. En primer lugar se hallaron las concentraciones de proteína soluble verificándose que no existió diferencia significativa en la cantidad de proteína total en los sobrenadantes de células tratadas con diferentes lectinas. Luego de realizar la lectura de absorbancia, se hallaron las concentraciones de EGF en las muestras usando la ecuación de la curva estándar (Anexo IX), realizada con las densidades ópticas de un rango de concentraciones (0 – 250  $\text{pg}/\text{mL}$ ) del EGF humano recombinante. La producción del EGF por células HaCat tratadas o no tratadas con lectinas se mantuvo dentro de un rango de concentraciones de 1.7 – 5.3  $\text{pg}/\text{mL}$ , dependiendo de la condición. Luego de 24 h, los queratinocitos incubados en presencia de la LGL-II produjeron alrededor de 2.2 veces de EGF con respecto a los cultivos de células HaCat sin lectina, mientras que la presencia de LDG-I, LDG-II o de LGALS3r humana, no produjo un aumento significativo en la concentración del EGF (Tabla 4-4).

**Tabla 4-4. Factor de crecimiento epidérmico (EGF) en sobrenadantes de queratinocitos HaCat**

Lectina	Proteína total en sobrenadantes (mg/mL ± D.E)	EGF en sobrenadantes (pg/mL ± D.E)
Sin lectina	1,602 ± 0,490	2,01 ± 0,241
LDG-I	1,577 ± 0,481	2,19 ± 0,904
LDG-II	1,609 ± 0,356	2,25 ± 0,248
LGL-II	1,492 ± 0,344	4,42 ± 0,863 ***
LGALS3r	1,418 ± 0,143	2,43 ± 0,868

\*\*\* Diferencia significativa en comparación a sobrenadantes celulares incubados sin lectina,  $p < 0.05$ .

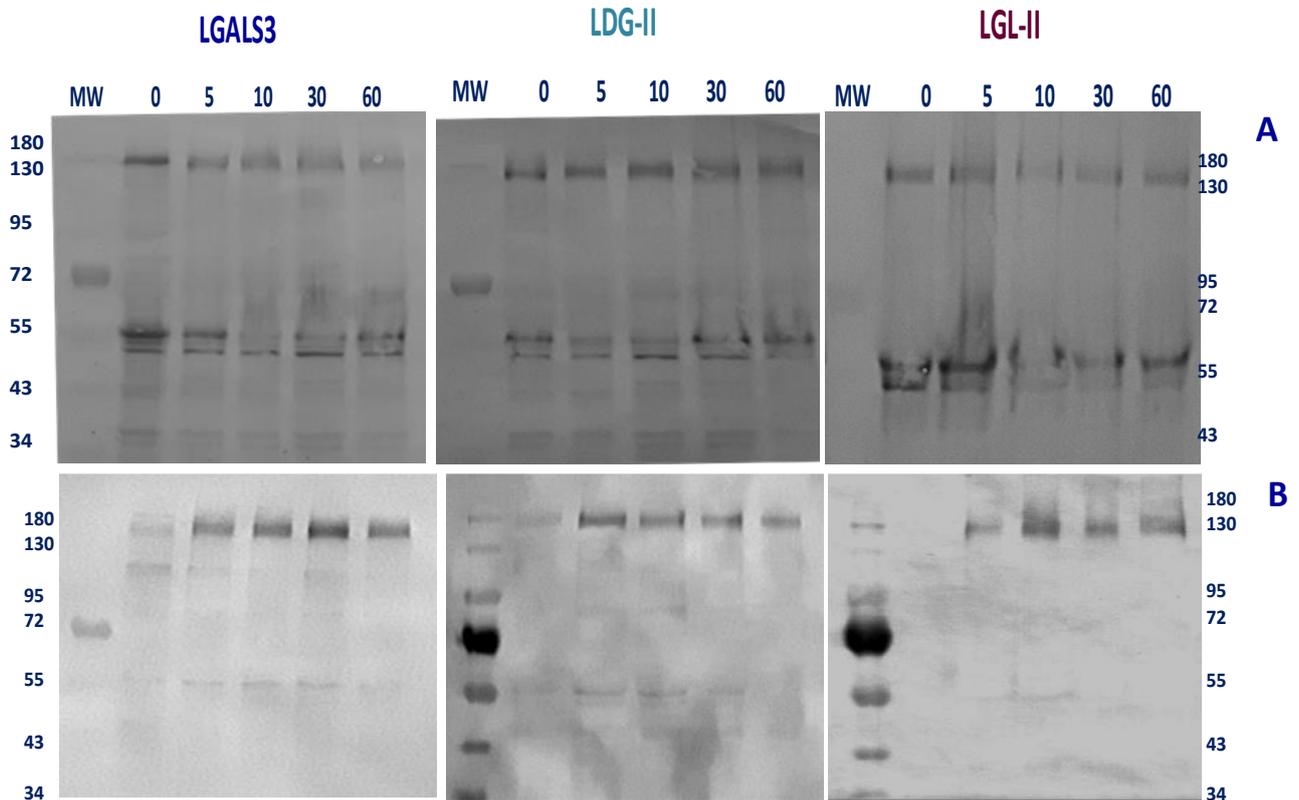
#### 4.3.5. Expresión o activación de quinasas en presencia de las lectinas

La activación de quinasas específicas por fosforilación juega un papel importante en los procesos de señalización (Figs. 4-3 y 4-4). En el presente trabajo se observó que las lectinas vegetales LDG-II y LGL-II promovieron los procesos de migración y proliferación celular, mientras que LDG-I solo fue proliferativa a la menor concentración usada (1.5  $\mu\text{g/mL}$ ) e inhibió la migración en todas las condiciones probadas (Figs. 4-11 a 4-14). La ocurrencia de ambos procesos en queratinocitos es necesaria en la reepitelización de heridas (Friedrichs *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Saravanan *et al.*, 2009), por ello, los ensayos de expresión o activación de quinasas se realizaron en presencia de las dos lectinas tipo II de la tribu Diocleae; y de la LGALS3 humana como control positivo, según la literatura consultada.

En los ensayos de inmunodetección, usando el anticuerpo monoclonal contra el receptor EGFR humano; en los lisados celulares en los tiempos evaluados entre 0 – 60 min, se observó la expresión de una banda que se corresponde con el peso esperado para el receptor (170 kDa) en presencia de las tres lectinas probadas; este anticuerpo además interactuó con bandas alrededor de los 55 kDa (Fig. 4-17A). Dichas bandas menores observadas podrían deberse a proteólisis del receptor; aunque hasta ahora se ha encontrado en la revisión bibliográfica que en cultivos celulares, el EGFR puede sufrir escisión proteolítica en su dominio extracelular generándose dos fragmentos truncados de 135 y 110 kDa (Chen M, *et al*; 2008).

La incubación con el anticuerpo monoclonal contra tirosina fosforilada (mAb p-Y-100) permitió observar la banda correspondiente al receptor fosforilado (pEGFR) (Fig. 4-17B); y la expresión del pEGFR mostró un máximo a los 30 min con LGALS3, a los 5 min con LDG-II y a los 10 min con LGL-II (Tabla 4-5). Usando el mAb p-Y-100 también se observaron bandas alrededor de 55 kDa, aunque más tenues que las del mismo peso molecular detectadas con el mAb EGFR. El proveedor del mAb p-Y-100 (*Cell Signaling* # 9411) indica que este anticuerpo puede unirse a fosfotirosina de una manera independiente de las secuencias de aminoácidos circundantes. El receptor EGFR humano puede fosforilarse en las tirosinas Y998, Y1016, Y1069, Y1092, Y1110, Y1172 y Y1197 (Uniprot P00533). En el folleto se indican otras proteínas con las que también podría interactuar el

mAb p-Y100; entre ellas esta la serina/treonina proteína quinasa AKT (56 kDa), la cual puede sufrir fosforilación activadora en los residuos Y176 y Y474 (Uniprot KB - P31749 - AKT1\_HUMAN). En el futuro se deben realizar ensayos de inmunodetección usando anticuerpo específico contra AKT para verificar su expresión/activación en presencia de las lectinas.



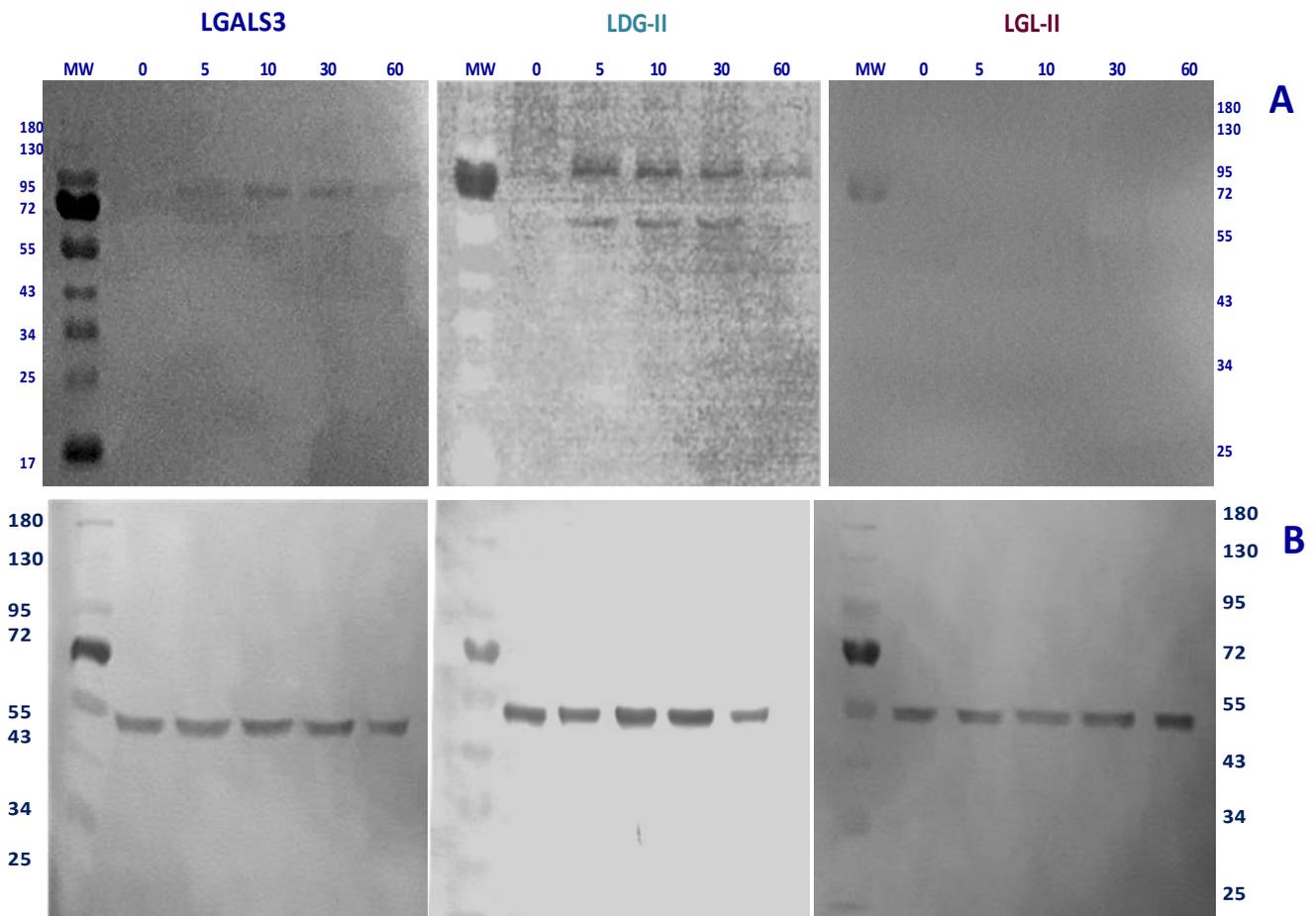
**Figura 4-17. Inmunodetección con anticuerpos contra EGFR total y contra tirosina fosforilada (p-Tyr).** Lisados celulares (15  $\mu$ g/pozo) obtenidos luego de 0, 5, 10, 30 o 60 min de incubación con las lectinas fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con anticuerpo contra EGFR total (A) y contra p-Tyr (B). MW: patrones de pesos moleculares.

Tabla 4-5. Densitometría para EGFR fosforilado y EGFR total				
Lectina	Tiempo (min)	% área pEGFR	% área EGFR total	pEGFR/EGFR total
LGALS3	5	20,360	16,858	1,119
	10	20,213	18,199	1,111
	30	30,197	20,389	<b>1,721</b>
	60	17,800	17,548	1,014
LDG-II	5	24,917	17,633	<b>1,413</b>
	10	13,620	22,433	0,607
	30	21,378	22,883	0,934
	60	18,379	16,960	1,084
LGL-II	5	13,656	34,806	0,392
	10	37,531	11,163	<b>3,362</b>
	30	22,682	12,370	1,834
	60	26,132	17,180	1,521

Los porcentajes de área de las bandas correspondientes al receptor total y al receptor fosforilado, en cada uno de los tiempos evaluados, se hallaron usando el programa Image J. LGALS3: galectina-3 humana; LDG-II: lectina tipo II de *D. grandiflora*; LGL-II: lectina tipo II de *G. lindenii*; EGFR: receptor del factor del crecimiento epidérmico; pEGFR: receptor EGFR fosforilado

Por otro lado, con el anticuerpo contra serina/treonina fosforilada (p-Ser/Thr; *Cell Signaling* # 9631) en extractos cultivados en presencia de LGALS3 y LDG-II se observan bandas en el área de los marcadores de peso entre 55 y 95 kDa, mientras que en presencia de LGL-II no se observaron bandas (Fig. 4-18A). Este anticuerpo policlonal detecta p-Ser o p-Thr en el contexto de Tyr, Trp o Phe en la posición -1 o Phe en la posición +1, y no tiene reacción cruzada con las formas no fosforiladas en estos motivos. Según el proveedor, en el listado de proteínas con las que podría interactuar este anticuerpo, aquellas que tienen los pesos dentro de dicha área son las quinasas PKC $\beta$ II (77 kDa), p90RSK (83 kDa) y MSK1 (90 kDa), sin embargo, se deben realizar futuros ensayos de inmunodetección con anticuerpos específicos para estas quinasas con el fin de verificar su expresión/activación en presencia de las lectinas. Por otro lado, no se observaron bandas en los extractos cultivados en presencia de ninguna de las tres lectinas usando el anticuerpo contra ERK.

Se observó expresión de  $\alpha$ -tubulina en todos los tiempos de control en las membranas con las tres lectinas usando un mAb contra esta proteína constitutiva (Fig. 4-18B).



**Figura 4-18. Inmunodetección con anticuerpos contra serina/treonina fosforilada (p-Ser/Thr) y  $\alpha$ -tubulina.** Lisados celulares (15  $\mu$ g/pozo) obtenidos luego de 0, 5, 10, 30 o 60 min de incubación con las lectinas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa e incubaron con anticuerpo contra p- Ser/Thr (A) y contra  $\alpha$ -tubulina (B). A los lados de las imágenes se muestran los pesos moleculares de los patrones (MW) entre 25 – 180 kDa.

#### 4.4. Discusión de resultados de los efectos de las lectinas LDG-I y LDG-II de *D. grandiflora*, y LGL-II de *G. lindenii* sobre los procesos de migración y proliferación de queratinocitos epidérmicos

##### 4.4.1. Generalidades

En el presente capítulo se evaluaron los efectos de tres lectinas de la Tribu Diocleae de la Familia Fabaceae sobre los procesos de proliferación y migración celular en queratinocitos epidérmicos humanos de la línea no tumorigénica HaCat. Las lectinas LDG-II y LGL-II, con especificidad por ciertos galactósidos, mostraron efectos tanto proliferativo como migratorio en los queratinocitos (1.5 – 25  $\mu$ g/mL, dependiendo del proceso y de la lectina); mientras que, la lectina LDG-I con

especificidad por manósidos, mostró efecto proliferativo solo a la menor concentración probada (1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e inhibió la migración de células HaCat en todas las condiciones ensayadas. Según la literatura revisada, esta es la primera vez que se observan efectos sobre la proliferación y migración sobre queratinocitos epidérmicos humanos debido a la presencia de lectinas de la tribu Diocleae. En dicho rango de concentraciones, se han observado efectos proliferativo y migratorio en queratinocitos humanos y murinos debidos a la presencia de galectina mamífera LGALS3 exógena (Friedrichs *et al.*, 2008; Kariya *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Saravan *et al.*, 2009).

En los lisados de los queratinocitos cultivados en presencia de LDG-II, LGL-II y rLGALS3 se observó la inmunodetección del EGFR a nivel basal y también fosforilado (Fig. 4-17), y según la revisión bibliográfica, la expresión de este receptor puede ser modulada por LGALS3 (Liu *et al.*, 2012; Kariya *et al.*, 2010; Saravan *et al.*, 2009; Friedrichs *et al.*, 2008). Por otro lado, la quinasa regulada por señales extracelulares ERK fosforilada o no fosforilada no se detectó en los lisados celulares; lo cual podría indicar la necesidad de usar lisados con mayor concentración de proteína que permita la inmunodetección o el uso de otro anticuerpo, ya que usualmente esta quinasa se expresa en cantidad detectable en cultivos celulares. Cabe anotar que Patruno *et al.*, 2015 reportaron que la expresión de pERK no esta modulada en el tiempo en la línea de queratinocitos HaCat, y que por otro lado, se ha observado que los queratinocitos experimentan apoptosis en una variedad de condiciones tanto fisiológicas como patológicas, algunas veces asociada a niveles altos de activación de ERK. Cuando esos niveles de ERK son muy altos, la LGALS3 puede inducir la activación de la vía PI3K-AKT, actuando, así como una lectina anti-apoptótica en queratinocitos epidérmicos normales (Fig. 4-4; Saegusa *et al.*, 2008), este efecto eventualmente también podría ser inducido por lectinas vegetales con especificidad por galactósidos.

#### 4.4.2. Proliferación y migración celular – relación con la especificidad de las lectinas

La glicosilación es una de las modificaciones transcripcionales más comunes (cerca del 50% de las proteínas conocidas estan glicosiladas), y produce un repertorio diverso de glicanos colectivamente conocido como glicoma, el cual regula el plegamiento, la estabilidad, la solubilidad y la expresión funcional de las proteínas. La diversidad de los glicanos refleja sus funciones múltiples implicadas en la conformación y función de las proteínas por influencia estérica que involucra interacciones inter- e intramoleculares (Marth & Grewal, 2008). Gran parte del repertorio de glicanos representa ligandos potenciales para las lectinas. La unión lectina-ligando es uno de los mecanismos de reconocimiento molecular que los organismos usan para identificar y decodificar la información biológica presente en su propio glicoma celular así como en el glicoma de otros organismos; y dicho reconocimiento depende de la forma de presentación del glicotipe y de la especificidad de la lectina (Capítulo 3). La conformación de moléculas de membrana así como sus interacciones con lectinas influyen en procesos como la activación y el recambio de receptores de membrana, y de moléculas de adhesión, eventos que modulan el crecimiento, la adhesión y la migración celular (Takahashi *et al.*, 2009).

Cada tipo celular expresa un glicofenotipo particular (Defaus *et al.*, 2014). En queratinocitos epidérmicos, la galectina LGALS3, con especificidad por  $\beta$ -galactósidos, juega un papel primordial debido a sus múltiples interacciones con glicoconjugados de membrana y de matriz extracelular, promoviendo la migración y la proliferación celular (sección 4.2.). Por otro lado, la actividad diferencial de glicosiltransferasas produce glicoconjugados con distintos glicotopes, para algunos

de los cuales se han encontrado funciones específicas, por lo que la interacción de distintas lectinas con dichos glicotopes podría conllevar a diferentes respuestas celulares. Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan una primera aproximación a la elucidación de los mecanismos moleculares por los cuales lectinas vegetales, con determinada especificidad de ligando, pueden modular dichos procesos en queratinocitos, potencializando o disminuyendo el efecto de LGALS3; y aportan a la búsqueda de moléculas activas con potencial cicatrizante de lesiones cutáneas.

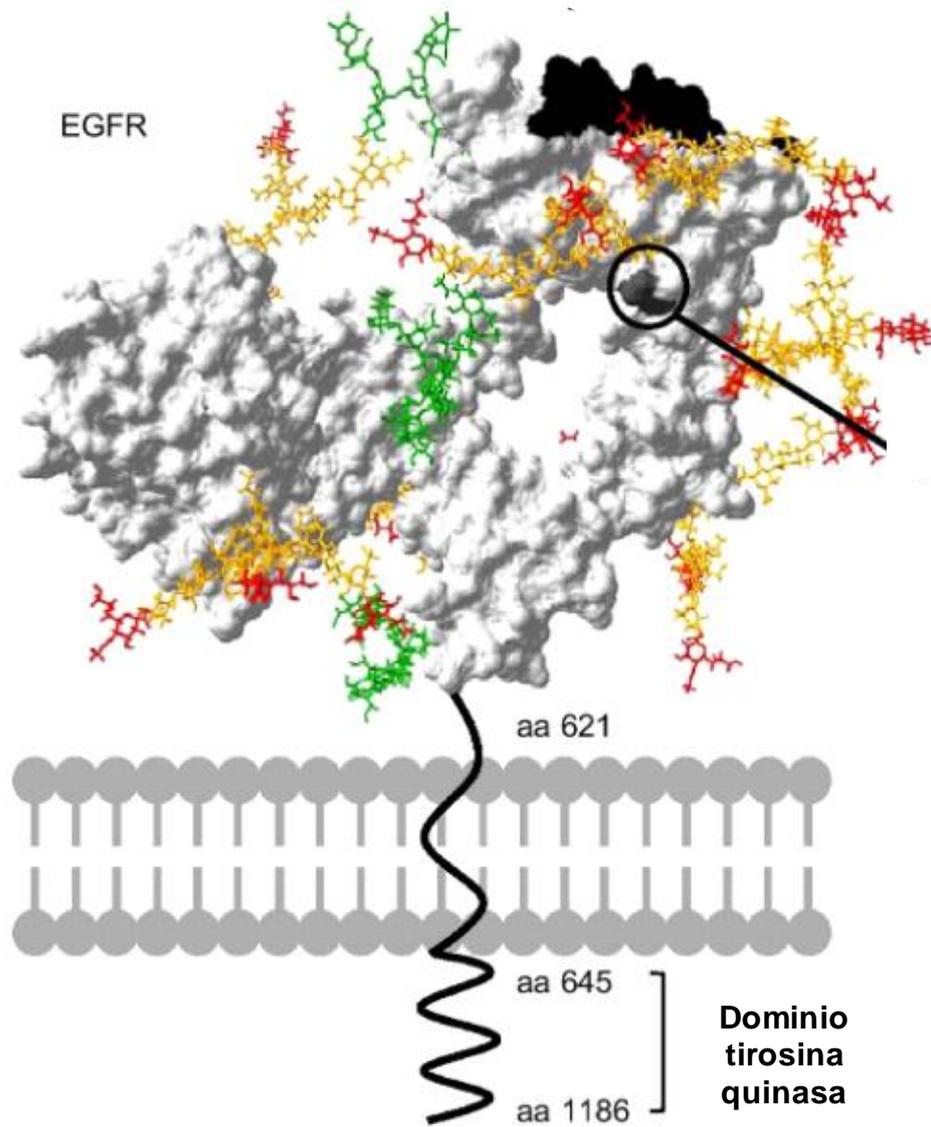
#### 4.4.2.1. Proliferación celular

##### **Lectina LDG-I**

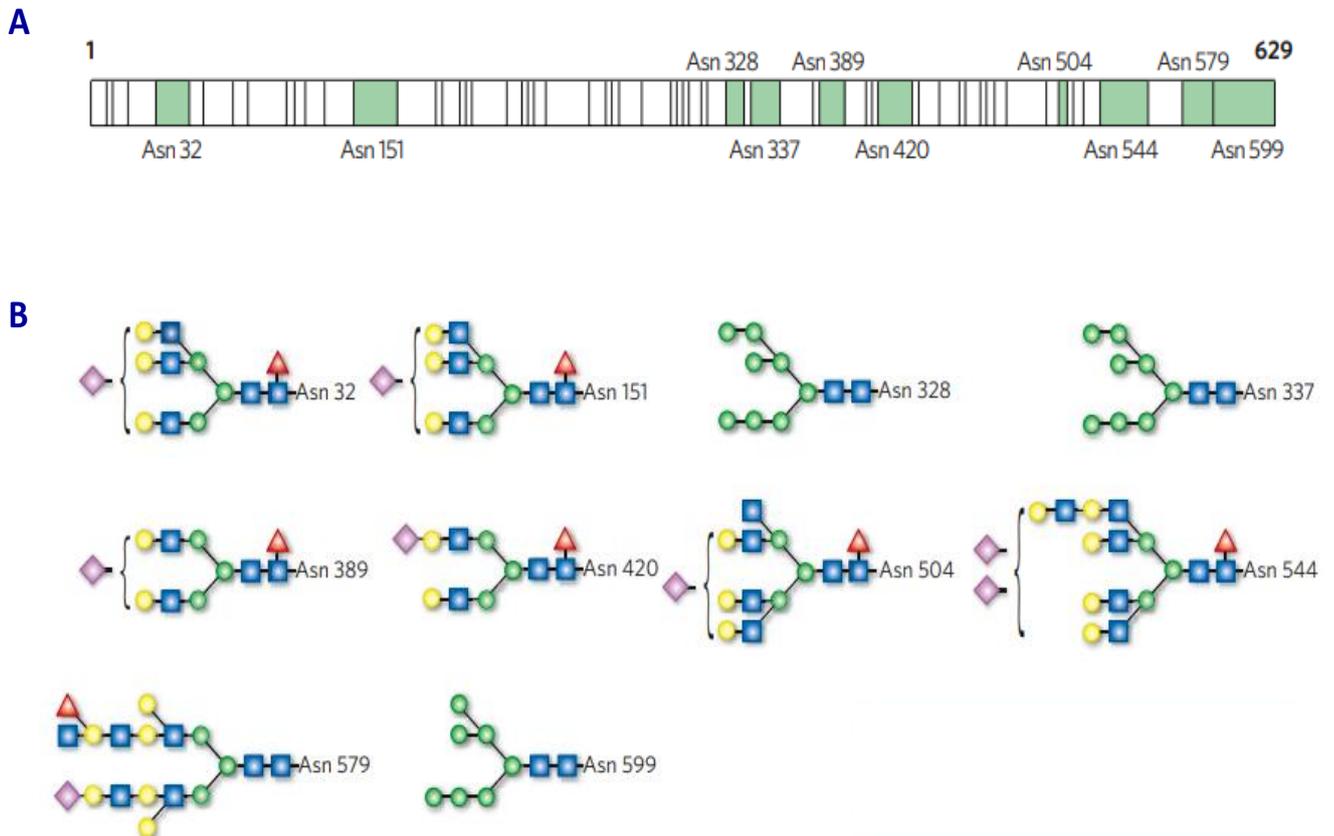
El receptor EGFR juega un papel importante en el control del crecimiento de las células epidérmicas (Kariya *et al*, 2010); luego de su estimulación por factores de crecimiento, puede autofosforilarse, activarse y promover cascadas intracelulares de transducción de señales que culminan en la activación de factores de transcripción que regulan la expresión de varios genes; lo anterior ocurre a través de vías de señalización que incluyen la vía MAPK o la vía de la AKT, influyendo así respuestas biológicas de proliferación, adhesión, migración y supervivencia celular, o supresión de apoptosis (Blumenberg, 2013; Dawson *et al*, 2005; Herbst, 2004; Marmor *et al*, 2004; Stoll *et al*, 2001; Figs 4-3 y 4-4). En células normales se ha estimado entre  $0.4 \times 10^5$  –  $1 \times 10^5$  receptores EGFR por célula (Wee & Wang, 2017). El EGFR, presente en la membrana de los queratinocitos epidérmicos, es una de las proteínas cuya actividad podría ser modulada por lectinas exógenas de origen vegetal.

El EGFR cuenta con un dominio de unión a ligando extracelular (~ 620 aminoácidos), una región que se extiende dentro de la membrana, y una región citoplásmica intracelular (~ 550 aminoácidos) que contiene el dominio de tirosina quinasa. El EGFR, de 170 kDa, es altamente glicosilado (Fig. 4-19); a lo largo de la región extracelular se reportan 11 secuencias consenso típicas (N-X-S/T) y 4 atípicas (N-X-C) para N-glicosilación; los N-glicanos tienen una masa molecular aproximada de 40 kDa y entre ellos hay oligomanósidos y glicanos complejos di-, tri- o tetraantenarios que pueden presentar sialilación o fucosilación (Fig. 4-20); mientras que la O-glicosilación del receptor se ha observado en condiciones patológicas (Hanash *et al*, 2008; Zen *et al*, 2003).

Varios estudios demuestran la participación de N-glicanos en la estabilidad conformacional y en la regulación de la función del EGFR. La expresión y activación del receptor en la superficie celular es proporcional al número y grado de ramificación de los N-glicanos (Lau *et al.*, 2007). La N-glicosilación induce cambios conformacionales necesarios para la dimerización del EGFR con la subsecuente activación por unión al ligando (Taylor *et al*, 2017; Yoon *et al*, 2006). Los glicanos en Asn420 y Asn579 previenen la dimerización del EGFR independientemente del ligando (Whitson *et al*, 2005). Glicotopes representados por ciertos tipos de fucosilación y sialilación del EGFR juegan un papel en la regulación del receptor (Liu YC *et al*, 2011; Matsumoto *et al*, 2008; Wang *et al*, 2006; Yen *et al* 2015).

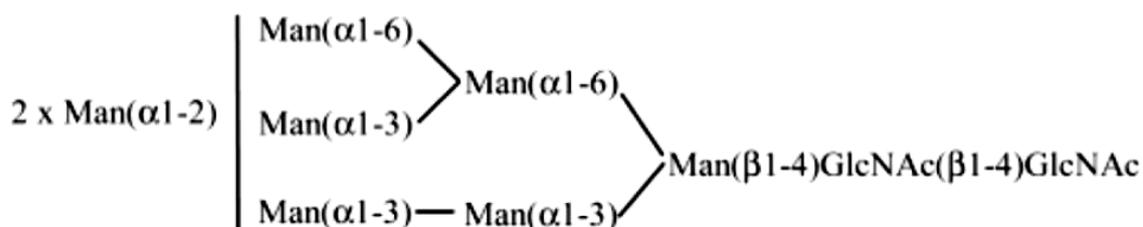


**Figura 4-19. Ilustración estructural del receptor EGFR.** Verde: N-glicanos del tipo oligomanósidos, naranja: N-glicanos del tipo complejo, rojo: N-glicanos complejos con ácido siálico terminal. Lupa: polimorfismo de nucleótido simple. Recuperado de Braig *et al*, 2017.



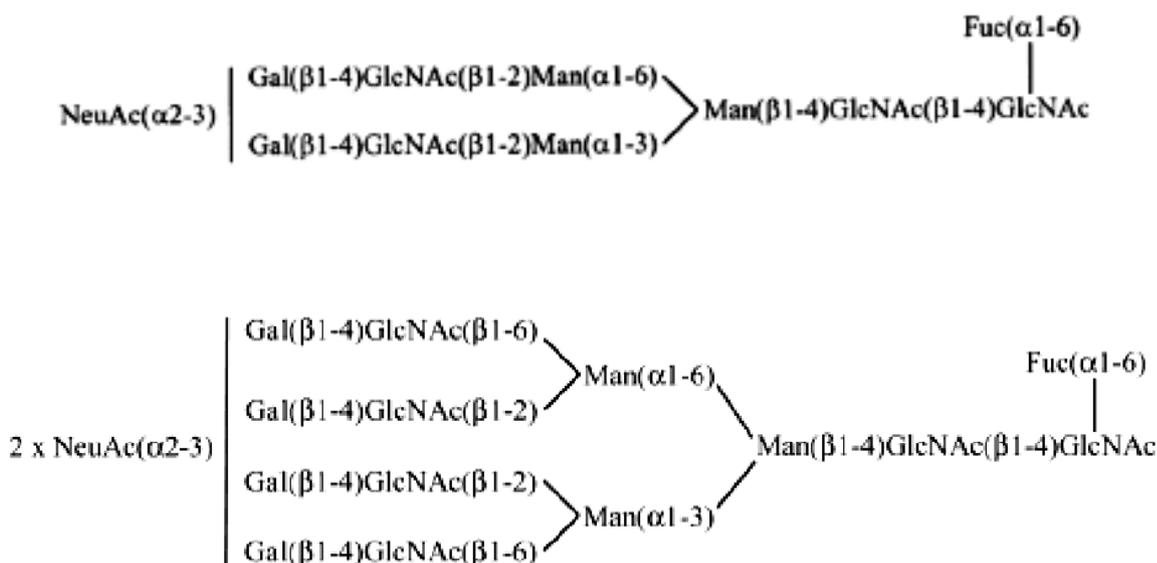
**Figura 4-20. Glicoformas en el receptor EGFR.** A. Dominio extracelular del EGFR conformado por 629 aminoácidos. Las cajas verdes indican los sitios de N-glicosilación conocida. B. Estructura de N-glicanos que se han determinado para el EGFR luego de ser sujeto a espectrometría de masas. Los corchetes indican que un residuo de ácido siálico terminal puede estar presente en alguna de las posiciones indicadas. La nomenclatura simbólica de glicanos es la acordada por el *Consortium for Functional Glycomics* y aceptada por IUPAC; círculos: hexosas; cuadrados: N-acetilhexosaminas; círculo amarillo: galactosa; círculo verde: manosa; cuadrado azul: N-acetilglucosamina; triángulo rojo: fucosa; diamante: ácido siálico. Recuperado de Hanash *et al*, 2008.

La presencia de la lectina LDG-I, con especificidad por manósidos (con manosa expuesta o encriptada, excepto cuando el azúcar terminal fue galactosa  $\alpha/\beta$ ), mostró efecto proliferativo en los queratinocitos epidérmicos humanos HaCat solo a la menor concentración evaluada (1.5  $\mu\text{g/mL}$ ; 24 h); mientras que disminuyó la proliferación celular desde los 25  $\mu\text{g/mL}$ . La lectina LDG-I interactuó con 8 de las 11 de N-glicoformas ensayadas en el presente trabajo (Capítulo 3), incluyendo algunas que se han reportado como supresoras o activadoras de la actividad del EGFR (ver más adelante en el texto), además de mostrar alta afinidad por oligomanósidos (Gupta *et al*, 1996) que también están presentes en el EGFR (Hanash *et al*, 2008). La interacción de LDG-I con manósidos es proporcional al número de residuos de manosa (Tabla 1-4) y en el EGFR se han identificado N-glicanos del tipo oligomanósido portando 6 - 8 residuos de manosa (Fig. 4-21).



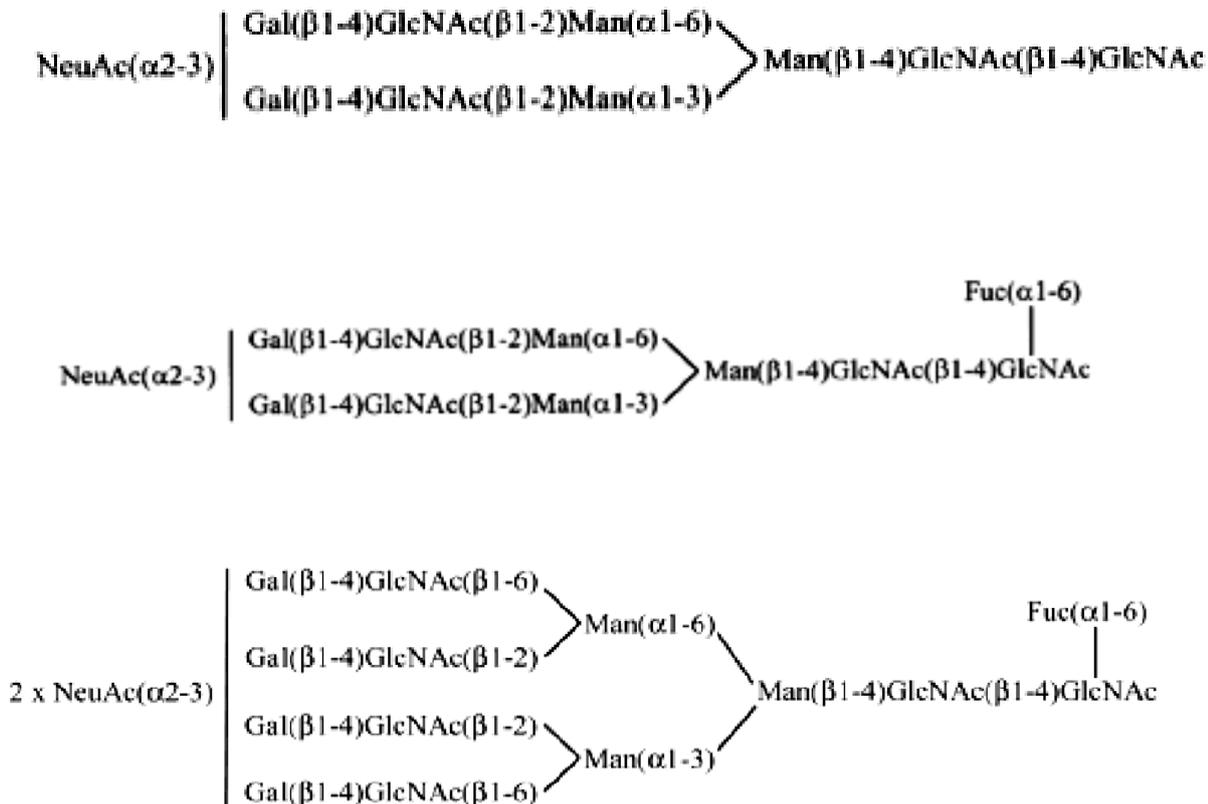
**Figura 4-21. N-glicano oligomanósido en la estructura del receptor EGFR.** Fórmulas estructurales de los glicanos propuestas por el *Consortium for Functional Glycomics* y aceptadas por IUPAC. Glicano en Asn337 Man: manosa; N-acetilglucosamina.  $\alpha$  y  $\beta$ : configuraciones de los enlaces glicosídicos. Recuperado de Zen *et al*, 2003.

La delección del gen de la  $\alpha 1,6$ -fucosiltransferasa (FUT8), enzima que cataliza la transferencia de un grupo fucosa al residuo N-acetilglucosamina más interno (adyacente a la asparragina) en los N-glicanos vía un enlace  $\alpha 1,6$ , en mamíferos (Anexo XVI), atenua la unión del EGF, la fosforilación del EGFR (Liu YC *et al*, 2011; Wang *et al*, 2006) y el crecimiento celular mediado por el EGF (Matsumoto *et al*, 2008); indicando que la presencia del núcleo  $\alpha 1,6$ -Fuc (Figs. 4-22 y 4-24) es necesaria para la adecuada conformación del receptor promoviendo su habilidad de unión al ligando y ejerciendo un efecto estimulante sobre la señalización intracelular del EGFR. De las tres lectinas vegetales ensayadas en el presente trabajo, LDG-I fue la única que interactuó con N-glicofomas que presentan el núcleo  $\alpha 1,6$ -Fuc (Capítulo 3).



**Figura 4-22. N-glicanos del receptor EGFR que presentan núcleo  $\alpha 1,6$ -fucosa.** Las fórmulas estructurales de los glicanos son las propuestas por el *Consortium for Functional Glycomics* y aceptadas por IUPAC. Glicanos que se pueden presentar en Asn389 y Asn504. El lado izquierdo del panel es la parte expuesta de los glicanos, mientras que la GlcNAc más a la derecha es el residuo de carbohidrato reductor del aminoácido asparagina en el receptor. Man: manosa; Fuc: fucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Gal: galactosa; NeuAc: ácido siálico.  $\alpha$  y  $\beta$ : configuraciones de los enlaces glicosídicos. Recuperado de Zen *et al*, 2003.

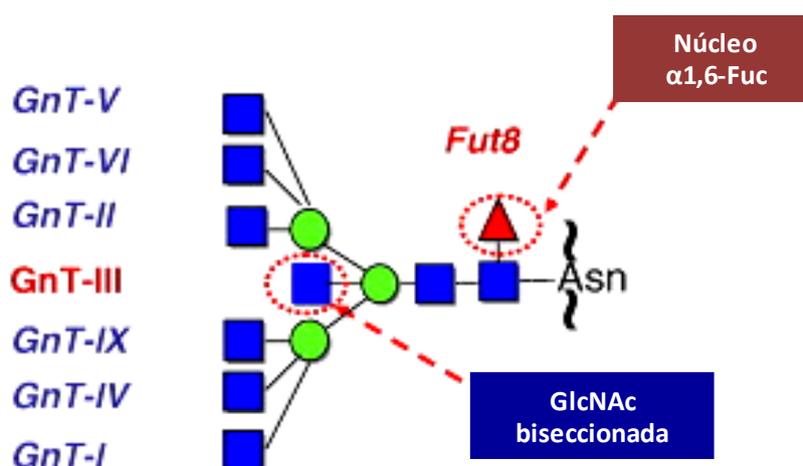
Se ha observado inhibición de LDG-I con el monosacárido ácido N-acetilneuramínico y con glicofomas que contienen dicho azúcar en el extremo terminal, pero la interacción dependió del tipo de enlace con el azúcar subterminal. Los resultados del *dot blot* mostraron que LDG-I reconoce glicofomas con ácido siálico terminal (Neu5Ac) en enlace  $\alpha 2,3$  pero no en enlace  $\alpha 2,6$  (Capítulo 3), y en concordancia con los resultados del presente trabajo, datos previos indicaron que no se presentó inhibición de la actividad eritroaglutinante de LDG-I en presencia de la glicoproteína apotransferrina (Ramos *et al*, 1996), la cual muestra N-glicanos biantenarios complejos con ácido siálico terminal en enlace  $\alpha 2,6$  con galactosa subterminal (Satomi *et al*, 2004). De los 10 N-glicanos mejor caracterizados en el EGFR, siete de ellos pueden mostrar sialilación en enlace  $\alpha 2,3$  (Figs. 4-20 y 4-23). La sialilación del EGFR suprime su dimerización y su autofosforilación (Yen *et al*, 2015). Sanders *et al*, 2013 propusieron que la carga negativa de los residuos de ácido siálico podrían tener un efecto negativo en la interacción electrostática entre el EGF y el EGFR. Por otro lado, la actividad sialidasa NEU1 que escinde el ácido siálico en enlace  $\alpha 2,3$ ; promueve la actividad del EGFR (Lillehoj *et al*, 2012).



**Figura 4-23. N-glicanos del receptor EGFR que presentan sialilación  $\alpha 2,3$ .** Fórmulas estructurales de los glicanos propuestas por el *Consortium for Functional Glycomics* y aceptadas por IUPAC. Glicanos que se pueden presentar en Asn420, Asn32 y Asn504. El lado izquierdo del panel es la parte expuesta de los glicanos, mientras que la GlcNAc más a la derecha es el residuo de carbohidrato reductor del aminoácido asparagina en la N-glicoproteína receptora. Man: manosa; Fuc: fucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Gal: galactosa; NeuAc: ácido siálico.  $\alpha$  y  $\beta$ : configuraciones de los enlaces glicosídicos. Recuperado de Zen *et al*, 2003.

LDG-I también puede interactuar con N/O-glicofomas que muestran GlcNAc $\beta 1$  terminal (Dam *et al*, 1998, 2000; Gupta *et al*, 1996; Rozwarski *et al*, 1998; presente trabajo), mientras que la

interacción de las lectinas tipo II con dichas glicofomas fue muy débil o nula (Capítulo 3). En este caso, el residuo de manosa en el trimanósido, y los diferentes tipos de enlace con el que las N-acetilglucosaminiltransferasas (GnT) unen el residuo de GlcNAc, pueden tener efectos contrarios sobre el EGFR. Por ejemplo, la presencia de N-glicanos poco ramificados, modificados por la GnT-III con un GlcNAc terminal en enlace  $\beta$ 1,4 al residuo de manosa localizado en la base del núcleo trimanosil, para producir el glicotopo GlcNAc biseccionada en el EGFR (Fig. 4-24), promueven que el receptor se localice en microdominios de caveolina-1 donde la señalización corriente abajo es inhibida; mientras que la ramificación en enlace  $\beta$ 1,6 con un residuo de manosa externo (Fig. 4-25), catalizada por la GnT-V, regula de manera positiva al receptor (Ferreira *et al*, 2018).



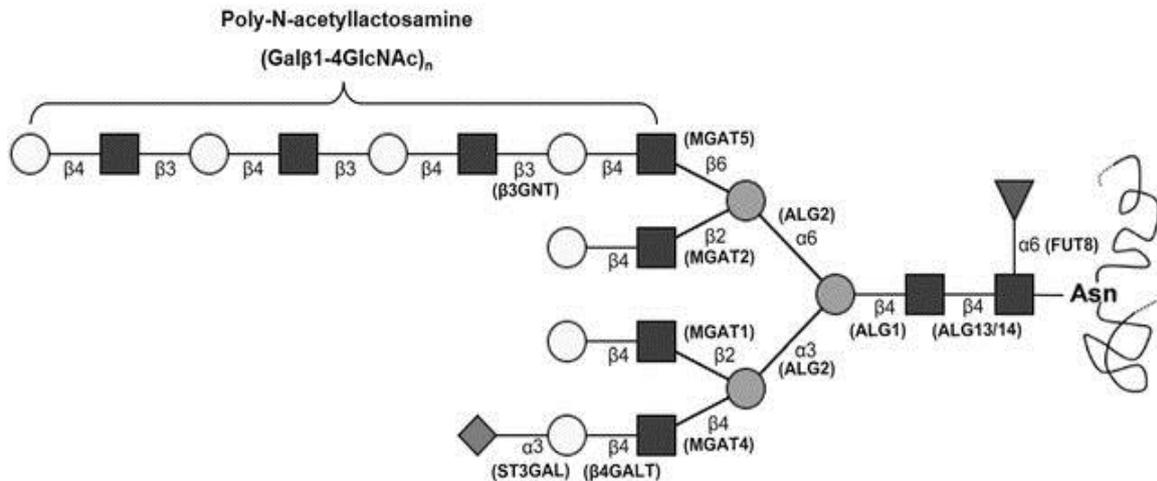
**Figura 4-24. Estructura de las ramificaciones producidas por la actividad de glicosiltransferasas en N-glicanos.** GnT: N-acetilglucosaminiltransferasas que catalizan la transferencia de un residuo de GlcNAc sobre uno de los residuos de manosa del núcleo trimanósido de las glicoproteínas, para producir N-oligosacáridos ramificados. La GnT-III cataliza la introducción de GlcNAc en enlace  $\beta$ 1,4 al residuo de manosa localizado en la base del núcleo trimanosil para producir el glicotopo GlcNAc biseccionada, el cual impide el alargamiento de los N-glicanos por obstaculizar la acción de varias glicosiltransferasas. La fucosiltransferasa 8 (Fut8) cataliza la adición de fucosa en la posición 6 del residuo de N-acetilglucosamina inicial del N-glicano produciendo el núcleo  $\alpha$ 1,6-fucosa. Cuadrado azul: GlcNAc; círculo verde: manosa; diamante rojo: fucosa. Recuperado de Takahashi *et al*, 2009.



**Figura 4-25. N-glicano en la estructura del receptor EGFR que presenta GlcNAc $\beta$  terminal.** Las fórmulas estructurales de los glicanos son las propuestas por el Consortium for Functional Glycomics y aceptadas por IUPAC. El lado izquierdo del panel es la parte expuesta de los glicanos, mientras que la GlcNAc más a la derecha es el residuo de carbohidrato reductor del aminoácido asparagina en la N-glicoproteína receptora. Man: manosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina.  $\alpha$  y  $\beta$ : configuraciones de los enlaces glicosídicos. Recuperado de Zen *et al*, 2003.

Se ha observado que la glicosilación con ramificaciones poli-LacNAc [(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) $n$ ] que parten de la rama GlcNAc $\beta$ 1,6 en el EGFR promueve la formación de redes por LGALS3 que regulan la permanencia del receptor en la membrana, la señalización intracelular y conlleva a la

resistencia a anoikis (muerte celular por falta de adhesión a sustrato) (Ferreira *et al*, 2018). Sin embargo, la LDG-I no interactuó con N-glicanos que contenían galactosa terminal en ninguna de las configuraciones de enlace ensayadas (Capítulo 3), por lo que LacNAc y poli-LacNAc (Fig. 4-26) no representarían ligandos de esta lectina.



**Figura 4-26. Estructura típica de un N-glicano que contiene poli-LacNAc.** Poli-N-acetil-lactosamina (Poli-LacNAc) está compuesta de repeticiones del disacárido N-acetil-lactosamina (Gal $\beta$ 1,4GlcNAc). El EGFR y las integrinas contienen glicanos con poli-LacNAc. La biosíntesis de poli-LacNAc involucra la actividad  $\beta$ -1,3N-acetilglucosaminiltransferasa ( $\beta$ 3GNT), la cual cataliza la adición de GlcNAc a glicanos terminados en galactosa. Cuadrado negro; N-acetil glucosamina (GlcNAc); círculo gris: manosa (Man); círculo blanco; galactosa (Gal); rombo: ácido siálico (NeuAc); triángulo: fucosa (Fuc). ALG: gen asociado a la glicosilación de asparagina; FUT: fucosiltransferasa, MGAT: N-acetilglucosaminiltransferasa que actúa sobre glicoproteínas con grupos manosil;  $\beta$ 4GALT:  $\beta$ -1,4 galactosiltransferasa; ST3GAL,  $\beta$ -1,4-galactosido  $\alpha$ -2,3 sialiltransferasa,  $\beta$ 3GNT,  $\beta$ -1,3 N-acetilglucosaminiltransferasa. Recuperado de Lee *et al*, 2018.

El receptor EGFR es una glicoproteína flexible, con dominios extracelulares e intracelulares articulados móviles (doi: 10.2210/rcsb\_pdb/mom\_2010\_6); sin embargo, el hecho de que LDG-I pueda interactuar con la mayoría de los N-glicanos presentes en el EGFR (entre ellos glicanos tanto supresores como activadores de la actividad del receptor), podría generar alta rigidez en su estructura, impidiendo la conformación adecuada del receptor para su interacción con sus ligandos extracelulares, y con proteínas intracelulares, lo que pudo conllevar a la pérdida de la señal proliferativa por saturación dependiente de la concentración de la lectina.

### Lectinas tipo II

La presencia de las lectinas LDG-II y LGL-II tuvo efectos tanto proliferativo como migratorio en los queratinocitos epidérmicos (1.5 – 25  $\mu$ g/mL, dependiendo del proceso y de la lectina). LDG-II y LGL-II, mostraron especificidad por galactósidos, con una influencia por el rango de concentraciones y modificaciones en los glicotopes que cada una de ellas puede reconocer, de manera similar a como sucede con LGALS3. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos es plausible pensar que los efectos proliferativo y migratorio sobre los queratinocitos pueda ser debida a la interacción de las lectinas tipo II con alguno(s) de los glicanos presentes en receptores de membrana o en moléculas de la MEC con los que también interactúa LGALS3, o en otros

receptores relacionados con dichos procesos y que contengan glicanos reconocidos por estas lectinas vegetales, como se discute más adelante. Entre los ligandos por los cuales muestran especificidad compartida LDG-II, LGL-II y LGALS3 están los glicotopes Lac, T $\alpha$ , y LacNAc (Tabla 4-6); sin embargo, la interacción con cada lectina es dependiente del tipo y de la forma de presentación del glicano (*i.e.*, externo o encriptado; monovalente, polivalente, en *cluster*).

**Tabla 4-6. Similitudes y diferencias en la estructura de los ligandos de galectina LGALS3 y de las lectinas vegetales LDG-II y LGL-II \***

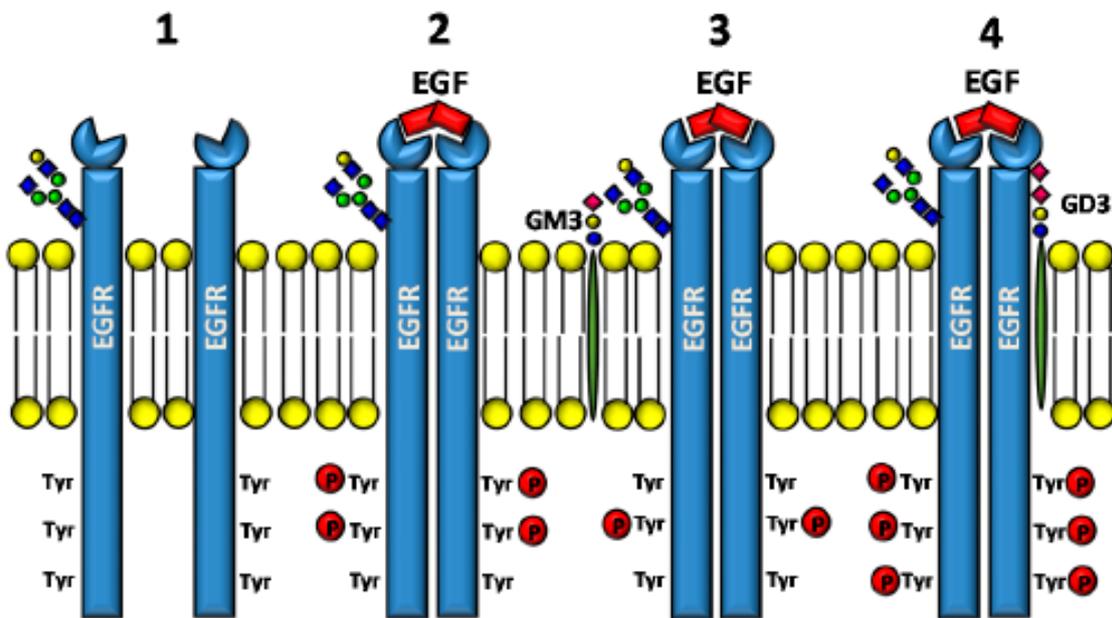
Similitudes	Fórmula estructural de los ligandos		
Las tres lectinas pueden ser purificadas por afinidad al disacárido lactosa (Lac)	Gal $\beta$ 1,4Glc (Lac)		
Actividad eritroaglutinante inhibida por Lac y no por manosa.			
Preferencia por glicotopo II $\beta$ en relación a glicotopo I $\beta$ : (LGALS3: terminal/interno; LDG-II interno; LGL-II terminal/interno). La interacción con LacNAc subterminal se ve influenciada por el residuo de azúcar terminal del glicano.	Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1 > Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1 (LacNAc II > LacNAc I) (glicotopo II $\beta$ > glicotopo I $\beta$ )		
Fucosilación en enlace $\alpha$ 1,2 puede incrementar el reconocimiento (LGALS3 > LGL-II > LDG-II)	Fuca $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ (H-tipo II)		
Fucosilación con núcleos Fuca $\alpha$ 1,3 o Fuca $\alpha$ 1,4 reduce el reconocimiento (como en grupos Lewis Le <sup>b</sup> , Le <sup>y</sup> , Le <sup>a</sup> ). Para LGALS3 se ha visto alguna interacción con Le <sup>x</sup> .	Fuca $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4(Fuca $\alpha$ 1,3)GlcNAc(Le <sup>b</sup> ) Fuca $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,3(Fuca $\alpha$ 1,4)GlcNAc $\beta$ (Le <sup>y</sup> ) Gal $\beta$ 1,4(Fuca $\alpha$ 1,3)GlcNAc (Le <sup>a</sup> ) Gal $\beta$ 1,3(Fuca $\alpha$ 1,4)GlcNAc (Le <sup>x</sup> )		
Sialilación en enlace $\alpha$ 2,6 disminuye la interacción	Sia $\alpha$ 2,6 Gal $\beta$ 1,4GlcNAc		
<b>Diferencias</b>			
	<b>LGALS3</b>	<b>LDG-II</b>	<b>LGL-II</b>
<b>Interacción con tipos de glicanos</b>	N/O-glicanos, interacción con glicolípidos	Preferencia por O-glicanos en comparación con N-glicanos biantenarios; probable interacción con glicolípidos.	Preferencia por O-glicanos en comparación con N-glicanos biantenarios; probable interacción con glicolípidos.
<b>Núcleos 1 y 2 en O-glicanos:</b> Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ 1 y Gal $\beta$ 1,3(Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6)GalNAc $\alpha$ 1	Núcleo 1 > Núcleo 2	Núcleo 1 > Núcleo 2	Interacción similar con ambos
<b>Sialilación <math>\alpha</math>2,3</b>	Reduce reconocimiento, excepto si el ligando es poli-LacNAc	Aumenta el reconocimiento.	Reduce el reconocimiento.
<b>Interacción con antígeno Galili:</b> Gal $\alpha$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R	Si hay Interacción	No hay interacción	Interacción solo cuando esta fucosilado como en grupo B
<b>Interacción con glicanos que contengan <math>\beta</math>1,6GlcNAc terminal:</b> GlcNAc $\beta$ 1,6Man; GlcNAc $\beta$ 1,6GalNAc	Si hay interacción	Disminuye interacción.	Disminuye interacción.

<b>Interacción con grupos histo-sanguíneos humanos</b> A: GalNAc $\alpha$ 1,3(Fuc $\alpha$ 1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc B: Gal $\alpha$ 1,3(Fuc $\alpha$ 1,2)Gal $\beta$ 1,4GlcNAc O (H): Fuc $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc T: Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ Tn: GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr	AB > O > T	T >>> O. Interacción con T requiere alta densidad del glicotipe. No interactúa con A/B ni Tn.	O > T > Tn > B > A.
--	------------	---	---------------------

\*Ligandos de las lectinas LDG-II y LGL-II a partir de resultados obtenidos en el presente trabajo (Capítulo 3) y por otros resultados obtenidos en el GRIP reportados en Melgarejo *et al*, 2005 y Almanza *et al*, 2004. Los ligandos de galectina-3 son los reportados en Horlacher *et al*, 2010; Krzeminski *et al*, 2011 y Stowell *et al*, 2008.

En general, estas lectinas tipo II mostraron mayor especificidad (interactuando con menor número de estructuras) que la LDG-I; y entre las glicofomas ensayadas en el presente trabajo, ambas lectinas tipo II mostraron preferencia por O-glicanos en comparación con N-glicanos (Capítulo 3). Ninguna de las dos lectinas tipo II mostró inhibición por manosa (Almanza *et al*, 2004; Melgarejo *et al*, 2005), y tampoco interactuaron con la N-glicofoma que contiene el trimanósido expuesto, lo que descartaría su interacción con los oligomanósidos del EGFR. De manera similar, las dos lectinas tipo II no interactuaron con N-glicanos con GlcNAc $\beta$ 1 terminal, ni con N-glicanos que contienen el núcleo  $\alpha$ 1,6-Fuc estimulador de la señalización.

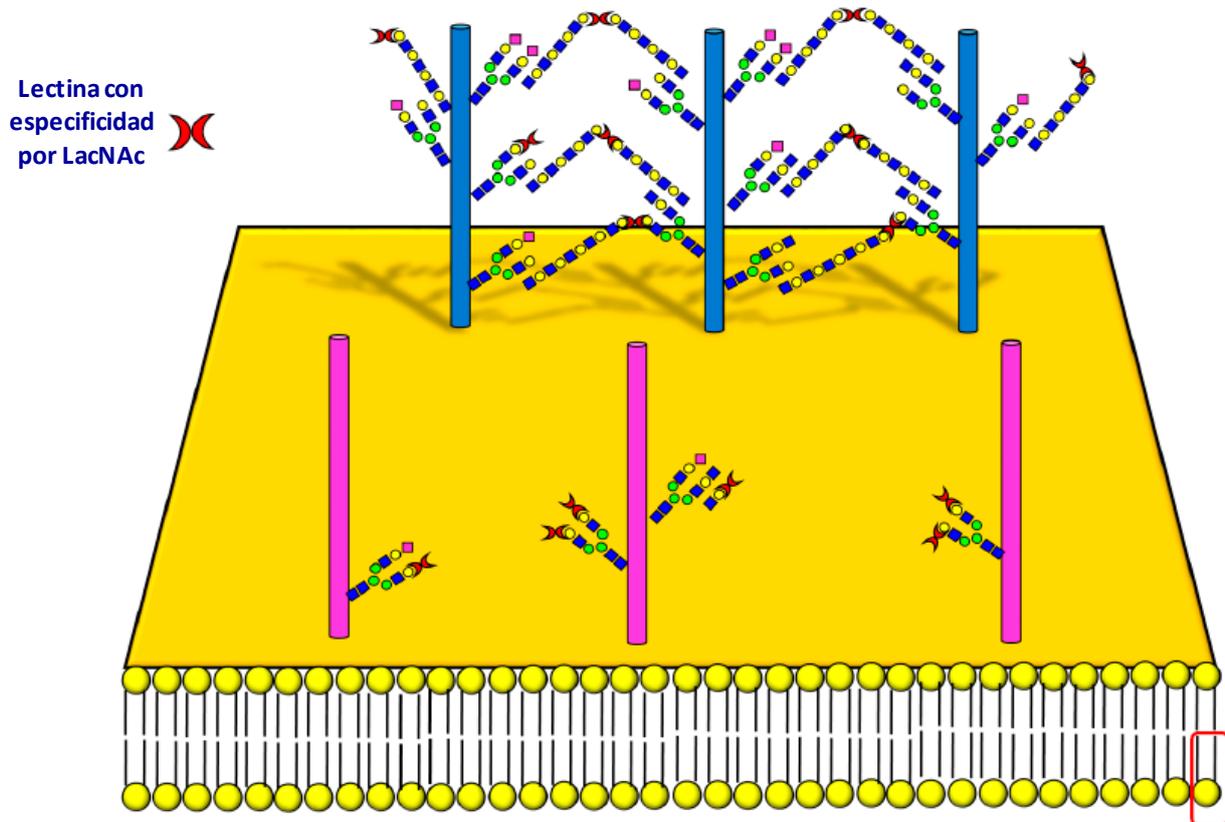
La lectina LDG-II mostró una interacción mucho mayor que la LGL-II con glicofomas que contenían glicanos sialilados en enlace  $\alpha$ 2,3; y lo anterior concordó con los resultados obtenidos en el acople molecular, donde la LGL-II mostró disminución en la afinidad por los carbohidratos sialilados en enlace  $\alpha$ 2,3 (Neu $\alpha$ 2,3Gal y Neu $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc; con energías de afinidad -6.1 y -6.2 kcal/mol, respectivamente) en comparación con la interacción con el trisacárido Fuc $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc, con el que mostró energía de afinidad de -6.9 kcal/mol (Capítulo 3). Entonces, uno de los mecanismos por el cual LDG-II pudo haber inducido el aumento en la proliferación de los queratinocitos es por su interacción con el gangliósido GM3, el cual está presente en varios tejidos, incluida la piel, e inhibe la actividad tirosina quinasa del EGFR (Fig. 4-27) gracias a interacciones carbohidrato-carbohidrato entre la cadena lactosaminica sialilada del glicolípido y los GlcNAc terminales en N-glicanos del receptor (Yoon *et al*, 2006). LDG-II podría reconocer el glicano sialil-lactosa NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,4Glc de la porción glicosídica del GM3, impidiendo la actividad inhibitoria de esta ceramida glicosilada, aumentando así la tasa de proliferación de los queratinocitos. En el 2014 fue publicado un artículo en el que se demuestra por cristalografía de rayos X, que el dominio de reconocimiento de carbohidratos de la LGALS3 puede formar complejo con la  $\alpha$ 2,3 sialil-lactosa del gangliósido; brindando información importante para prever la capacidad de la LGALS3 de inhibir la actividad del glicolípido para aumentar la tasa de proliferación celular (Collins *et al*, 2014).



**Figura 4-27. Efecto de gangliósidos sobre la actividad del receptor tirosina quinasa EGFR.** Dos monómeros del EGFR (1), en presencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), dimerizan resultando en la fosforilación de residuos de tirosina en la región citoplásmica del receptor (2). La interacción de GlcNAc terminales en ciertos N-glicanos del EGFR con el gangliósido GM3 inhibe la señalización (3), mientras que la interacción con el disialogangliósido GD3 refuerza la señalización (4). Recuperado de Ferreira *et al*, 2018.

Otra interacción posible sería la de LDG-II con N-glicanos tri- o tetravalentes presentes en el EGFR que contengan más de un ácido siálico terminal unido en enlace  $\alpha 2,3$  al glicotopo  $\text{II}\beta$  subterminal, reduciendo el efecto negativo sobre los eventos de dimerización del receptor, unión al ligando y fosforilación de tirosina, que se han observado por la sialilación del EGFR (Ferreira *et al*, 2018). En este caso, la interacción de LDG-II con N-glicanos debe estar dirigida por la multivalencia del glicotopo ( $\text{Neu}\alpha 2,3\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}$ ) $_n$ , donde  $n > 2$ .

Dado que las lectinas tipo II comparten algunos ligandos con la lectina de origen mamífero LGALS3 (Tabla 4-6), el efecto proliferativo de LDG-II y LGL-II también podría deberse a la formación de redes con glicanos del receptor que permitan una mayor permanencia del EGFR en la membrana. Ninguna de las dos lectinas tipo II interactuó con N-glicofomas que contenían el glicotopo LacNAc divalente expuesto. Sin embargo, LGL-II mostró especificidad por glicofomas que contenían O-glicanos con LacNAc monovalente expuesta o N-glicanos triantenarios que contenían LacNAc trivalente expuesta. En el caso de la interacción de LDG-II con glicanos que presentan LacNAc, el glicotopo debe estar encriptado. Lo anterior podría indicar, que de las dos lectinas tipo II, LGL-II podría reconocer LacNAc expuesta con presentación multivalente en N-glicanos. Eventualmente, al igual que lo hace la LGALS3, LGL-II podría unirse a extensiones de poli-LacNAc presentes en el EGFR, formando redes (Fig. 4-28), y regulando el recambio del receptor en la membrana plasmática potenciando así la tasa de señalización corriente abajo. En este caso, la presencia del ligando LacNAc polivalente en forma lineal contrarestaría el hecho que este glicotopo se presente en N-glicanos, y LGL-II podría interactuar en sitios más externos hacia el medio extracelular y más lejanos a los residuos de manosa.



**Figura 4-28. Representación esquemática de la membrana plasmática con dos tipos de receptores de crecimiento y su interacción con una lectina con especificidad por LacNAc.** En azul esta representado un receptor con alto número de cadenas de N-glicanos que muestran cadenas de poli-LacNAc que parten de ramificaciones GlcNAc $\beta$ 1,6, las cuales son ligandos ideales para lectinas con especificidad por LacNAc. Dicha interacción forma redes que estabilizan grupos de receptores como el EGFR en la membrana. En rosado se muestra otro tipo de receptor con un número pequeño de N-glicanos con ramificación GlcNAc $\beta$ 1,6 y sin cadenas de poli-LacNAc, imposibilitando que la lectina forme redes de receptores. Adaptado de Ferreira *et al*, 2018.

Por otra parte, la actividad proliferativa de la lectina LGL-II puede también deberse al efecto en la secreción del factor de crecimiento epidérmico (EGF), dado que se observó un aumento significativo ( $\approx 2x$ ) en la concentración de EGF en sobrenadantes de queratinocitos HaCat cultivados en presencia de LGL-II, en comparación con EGF en sobrenadantes de células cultivadas en ausencia de lectina; ninguna de las otras lectinas ensayadas, incluyendo la galectina LSGAL3, mostró incremento en los niveles basales de ese ligando del receptor; por lo que el efecto proliferativo específico de LGL-II concuerda con el aumento en EGF, al igual que se ha observado que la presencia de otras lectinas puede influir en la producción de factores de crecimiento en ciertos tipos de células normales y cancerosas (MacKinnon *et al*, 2012; Timoshenko *et al*; 2010).

En la epidermis, el EGF estimula la proliferación, diferenciación y migración de queratinocitos (Wee & Wang, 2017), además contribuye a la reepitelización de heridas y a la regulación de la función barrera de la piel (Tran *et al*, 2012), así como también a la supresión de la expresión de ciertos genes apoptóticos y de marcadores de diferenciación celular de queratinocitos (Blumenberg, 2013). Por otro lado, EGF es uno más de los ligandos que pueden unirse a dímeros del EGFR en la

superficie celular (Herbst, 2004; Hoesl *et al*, 2018). La familia de receptores ERBB incluye al EGFR (ERBB1, HER1), así como a los receptores ERBB2 (NEU, HER2), ERBB3 (HER3) y ERBB4 (HER4) (Citri *et al*, 2006). Hoesl *et al* (2018) demostraron que esos cuatro tipos de receptores ERBB están presentes en células HaCat, y además que aparte del EGF, el EGFR tiene otros seis ligandos en esta línea celular (HBEGF, TGFA, EPGN, EREG, AREG y BTC). Los receptores ERBB y sus ligandos juegan un papel importante en la homeostasis de la piel y la regulación de su interacción influye en los procesos de proliferación y diferenciación en queratinocitos epidérmicos (Schneider *et al*, 2008), por lo cual se hace necesaria la futura investigación comparativa de los efectos de todos los ligandos del receptor en la proliferación de queratinocitos epidérmicos humanos.

Se han observado efectos de lectinas de diferente origen sobre la proliferación y viabilidad celular (Tabla 4-7). Dichos efectos dependieron de la especificidad y concentración de la lectina, pero también del tipo celular. Con respecto a los efectos sobre proliferación en queratinocitos normales, éstos mostraron ser modulados por lectinas con especificidad por ciertos galactósidos (como las galectinas de origen mamífero LSGAL3 y LSGAL7, las lectinas vegetales LDG-II y LGL-II, y la lectina ABL de hongo), en un rango de concentración entre 1 - 12.5 µg/mL, mientras que, varias lectinas con especificidad por manósidos (incluida la lectina LDG-I) o por GalNAc, exhibieron un efecto proliferativo en células de linaje linfóide, en concentraciones entre 1-10 µg/mL, donde se ha observado que las respuestas celulares pueden iniciar por la interacción de las lectinas con el receptor TCR de células T (Carvalho *et al*, 2018). Dichas observaciones, junto con los resultados de aglutinación de diferentes tipos de eritrocitos, apoyan la idea que las lectinas tienen efectos sobre los procesos celulares dependiendo del glicofenotipo celular.

La afinidad específica de cada lectina esta dada por la forma de presentación de los ligandos que reconocen y ello influye en su efecto sobre la proliferación celular (Tabla 4-7). Es así como las dos galectinas presentes en la epidermis, LSGAL3 y LSGAL7, con especificidades por cadenas de poli-LacNAc y LacNAc-Lac (lacto-*N*-neotetraosa, LNnT; Galβ1,4GlcNAcβ1,3Galβ1,4Glc), respectivamente, tienen un papel en la reepitelización de heridas a través de su interacción con receptores de membrana o componentes de la MEC (Panjwani, 2014). Sin embargo, LGALS3 muestra efecto activador de la proliferación en queratinocitos humanos, mientras que LGALS7 suprime dicho proceso (Chen *et al*, 2016). La lectina *Agaricus bisporus* (ABL), que interactúa con N-glicanos con GlcNAcβ1,6 y con el glicotipe Tα (Galβ1,3GalNAcα) en O-glicanos, muestra un efecto anti-proliferativo en queratinocitos humanos normales en el rango 1-3 µg/mL (Parslew *et al*, 1999); mientras que, las lectinas LDG-II y LGL-II que mostraron efecto proliferativo en las células HaCat (normales) en ese rango de concentraciones, no interactúan con N-glicanos biantenarios con GlcNAc β1,6 externo, permitiendo el efecto activador de este glicotipe; pero si reconocen Tα (LDG-II >> LGL-II; Tα monovalente o polivalente para LGL-II; solamente Tα polivalente para LDG-II; Capítulo 3) que esta presente en muy baja cantidad en glicanos de células normales. La jacalina de *Artocarpus integrifolia* (JAC), con especificidad por el glicotipe Tα, no afecta la viabilidad en células normales (Sell *et al*, 2003), pero si disminuye la fosforilación del EGFR y de ERK en células de carcinoma epidermoide A431, que presentan Tα multivalente (Sahasrabudhe, 2008).

Lectina	Especificidad*	Efecto**	Tipo celular	Conc. (µg/mL)	Método	Ref.
<b>ABL</b>	N-glicanos con GlcNAcβ1,6; Galβ1,3GalNAcα	Antiproliferativa entre 1-3 µg/mL	Queratinocitos humanos	1 - 3	Contador Coulter	Parslew <i>et al</i> , 1999
<b>LDG-I</b>	Man/Glc/ Oligomanósidos	Disminuye viabilidad desde 12.5 µg/mL; CI50: 166 µg/mL	Queratinocitos epidérmicos humanos HaCat	1.5 - 200	Conteo celular, MTT.	Presente trabajo
<b>LDG-II</b>	NeuAcα2,3Gal/ Galβ1,3GalNAcα/ Lac	Proliferativa entre 1.5 – 12.5 µg/mL, aumenta expresión del p-EGFR. CI50 > 200 µg/mL.	Queratinocitos epidérmicos humanos HaCat	1.5 - 200	Conteo celular, MTT, western blot	Presente trabajo
<b>LGALS3</b>	Poli-LacNAc/ NeuAcα2,3-poli-LacNAc/ LacNAc/Lac/	Proliferativa; aumenta expresión del p-EGFR.	Queratinocitos epidérmicos humanos HaCat	1.5	Conteo celular, MTT, western blot	Presente trabajo
<b>LGL-II</b>	H-tipo II/LacNAc/ Galβ1,3GalNAcα/ GalNAcα/Lac	Proliferativa entre 1.5 – 6.25 µg/mL, aumenta expresión del p-EGFR y de EGF. CI50: 33,9 µg/mL	Queratinocitos epidérmicos humanos HaCat	1.5 - 200	Conteo celular, MTT, western blot, ELISA	Presente trabajo
<b>LDG-I</b>	Man/Glc/ Oligomanósidos	Proliferativa	Linfocitos	2 µM		Arcila-Barrera <i>et al</i> , 2017
<b>LDG-II</b>	NeuAcα2,3Gal/ Galβ1,3GalNAcα/ Lac	Anti-proliferativa	Linfocitos	2 µM		Arcila-Barrera <i>et al</i> , 2017
<b>ALL</b>	GalNAc	Proliferativa, activación de ERK y p38	Linfocitos T humanos	6	Citometría	Cui <i>et al</i> , 2017
<b>ConA</b>	Man/Glc; GN <sub>2</sub> Man <sub>3</sub>	Proliferativa	Linfocitos T murinos	1	Incorpora <sup>125</sup> -Udr	Campbell <i>et al</i> , 1982
<b>ConA</b>	Man/Glc; GN <sub>2</sub> Man <sub>3</sub>	Proliferativa a las 72h	Linfocitos T humanos	5	Incorpora 3H-TdR,	Song <i>et al</i> , 2015
<b>LAg-I</b>	NeuAc/ ManNAc	No afecta proliferación	Linfocitos T murinos	7	Incorpora <sup>125</sup> -Udr	Campbell <i>et al</i> , 1982
<b>LAg-I</b>	NeuAc/ ManNAc	Proliferativa	Linfocitos B murinos	7	Incorpora <sup>125</sup> -Udr	Campbell <i>et al</i> , 1982
<b>PHA-E</b>	N-glicanos con GlcNAc biseccionado; Galβ1,4GlcNAcβ1,2Man	Proliferativa a las 72h	Linfocitos T humanos	10	Incorpora 3H-TdR,	Song <i>et al</i> , 2015
<b>KMLC</b>	Gal/GalNAc/Lac/ Asialofetaina	Proliferativa a 0.5 µg/mL	Celulas T CD8 <sup>+</sup>	0.125 – 0.5	Citometría de flujo	Kim <i>et al</i> , 2017
<b>KMLC</b>	Gal/GalNAc/Lac/ Asialofetaina	No afecta viabilidad hasta 0.2 µg /mL; aumenta expresión de perforina a 0.1 µg/mL	Linfocitos NK "Natural Killer"	0.001 -0.5	Liberación de BATDA, Western blot	Kim <i>et al</i> , 2018

**Abreviación/descripción.** ABL: lectina de seta comestible *Agaricus bisporus*; ALL: lectina de *Artocarpus lingnanensis*; ConA: lectina tipo I de *Canavalia ensiformis*; KMLC: lectina de planta semiparasitica *Viscum album coloratum* de Corea; LAg-I: lectinas tipo I de langosta *Homarus americanus*; LDG-I y LDG-II: lectinas tipo I y tipo II de *Dioclea grandiflora*; LGALS1, 3, 7, 8: galectinas 1, 3, 7 y 8; LGL-II: lectina II de *Galactia lindenii*; PHA-E: lectina de *Phaseolus vulgaris*; Plumieribetina: lectina de *Scorpaena plumieri* (pez escorpión) PNA: lectina de *Arachis hypogaea* (maní); RCA: aglutinina de *Ricinus communis*; WGA: lectina de germen de trigo. CI50: concentración de lectina en la que la supervivencia celular

fue del 50%. Man: manosa; ManNAc: N-acetilmanosamina; Glc: glucosa; Gal: galactosa, GalNAc: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; HexNAc: GalNAc o GlcNAc; Lac: lactosa; LacNAc: N-acetilgalactosamina; NeuAc: ácido siálico; GN<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>: pentasacárido complejo biantenarico GlcNAcβ1,2Manα1,6(GlcNAcβ1,2Manα1,3)Man. BATDA: lantánido sensible a esterases liberado durante citolisis. \*Carbohidratos o glicoproteínas por los que la lectina ha mostrado especificidad o que han inhibido su actividad. \*\* Efectos a 24 h, excepto en donde esta indicado otro tiempo. Especificidades refinadas de algunas lectinas vegetales son aquellas reportadas en Almanza *et al*, 2005; Cortázar *et al*, 2018; Iskratsch *et al*, 2009; Maupin *et al*, 2012; Melgarejo *et al*, 2005. Especificidades refinadas para galectinas mamíferas son las reportadas en Ahmad *et al.*, 2002; Krzeminski *et al*, 2011; Stowell *et al.*, 2008. Las demás especificidades de lectina son aquellas reportadas en la referencia descrita.

#### 4.4.2.2. Migración celular

La migración celular es un proceso cíclico en el que ocurren la adherencia y liberación secuencial del sustrato, que se da por las interacciones célula – matriz extracelular (MEC) (Anexo X). El movimiento celular comienza con la formación de protuberancias (lamelipodios, filopodios) en la membrana celular seguida por la formación de nuevas adhesiones que vinculan el citoesqueleto de actina al sustrato, la generación de fuerzas de tracción que mueven la célula hacia adelante y el desmonte de las adhesiones en el borde posterior de la célula (Anexo XI). En los queratinocitos cultivados en presencia de LDG-II y LGL-II, se observaron filopodios y lamelipodios en los bordes de la herida realizada en la monocapa, y esto es relevante dado que, en los bordes de las células migratorias durante la cicatrización de heridas, los filopodios son críticos para la unión eficiente de las dos monocapas en colisión, y para la alineación y el patrón apropiados del tejido (Jacquemet *et al*, 2015).

Las integrinas son receptores transmembranales glicosilados, compuestos de una subunidad α y una subunidad β, que conectan la matriz extracelular (MEC) al citoesqueleto, comunicando el interior celular con el ambiente extracelular; y las interacciones integrina-MEC inducen el ensamble de los complejos dinámicos de adhesión que funcionan como plataformas de señalización celular que conducen a la reorganización del citoesqueleto y a la migración celular (Peplow *et al.*, 2013). Se ha reportado que queratinocitos de diferente origen, incluyendo las células HaCat, secretan glicoconjugados componentes de la MEC tales como laminina LN332, colágenos IV y VII, fibronectina, calinina, proteoglicano heparan sulfato (Kariya *et al*, 2010; Oguchi *et al*, 1985; Peplow & Chatterjee, 2013).

Las dos integrinas que intervienen en la adhesión y migración de queratinocitos epidérmicos son las integrinas α3β1 y α6β4 (Margadant *et al*, 2010). En queratinocitos, los efectos adhesivos de las integrinas involucran la unión a la laminina LN332 (Kariya *et al*, 2010; Saravanan *et al*, 2009). Las interacciones laminina LN332 - integrina α3β1 promueven la formación de adhesiones focales transitorias (AF) en las que ciertas proteínas intracelulares unen los dominios intracelulares de las integrinas al citoesqueleto de actina (Martins-Green, 2013), y generan señales reguladoras de Rho GTPasas y migración celular (Anexo XII); por otro lado, la interacción con la integrina α6β4 contribuye a la formación de hemidesmosomas que anclan firmemente los queratinocitos a la MEC pericelular, y en donde proteínas intracelulares unen dominios intracelulares de la integrina α6β4 con el citoesqueleto de queratina (Anexo XIII).

La glicosilación de las integrinas es un tipo de regulación por la cual estos receptores pueden modular su afinidad y especificidad por moléculas de la MEC (Saravanan *et al.*, 2009, Kariya *et al*, 2010). En varios receptores en la superficie celular y en las proteínas secretadas, la N-glicosilación tiene un efecto en el plegamiento y estabilidad de proteínas, y en interacciones proteína-proteína

(Ohtsubo & Marth, 2006). Es así como, la N-glicosilación en la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas influye en la adhesión y la migración de queratinocitos (Kariya *et al.*, 2011), y la N-glicosilación de la subunidad  $\beta 4$  permite la formación de complejos moleculares en microdominios de membrana, y es necesaria para la adecuada señalización que activa las quinasas AKT y ERK (Kariya *et al.*, 2011). En algunas integrinas la presencia de N-glicanos se requiere para la formación del heterodímero  $\alpha\beta$  y para las interacciones integrina-MEC adecuadas (Isaji *et al.*, 2006); además, cambios en las estructuras de N-glicanos de las integrinas pueden afectar las uniones célula-célula, influyendo así tanto en la adhesión como en la migración celular. La integrina  $\beta 4$  posee N-glicanos con ramificaciones GlcNAc $\beta 1,6$  y GlcNAc biseccionada que regulan la adhesión y migración de los queratinocitos al afectar la asociación del dímero de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  con la laminina-LN332 y con el EGFR (Kariya & Gu, 2011).

La O-glicosilación en general ha sido menos caracterizada debido a la falta de secuencias consenso y de enzimas específicas para la liberación de O-glicanos (Santos *et al.*, 2014). Sin embargo, en la subunidad  $\beta 4$  de las integrinas se ha observado O-glicosilación llevando los glicotopes T $\alpha$  y sialil-T $\alpha$  (Kariya & Gu, 2011; Uemura *et al.*, 2009). Las interacciones integrina-MEC también pueden modular proliferación y supervivencia celular, y la interacción con lectinas puede darse de manera simultánea con receptores que afectan varios procesos celulares, dentro de los mismos dominios de membrana (Chung *et al.*, 2011; Jacquemet *et al.*, 2015; Kariya *et al.*, 2010; Margadant *et al.*, 2010; Martins-Green, 2013; Oguchi *et al.*, 1985; Peplow & Chatterjee, 2013).

La presencia de lectinas de diferente origen ha mostrado efectos moduladores sobre la adhesión y la migración celular (Tabla 4-8), dependiendo de la especificidad de la lectina, del tipo celular (con repertorios distintos de integrinas), o del tipo de integrina en la misma célula (Martins-Green, 2013). La interacción de la LSGAL3 con glicanos de las integrinas  $\alpha 3\beta 1$  promueve el agrupamiento de estas integrinas en la superficie del borde delantero del queratinocito migrante (Liu *et al.*, 2012; Saravanan *et al.*, 2009), e induce el recambio de las AF, la adhesión y la migración celular mediada por la subunidad  $\beta 1$  de la integrina (Margadant *et al.*, 2012); también, puede interactuar con la laminina LN332 que se asocia con los hemidesmosomas a través de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  (Kariya *et al.*, 2010). LSGAL3 estimula la migración en queratinocitos epidérmicos murinos y humanos, y en queratinocitos humanos de córnea, y modula dicho proceso a través de su interacción con el glicotopo LacNAc presente en glicanos de las integrinas (Yang *et al.*, 2017).

La presencia de la lectina LDG-I inhibió la migración celular de los queratinocitos epidérmicos HaCat en todas las condiciones probadas. Estos resultados concuerdan con el hecho de que otras lectinas, también con especificidad por manósidos, no promueven la formación de lamelipodios y pueden inhibir la unión de integrinas de queratinocitos con componentes de la MEC; mientras que promueven la migración en otros tipos celulares como por ejemplo en neutrófilos (Elifio-Esposito *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2015). La predominancia de glicanos oligomanósidos en la estructura de las lamininas podría promover la unión de LDG-I, lo cual también inhibiría la migración sobre la laminina 332 secretada en la MEC de los queratinocitos. Por otro lado, la fucosilación en enlace  $\alpha 1,6$ , una de las modificaciones más comunes en glicoproteínas y glicolípidos, también puede regular funciones biológicas de moléculas de adhesión y de receptores de crecimiento (Miyoshi *et al.*, 2008). El núcleo  $\alpha 1,6$ -Fuc de la integrina  $\alpha 3\beta 1$  (principal receptor de laminina 332 en queratinocitos) es esencial para su función durante la migración celular (Zhao *et al.*, 2006). La LDG-I fue la única de las 3 lectinas vegetales evaluadas que interactuó con la N-glicoforina que contenía

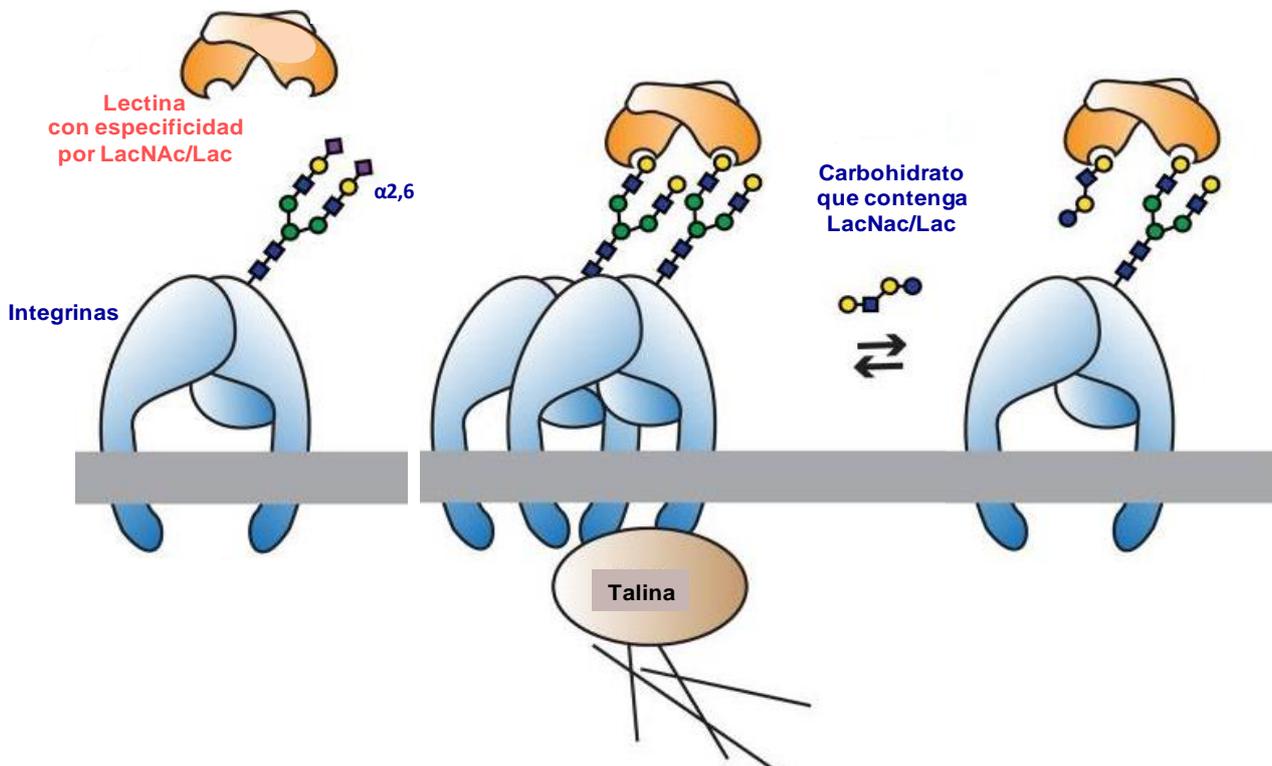
dicho núcleo; y esto podría correlacionarse con la actividad inhibitoria de la migración de esta lectina, al interactuar con éste glicotope necesario en la interacción con la laminina 332. Otros glicanos con los que puede interactuar la LDG-I y que no son ligandos de las lectinas de tipo II son N-glicanos con GlcNAc externo que regulan la función biológica de la laminina en la MEC (Kariya *et al*, 1994); y la asociación de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  con la laminina LN332 (Kariya & Gu, 2011). Se podría inferir que la inhibición de la migración se debe a la interacción simultánea de esta lectina tipo I con varios glicanos presentes en moléculas no solo de la superficie celular sino también de la MEC; el conjunto de todas las interacciones podría impedir la adhesión y la migración celular en queratinocitos.

LDG-II mostró efecto migratorio a 6.25 – 25  $\mu\text{g/mL}$ , y LGL-II promovió la migración a 3.12 y 6.25  $\mu\text{g/mL}$ . El efecto migratorio de las lectinas LDG-II y LGL-II en los queratinocitos epidérmicos fue inhibido por lactosa, indicando que la interacción fue dependiente de carbohidratos; de igual forma que se ha observado que la formación del complejo galectina LSGAL3-integrina  $\alpha 6\beta 4$ -EGFR, que induce migración celular, es inhibido por lactosa; y que la asociación de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  con el EGFR es parcialmente dependiente del entrecruzamiento mediado por LSGAL3 a través de sus N-glicanos (Kariya *et al*, 2010). LDG-II y LGL-II mostraron efectos positivos sobre la migración de los queratinocitos, pueden reconocer ligandos con los que interactúa la LSGAL3, y además su efecto fue inhibido por lactosa; por lo tanto, podríamos pensar que el efecto migratorio de las lectinas vegetales tipo II también podría deberse a la interacción de las lectinas con algunos glicanos en el EGFR y en las integrinas. Por otro lado, el núcleo  $\alpha 1,6$ -Fuc, esencial para las funciones migratorias de la integrina  $\alpha 3\beta 1$  (Zhao *et al*, 2006), no fue detectado por ninguna de las dos lectinas tipo II ensayadas (Capítulo 3), lo que no impediría las funciones de dicho glicotope.

Es de notar que, de manera similar como ocurre en la proliferación celular, diferentes lectinas con afinidad por LacNAc han mostrado efectos distintos sobre la migración de queratinocitos, dependiendo de la especificidad por modificaciones de dicho glicotope con otros azúcares circundantes. Es así como, las galectinas específicas de la epidermis, LSGAL3 y LSGAL7, promueven la formación de lamelipodios y la migración celular (Kariya *et al*, 2010; Liu *et al*, 2012; Saravanan *et al*, 2009); mientras que la adición de LSGAL1 exógena, con especificidad por LacNAc terminal monovalente, inhibe la migración celular (Klíma *et al*, 2009; Saravanan *et al*, 2009); y la adición de galectina LSGAL8, con especificidad por el tetrasacárido que representa al grupo histo-sanguineo B [Fuc $\alpha 1,2$ (Gal $\alpha 1,3$ )LacNAc], inhibió la adhesión de queratinocitos HaCat (Levy *et al*, 2001) y no promovió la formación de lamelipodia (Saravanan *et al*, 2009). Más adelante, Jung *et al* (2013) detectaron que los queratinocitos HaCat expresan el grupo B en su superficie, y observaron que la disminución de la expresión de dicho glicotope, usando ARN de interferencia de la fucosiltransferasa FUT1, redujo la expresión de fibras de actina y la formación de lamelipodia, e inhibió la migración celular; la transcripción de *cdc42*, un tipo de Rho GTPasa con un papel clave en la polimerización de la actina, también se redujo en las células HaCat con el grupo B disminuido. Este estudio abre la posibilidad de que los determinantes histo-sanguíneos ABO, en conjunto con otros glicotopes, también puedan regular el mecanismo de migración celular.

La sialilación del glicotope LacNAc también pueden afectar la interacción con lectinas promigratorias (Fig. 4-29), por ejemplo, la sialilación en enlace  $\alpha 2,6$  de la subunidad  $\beta 1$  de las integrinas impide la unión a LGALS3 (Kariya *et al*, 2010) debido a que sitios de unión en el residuo de galactosa de LacNAc están bloqueados por la presencia de ácido siálico  $\alpha 2,6$  (de Oliveira *et al*, 2011; Zhuo *et al*, 2008); aunque la interacción no disminuye con poli-LacNAc en glicanos sialilados

en enlace  $\alpha 2,3$  (O/N-glicoproteínas o glicoesfingolípidos) (Collins *et al*, 2014; Stowell *et al*, 2008). De manera similar, LDG-II y LGL-II no interactúan con glicanos que contienen LacNAc sialilado en enlace  $\alpha 2,6$ , mientras que LDG-II interactúa con glicanos sialilados en enlace  $\alpha 2,3$ .



**Figura 4-29. Influencia de la estructura de los glicanos de las integrinas sobre la unión de lectinas con afinidad por LacNAc.** La interacción de lectinas con glicanos de las integrinas se ve disminuida cuando LacNAc está presente como disacárido subterminal unido a ácido siálico terminal en enlace  $\alpha 2,6$ . Los oligómeros de integrina propiciados por lectinas con especificidad por LacNAc interactúan con reguladores del citoesqueleto como talina, lo cual conlleva a un aumento en la movilidad. La adición de carbohidratos competitivos (Lac, LacNAc o LacNAc-Lac) conllevan a disrupción de interacciones lectina-integrina en la superficie celular, disminuyendo la formación de oligómeros de integrinas, y esto podría deberse a la competencia por sitios importantes en la dimerización de las integrinas o por el bloqueo de sitios de unión a los dímeros. Adaptado de Yang *et al*, 2017.

La preferencia por O-glicanos de las dos lectinas vegetales tipo II ensayadas podría indicar que el efecto de LGL-II se debe a la interacción con O-glicanos que contengan poli-LacNAc, los cuales también han mostrado efectos migratorios (Tsuboi *et al*, 2012); en las integrinas, por ejemplo, LacNAc puede estar expresada como disacárido terminal o subterminal (N-glicanos); y también como cadenas de poli-LacNAc (N/O-glicanos). Y, el efecto de LDG-II podría deberse a la interacción con glicanos que presentan el glicotipe T $\alpha$ , que se han detectado en la subunidad  $\beta 4$  de las integrinas (Kariya & Gu, 2011; Uemura *et al*, 2009). Por otro lado, las interacciones de estas lectinas también podrían darse con glicoesfingolípidos que contengan glicotipes ligandos, influyendo así en la formación de balsas lipídicas y transducción de señales celulares (Collins *et al*, 2014).

Tabla 4-8. Migración y adhesión en células normales en presencia de lectinas						
Lectina	Especificidad*	Efecto	Tipo celular o estructura	Conc. (µg/mL)	Método	Ref.
ConA	Man/Glc; GN <sub>2</sub> Man <sub>3</sub>	No promueve formación de lamelipodia	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
LDG-I	Man/Glc/ Oligomanósidos	Inhibe migración celular	Queratinocitos epidérmicos humanos HaCat	1.5 - 25	Ensayo rasguño	Presente trabajo
LDG-II	NeuAα2,3Gal/ Galβ1,3GalNacα/ Lac	Promueve migración celular a 6.25- 25 µg/mL No influye sobre la migración a 1.5 µg/mL.	Queratinocitos epidérmicos humanos HaCat	1.5 - 25	Ensayo rasguño	Presente trabajo
LGALS1	LacNac/Lac	No promueve formación de lamelipodia	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
LGALS1	LacNac/Lac	Inhibe migración	Queratinocitos epidérmicos porcinos	100	Ensayo rasguño; tripsinización; sustrato: placa	Klíma <i>et al</i> , 2009
LGALS3	Poli-LacNac/ NeuAα2,3-poli-LacNac/ LacNac/Lac/	Promueve migración celular	Queratinocitos de prepucio neonatal humano y queratinocitos epidérmicos murinos	1.5	Imágenes por microscopia. Sustrato: placa y colágeno	Liu <i>et al</i> , 2012
LGALS3	Poli-LacNac/ NeuAα2,3-poli-LacNac/ LacNac/Lac/	Estimula migración celular	Queratinocitos humanos normales inmortalizados (HNIK)	6.3	Ensayo rasguño, Imágenes	Kariya <i>et al</i> , 2010
LGALS3	Poli-LacNac/ NeuAα2,3-poli-LacNac/ LacNac/Lac/	Promueve formación de lamelipodia y filopodia con máximo a 25 µg/mL	Queratinocitos humanos de córnea inmortalizados (HCLE), cultivo primario de células epiteliales de córnea y queratinocitos humanos Hacat	5 - 100	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
LGALS3	Poli-LacNac/ NeuAα2,3-poli-LacNac/ LacNac/Lac/	Promueve migración	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
LGALS3	Poli-LacNac/ NeuAα2,3-poli-LacNac/ LacNac/Lac/	Inhibe adhesión celular	Queratinocitos humanos normales inmortalizados (HNIK)	30 - 50	ELISA, Sustrato: laminina	Kariya <i>et al</i> , 2010
LGALS7	LacNac-Lac	Promueve formación de lamelipodia	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
LGALS8	Fuca1,2(Galα1,3)LacNac	No promueve formación de lamelipodia	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
LGL-II	H-tipo II/LacNac/ Galβ1,3GalNAcα/ GalNAcα/Lac	Modula la migración celular de manera no proporcional a la concentración.	Queratinocitos epidérmicos humanos HaCat	1.5 – 6.25	Ensayo rasguño	Presente trabajo

		Promueve la migración a 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ > 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; e inhibe la migración a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .				
<b>PNA</b>	Gal $\beta$ 1,3GalNAc $\alpha$ /Gal $\beta$ 1,3Gal	No promueve formación de lamelipodia	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
<b>RCA</b>	R <sup>1</sup> -Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R	No promueve formación de lamelipodia	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
<b>WGA</b>	NeuA $\alpha$ 2,3Gal-R/HexNAc $\beta$ 1,4-R	No promueve formación de lamelipodia	Queratinocitos humanos de córnea (HCLE)	25	Microscopia fluorescencia; video; sustrato: fibronectina-colágeno	Saravan <i>et al</i> , 2009
<b>Plumieri-betina</b>	Tetramanan ( $\beta$ 1,4)	Inhibe 50% unión de integrina $\alpha$ 3 $\beta$ 1	Laminina 332 (encontrada en MEC de queratinocitos)	0.014	ELISA para unión de integrina a lectina	de Santana Evangelista <i>et al</i> , 2009

**Abreviación/descripción.** Igual que en Tabla de viabilidad o proliferación. MEC: matriz extracelular.

## 5. Discusión general

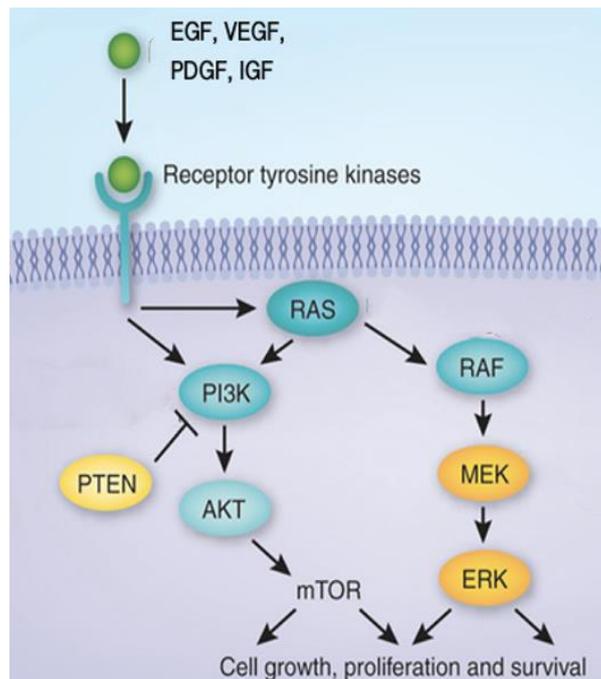
La interacción de las lectinas con estructuras glicosídicas en la superficie de las células o en la matriz extracelular (MEC) puede inducir distintas respuestas celulares. Lo anterior concuerda con el hecho que células de diferentes organismos u origen tisular pueden expresar glicoconjugados de MEC o glicoreceptores de membrana que presentan glicotopes específicos y en diferente proporción, obteniéndose así un glicofenotipo celular particular que podría interactuar con un grupo determinado de lectinas (Radhakrishnan *et al*, 2014; Lima *et al*, 2013, Méhul *et al*, 2003).

Se han realizado aproximaciones para definir el tipo de glicosilación y, algunas veces, los glicotopes específicos, presentes en glicoconjugados celulares, incluyendo aquellos presentes en la piel humana (Anexos XIV y XV), y glicotopes que tienen un papel en proliferación o migración en queratinocitos y otros tipos celulares (Holíková *et al*, 2002; Kariya *et al*, 2010; Lima *et al*, 2013; Méhul *et al*, 2003; Radhakrishnan *et al*, 2014; Saravanan *et al*, 2009; Zhao *et al*, 2006). A su vez, lectinas de diferente origen han sido caracterizadas en diversos grados de detalle con respecto a su estructura y función, y a los grupos específicos de los residuos de carbohidratos que pueden reconocer en los glicoconjugados, probando posibles ligandos naturales o aquellos que están disponibles comercialmente (Iskratsch *et al*, 2009; Maupin *et al*, 2012).

Los efectos negativos de la lectina LDG-I sobre los procesos de proliferación y la migración de los queratinocitos epidérmicos puede deberse a la interacción simultánea de esta lectina tipo I con varios glicanos tanto activadores como supresores de la actividad del receptor EGFR como de las integrinas, y también con moléculas de la MEC; y el conjunto de todas las interacciones podría impedir la proliferación, la adhesión y la migración celular en queratinocitos. Mientras que, los efectos proliferativos y migratorios de las lectinas LDG-II y LGL-II, pueden relacionarse con el

hecho de que esas lectinas tipo II son más específicas (al interactuar con menor número de glicanos), y además, que LGL-II pueda interactuar con poli-LacNAc (interacción activadora), y que LDG-II pueda inhibir glicolípidos supresores como el GM3 sialilado en enlace  $\alpha 2,3$ , o interactuar con el glicotopo T $\alpha$  presente en algunas integrinas.

Los glicanos que presentan poli-LacNAc en receptores celulares son un ligando común de lectinas que pueden promover la migración y la proliferación en queratinocitos, como el caso de LGL-II y la LGALS3 de origen mamífero. Las vías MAPK y PI3K/AKT que inician con la activación del EGFR, controlan la proliferación, supervivencia y diferenciación; y pueden actuar como una red de señalización interconectada ejerciendo efectos cooperativos o antagónicos dependiendo del estímulo externo (Fig. 4-32). Este receptor puede ser modulado por LGALS3 (Liu *et al.*, 2012; Kariya *et al.*, 2010; Saravan *et al.*, 2009; Friedrichs *et al.*, 2008); y también se ha observado expresión de Akt fosforilada (pAkt) en lisados de células HaCat que fueron cultivadas en presencia de LGALS3 (Patrino *et al.*, 2015). En los lisados de queratinocitos HaCat cultivados en presencia de LDG-II y LGL-II se observó efecto proliferativo, y también la inmunodetección del EGFR tanto a nivel basal como fosforilado, lo que indicaría que la interacción de éstas lectinas vegetales con glicanos de la superficie de los queratinocitos conllevan a la activación del receptor.



**Figura 4-30. Vías de señalización proliferativa en mamíferos.** Vías PI3K/AKT/mTOR y Ras/MEK/ERK. EGF: factor de crecimiento epidérmico; VEGF: factores de crecimiento vascular endotelial; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; IGF: factor de crecimiento insulina like; PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa; mTOR: molécula blanco de rapamicina. Recuperado de [http://www.discoverymedicine.com/Gulden-Menderes/files/2016/05/discovery\\_medicine\\_no\\_116](http://www.discoverymedicine.com/Gulden-Menderes/files/2016/05/discovery_medicine_no_116).

Por otro lado, los ligandos de receptores proteína quinasa (e.g. EGF, HGF, FGF) son reguladores positivos de la reepitelización, iniciando la migración y proliferación en los queratinocitos (Koivisto *et al.*, 2006), entonces el efecto proliferativo y migratorio de la LGL-II, en ciertas concentraciones, también se puede correlacionar con el aumento en el EGF en sobrenadantes de células HaCat cultivadas en presencia de esta lectina. Las Integrinas  $\beta 1$  actúan mancomunadamente con EGF

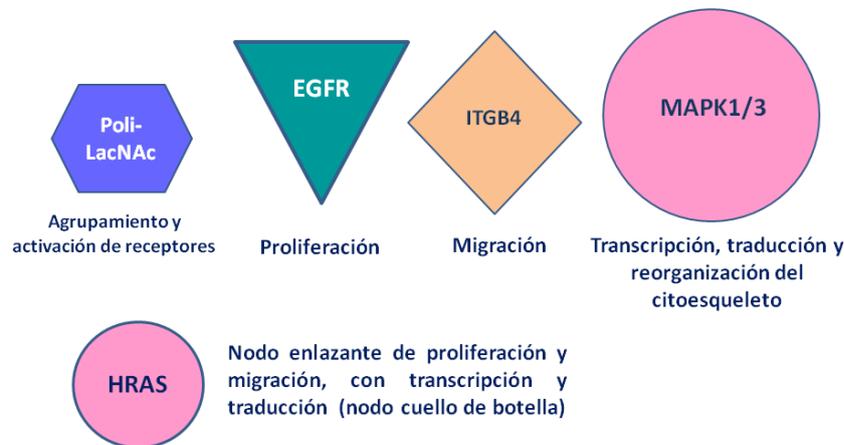
para regular la migración de queratinocitos sobre componentes de la MEC a través de las vías PI3K y MEK/ERK (Watson *et al*, 2009). Es interesante notar que las lectinas que promueven la secreción de factores de crecimiento difieren entre sí en su especificidad por carbohidratos, y que esas mismas lectinas pueden promover o no la producción de diferentes factores de crecimiento o la ocurrencia de diferentes procesos celulares. Por ejemplo, la baja adhesión celular a las lectinas JAC y WGA inmovilizadas no se correlaciona con la habilidad de estas lectinas de inducir la producción del factor de crecimiento VEGF-C en células MDA-MB-231 (Timoshenko *et al*, 2010). De igual manera, la baja producción de EGF en células HaCat cultivadas en presencia de la lectina LDG-II no se correlacionó con la habilidad de la lectina de promover proliferación y migración en esta línea celular. Esto evidencia que diferentes glicotopes pueden ser responsables de la adhesión celular y de la modulación de factores de crecimiento en el mismo tipo celular. Por otro lado, la variedad de ligandos de LDG-I que eventualmente puedan estar presentes en la superficie de queratinocitos podría conllevar a efectos opuestos que en sumatoria se inclinan hacia la inhibición de la proliferación y la migración en este tipo celular.

### 5.1. Redes de interacciones en queratinocitos en presencia de lectinas extracelulares

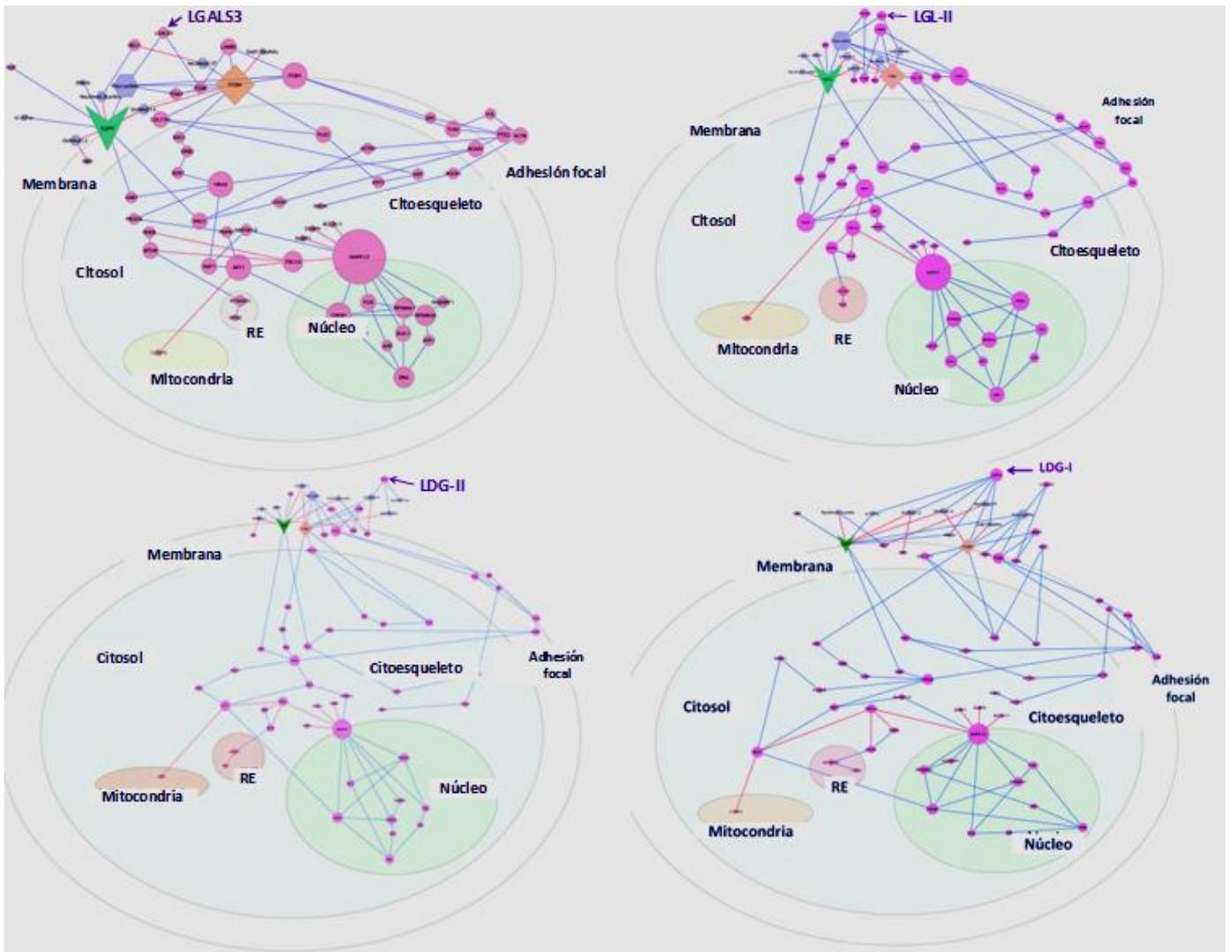
Relacionando las especificidades de las tres lectinas vegetales ensayadas y de la LGALS3, con sus respectivos efectos sobre los procesos de proliferación y migración en queratinocitos epidérmicos, y con las funciones reportadas para ciertos glicotopes presentes en glicoproteínas de membrana de queratinocitos como el EGFR y las integrinas  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$ , y en el gangliósido GM3; así como con la función de la neuraminidasa NEU1 humana en la membrana; se propusieron redes de interacciones moleculares que pueden ser reforzadas o atenuadas por la presencia de lectinas exógenas en queratinocitos, la mayoría de las cuales inician con la interacción de las lectinas con glicoconjugados con los que pueden interactuar en la superficie celular. Las interacciones en estas redes son del tipo proteína-carbohidrato de glicoproteína; proteína-carbohidrato de glicolípido y carbohidrato-carbohidrato.

En las interacciones dadas en presencia de lectinas se observó que uno de los mayores centros de actividad (*hubs*), por el cuales se transmite la información más relevante en los queratinocitos (Fig. 4-31), estuvo representado en el núcleo por la quinasa activada por mitógenos MAPK1/3, que es un cuello de botella para la generación de redes, dado que cuenta con sustratos tanto en el núcleo como en citosol; entre sus sustratos de fosforilación en el núcleo para queratinocitos están reportados los factores de transcripción CREB, ELK1, ATF-1 y FOS; y la quinasa  $\alpha 5$  de la proteína ribosomal S6 (RPS6KA5); y en el citosol la quinasa  $\alpha 1$  de la proteína ribosomal S6 (RPS6KA1) y el factor 1 liberador del nucleótido guanina Ras-específico (RASGRF1); mientras que inhibe a la proteína apoptótica BCL2L11 y al supresor de tumor TSC2. Así mismo, MAPK1/3 es fosforilada por la quinasa MAP2K1/2, e inhibida por las fosfatasa DUSP1 y DUSP6. En la membrana, los *hubs* son el EGFR y la integrina  $\beta 4$  (ITGB4); receptores que poseen en su estructura mayor número de glicotopes activadores o supresores de la actividad, algunos de los cuales pueden ser ligandos de las lectinas estudiadas.

**Figura 4-31. Mayores centros de actividad (*hubs*) y sus funciones asociadas en queratinocitos**

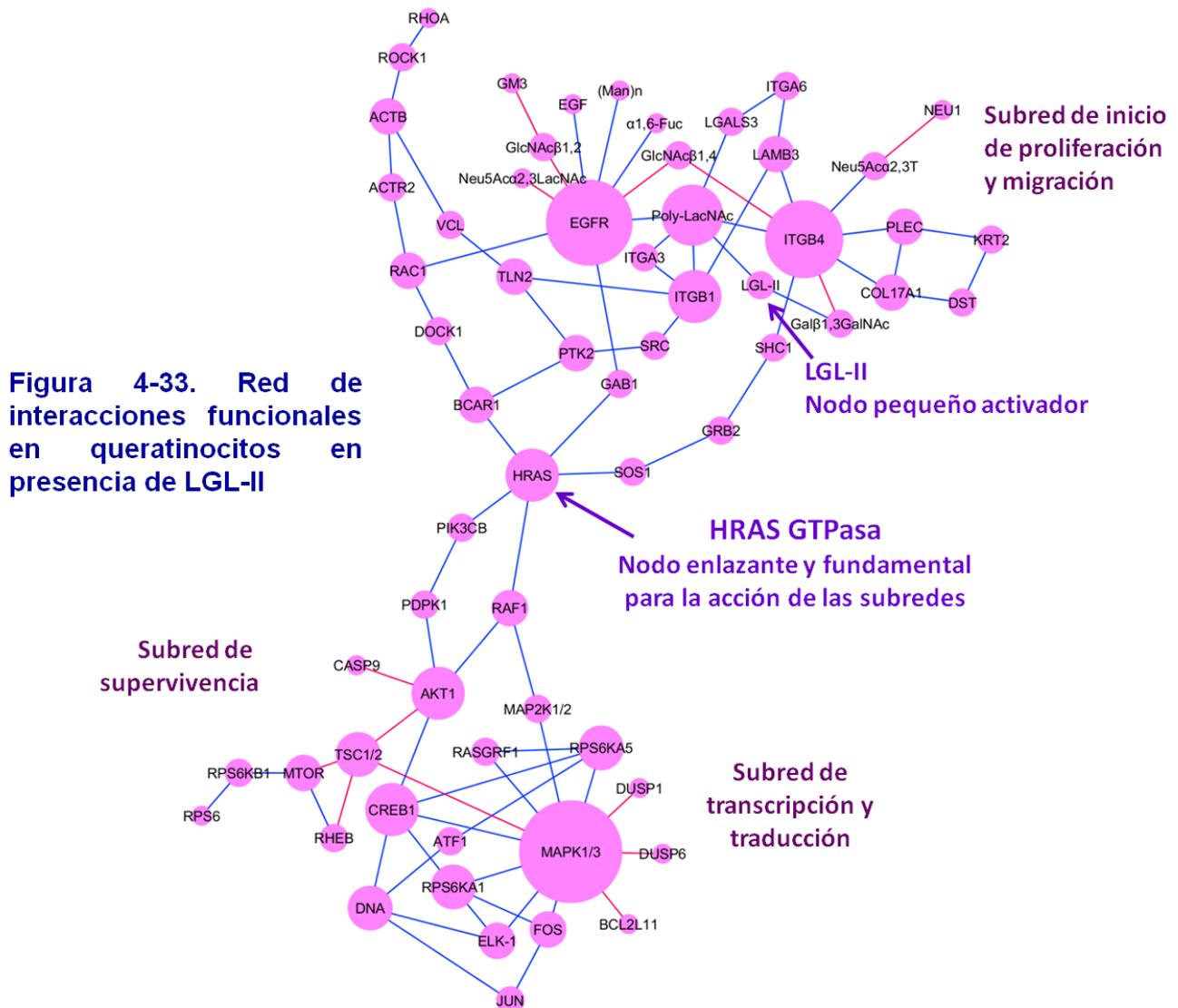


La lectina LGL-II podría tener una interacción directa de con los receptores a través del glicotipe activador LacNAc expuesta, mientras que LDG-I y LDG-II pueden unir glicotipes diferentes. Los efectos proliferativos y migratorios funcionales observados en los queratinocitos cultivados en presencia de LGL-II en las dosis bajas (1, 5 – 6,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) se correlacionan con la activación del EGFR y la secreción del EGF, en proporciones del doble de la activación y la secreción observadas en presencia de la demás lectinas. Los picos en la activación del EGFR se observaron a los 10 min con LGL-II, a los 5 min con LDG-II y a los 30 min con LGALS3, lo cual podría llevar a proponer un efecto complementario entre la LGL-II y la LGALS3 endógena que impide una caída rápida en la activación del receptor, como si ocurre con la LDG-II que activó el receptor a los 5 min pero luego, la activación disminuyó rápidamente en el tiempo. El efecto complementario se propone por la especificidad alta de LGL-II y LGALS3 por LacNAc expuesta, pudiendo ambas interactuar con EGFR e integrina  $\beta 4$ ; mientras que, el efecto proliferativo y migratorio de la LDG-II en dosis entre 1, 5 –25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , pudo deberse a la activación indirecta del receptor a través de la unión de LDG-II al GM3 sialilado, inhibidor del EGFR, aunque también a través de las integrinas y de otros receptores de los que aún no se tiene información completa del tipo de glicosilación.



**Figura 4-32. Redes de interacciones según localización, dependientes de las lectinas generados usando la herramienta bioinformática Cytoscape.**

En la Fig. 4-33 se observan las redes de interconexiones moleculares en presencia de LGL-II. El nódulo enlace entre los procesos de proliferación y migración celular, con los procesos de transcripción y la traducción en queratinocitos, esta representado por la HRAS GTPasa, el efector de intercambiadores y adaptadores relacionados con el EGFR y con la ITGB4, y del adaptador BCAR1 en las adhesiones focales; y por el otro lado, HRAS interviene en la activación de AKT a través de la quinasa protooncogenica RAF1 y de la proteína quinasa dependiente de fosfoinositoles PDK1.



La cicatrización de heridas cutáneas es un proceso complejo, en el que la promoción de la migración y la proliferación de queratinocitos en la periferia de la herida son pasos necesarios para el cierre rápido de la herida. Se ha observado que la vía de señalización de PI3K-Akt-mTOR puede representar un componente clave del proceso de curación cutánea normal. La activación de la vía PI3K-AKT aumenta la tasa de cierre de la herida en función de la activación de mTOR (Squarize *et al.*, 2010).

Durante la cicatrización normal de las heridas cutáneas, la proliferación y la migración de queratinocitos epidérmicos son promovidas por la formación de redes en la superficie celular entre lectinas con especificidad por  $\beta$ -galactósidos, con glicanos de receptores como el EGFR e integrinas. La ocurrencia de dichos procesos es relevante durante la reepitelización de la piel, la cual ocurre reconstituyendo la epidermis durante la fase proliferativa de la cicatrización (Guo *et al.*, 2010; Pastar *et al.*, 2014); e igualmente se han observado *in vitro* usando diferentes tipos de queratinocitos. La tasa de reepitelización normal es lenta, lo que conlleva a una formación de

barrera cutánea tardía y a una mayor oportunidad de ocurrencia de infecciones. En la mayoría de los casos, las fallas en la reepitelización son atribuidas a una reducción en el potencial de las células epiteliales de migrar a través del lecho de la herida (Bielefeld *et al.*, 2013). Se ha observado que la reepitelización de heridas aumenta en presencia de LGALS3 exógena (10 µg/mL, 43%), en comparación con las heridas sin LGALS3 exógena (Panjwani *et al.*, 2014).

El presente trabajo representa la primera vez que se reportan efectos proliferativos y migratorios de lectinas tipo II de la tribu Diocleae con especificidad por galactósidos; así como inhibición de la migración celular por la lectina LDG-I con especificidad por manósidos y otros glicotopes, en queratinocitos HaCat. Las lectinas LDG-II y LGL-II son moléculas con actividad potencial durante la reepitelización cutánea por presentar efectos tanto proliferativos como migratorios en queratinocitos epidérmicos, pudiendo así complementar la actividad de LGALS3, y aumentar la tasa de cierre durante la reepitelización de las heridas cutáneas. Futuros estudios son necesarios para comprobar el efecto de estas dos lectinas vegetales tipo II de la Tribu Dioclea (Familia Fabaceae) en heridas cutáneas *in vivo*.

## 6. Conclusiones

El flujo metodológico de purificación propuesto nos permitió separar las dos lectinas presentes en las semillas de las dos especies estudiadas, *Dioclea grandiflora* y *Galactia lindenii*, mediante una cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE del extracto de cada especie, y posterior cromatografía de afinidad para cada lectina.

Durante el proceso de extracción se debe tener en cuenta la cantidad de harina, la proporción de buffer y el pH 7.2 para obtener mejores rendimientos de extracción y títulos específicos en la obtención de la lectina de *G. lindenii* de tipo II (LGL-II).

La lectina de *Dioclea grandiflora* de tipo I (LDG-I) pierde actividad durante el proceso de liofilización, por esta razón, durante las etapas de purificación se debe evitar este proceso para concentrarla.

La estructura terciaria de la LGL-II *in silico* tiene 16 hebras  $\beta$  organizadas de forma antiparalela formando un barril- $\beta$ , y ocho bucles flexibles que forman la superficie de unión al ligando, el plegamiento es tipo Leguminosa; las mejores interacciones se dieron con el determinante de tipo H-2 y el disacárido II $\beta$  (LacNAc II), y se encontró que se presenta una frecuencia alta de residuos de aminoácidos polares y básicos en el sitio de reconocimiento carbohidrato-proteína, tales como Asn > Ser > Arg.

LDG-I y LDG-II reconocen glicoconjugados que contengan ácido siálico terminal en enlace  $\alpha$ 2,3.

LDG-II fue la más específica sobre el glicotopo T en *cluster*; mientras que la LGL-II cuando Gal y GlcNAc están unidos por un enlace  $\beta$ 1,4; además de una mayor diversidad de estructuras glicosídicas.

LGL-II aglutina eritrocitos O > T > Tn > B > rata, A, mientras que no aglutina eritrocitos de oveja, vaca, caballo, ni perro. LDG-II aglutina T >> cerdo, mientras que no aglutina eritrocitos ABO, ni de oveja. La LDG-I aglutina eritrocitos de caballo > conejo, perro > cerdo, T, Tn > A, B ≥ oveja > O.

Las tres lectinas mostraron interacción con el anticuerpo anti-HRP (LGL-II > LDG-II > LDG-I) indicando la presencia de glicanos con el núcleo  $\alpha$ 1,3-Fuc en la estructura de las lectinas. Hasta la fecha no se había detectado glicosilación en la lectina LDG-I, sin embargo, los resultados de su interacción con el anticuerpo anti-HRP indicaría que podría contar glucanos en su estructura, aunque en menor cantidad que los encontrados en las lectinas tipo II.

Las lectinas LDG-II y LGL-II, con especificidad por ciertos galactósidos, mostraron efectos tanto proliferativo como migratorio en los queratinocitos (1.5 – 25  $\mu$ g/mL, dependiendo del proceso y de la lectina).

El efecto migratorio de LDG-II y LGL-II fue inhibido por la presencia de lactosa, indicando la dependencia de reconocimiento de carbohidratos en el proceso.

LDG-I con especificidad por manósidos y otros glicotopes, mostró efecto proliferativo solo a la menor concentración probada (1.5  $\mu$ g/mL) e inhibió la migración de los queratinocitos epidérmicos HaCat en todas las condiciones ensayadas.

Los efectos sobre la proliferación y migración de las lectinas se correlacionan con la especificidad de sus glicotopes ligandos.

LDG-II y LGL-II interactúan con menor número de estructuras glicosídicas que la LDG-I.

De las tres lectinas, LGL-II interactúa directamente con el glicotipe LacNAc expuesta, glicotipe activador de proliferación y migración celular, presente en EGFR e integrinas.

La presencia de LGL-II en cultivos de queratinocitos promovió un aumento significativo ( $\approx$  2x) en la concentración del factor EGF.

LDG-II y LGL-II no interactúan con el trimanósido expuesto, ni con GlcNAc terminal o con el núcleo  $\alpha$ 1,6-Fuc, glicotopes que están presentes en la estructura de los receptores de membrana.

LDG-I puede interactuar con glicofomas tanto supresoras (NeuAc $\alpha$ 2,3 terminal y GlcNAc  $\beta$ 1,4 terminal biseccionada), como activadoras (núcleo  $\alpha$ 1,6-Fuc y GlcNAc en ramificaciones  $\beta$ 1,6) de la actividad del EGFR y de la integrina  $\beta$ 4; y con oligomanósidos presentes en la laminina 332; interacciones simultáneas que pueden conllevar a rigidez de los receptores impidiendo su actividad en proliferación, adhesión y migración, y a saturación de los sitios de unión proporcional a la concentración de la lectina.

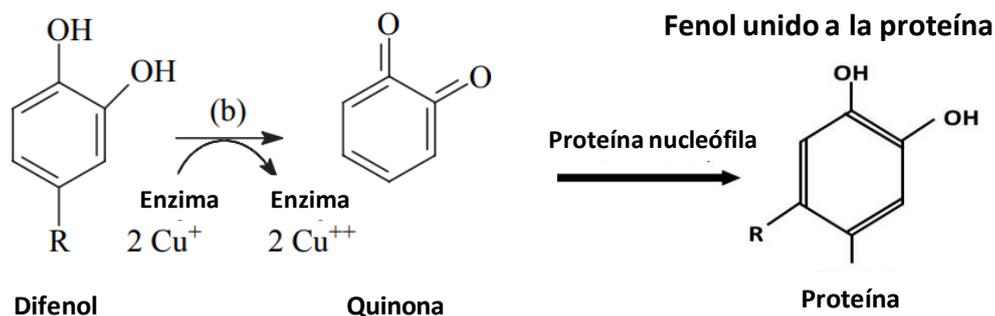
En las redes de interacciones moleculares del tipo proteína-carbohidrato de glicoproteína; proteína-carbohidrato de glicolípido y carbohidrato-carbohidrato, propuestas para los queratinocitos epidérmicos humanos en presencia de lectinas, los mayores centros de actividad en la membrana fueron el EGFR y la integrina  $\beta$ 4 (ITGB4); y en el núcleo fue la quinasa activada por mitógenos MAPK1/3.

El nódulo enlace de los procesos de proliferación y migración celular, con los procesos de transcripción y la traducción en queratinocitos, estuvo representado por la HRAS GTPasa, el efector de intercambiadores y adaptadores relacionados con receptores de membrana y con adhesiones focales; así como actor en la activación de la vía de supervivencia celular concertada por AKT.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo representan una primera aproximación a la elucidación de los mecanismos moleculares por los cuales lectinas vegetales, con determinada especificidad de ligando, pueden modular dichos procesos en queratinocitos, potencializando o disminuyendo el efecto de lectinas endógenas; y aportan a la búsqueda de moléculas activas con potencial cicatrizante de lesiones cutáneas.

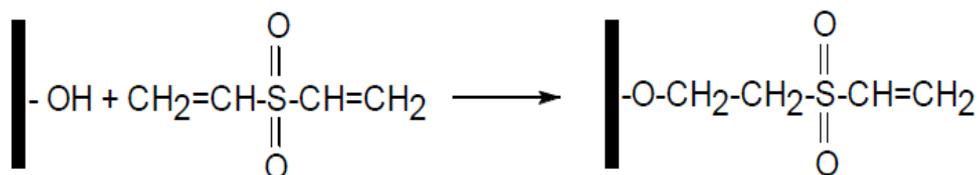
## 7. Anexos

### Anexo I. Reacción de oxidación de fenoles catalizada por polifenoloxidasas.



Las quinonas formadas por la oxidación de fenoles pueden unirse de forma covalente a grupos activos como sulfidilo e imino en las proteínas de la planta y a aminoácidos libres, formando complejos proteína-fenol que pueden reducir la solubilidad y la estabilidad de las proteínas, o causar pérdida completa de la actividad debido a precipitación o inhibición (Van Driessche *et al.*, 1984). Las quinonas pueden condensarse produciendo pigmentos de color café. La tioúrea remueve de manera eficiente y en un rango de pH amplio (3 – 9.6), los cationes de cobre de las polifenoloxidasas (PPO) vegetales, inhibiendo así dichas enzimas y evitando la conversión de polifenoles a quinonas. La tioúrea no afecta proteínas que contengan cisteína, triptófano o Tyr, residuos cuyos espectros de absorción pueden experimentar cambios con el uso de otros inhibidores de fenoloxidasas, tales como el metabisulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), el cual afecta el triptófano y además inhibió la actividad eritroaglutinante de la lectina del tubérculo de tomate al ser usado durante la extracción y diálisis; o el dietilditiocarbamato (DIECA) que afecta cisteína y cistina (Van Driessche *et al.*, 1984) y redujo apreciablemente la actividad lectina LSBo de *Salvia bogotensis* (Vega & Pérez G, 2006). Igualmente, en ensayos preliminares Almanza *et al.* (2004) y Vega & Pérez G (2006) observaron disminución en los títulos de aglutinación de los extractos de semillas de *G. lindenii* y *S. bogotensis*, respectivamente, cuando se realizó la extracción en presencia del agente que precipita polifenoles, polivinilpolipirrolidona (PVPP). La pérdida de actividad lectina en presencia de PVPP se atribuye a la adsorción de las proteínas sobre la PVPP. El ácido ascórbico exógeno redujo la actividad LSBo y no disminuyó los pigmentos del extracto, mientras que este agente si disminuyó la actividad PPO en lechuga (Landi *et al.*, 2013). Imagen adaptada de Queiroz *et al.* 2008 y Lee *et al.*, 2009.

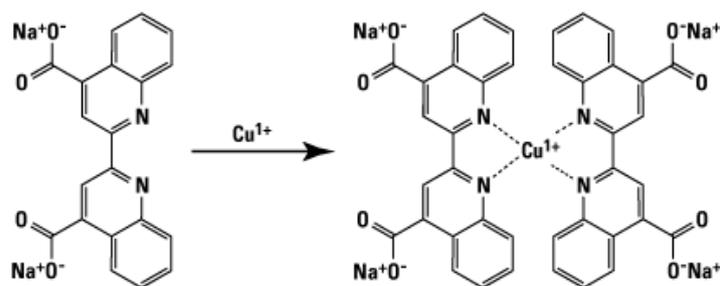
## Anexo II. Activación de *Sepharose* por divinil sulfona (DVS)



La DVS reacciona con la matriz de *Sepharose* 4B (polímero polihidroxilado de agarosa al 4%) para dar lugar a divinil DVS-agarosa activada. Este polímero intermedio es atacado por grupos nucleófilos como los hidroxilos presentes en la lactosa. Ref: Hermanson *et al*, 1992.

Inicialmente, se tomaron 10 mL de *Sepharose* 4B resuspendida en metanol 5%. Con ayuda de un embudo y una bomba de vacío, el soporte se lavó con 100 mL de agua desionizada y se equilibró con 100 mL de carbonato de sodio 0.5 M, pH 11. El gel se resuspendió en 10 mL de la misma solución. Luego, en cabina de extracción, al gel en agitación muy suave se le adicionó gota a gota 1.5 mL de DVS, y la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. Para eliminar la DVS se realizaron lavados con agua desionizada (100 mL) y posteriormente con carbonato de sodio 0.5 M (100 mL). El soporte activado se resuspendió en 10 mL de carbonato de sodio 0.5 M que contenía Lac 0.3 M y se dejó en agitación suave durante 24 h, con el fin de que se realizara el acople. Finalmente, el soporte se lavó con agua desionizada (200 mL), y en cabina de extracción, el gel se resuspendió en 10 mL de carbonato de sodio 0.5 M que contenía 0.5 mL de  $\beta$ -mercaptoetanol, con el fin de bloquear los grupos activados residuales. La mezcla se dejó reaccionar durante 2 h a temperatura ambiente con agitación muy suave. El gel acoplado se lavó con agua desionizada (200 mL) seguido de una solución de NaCl 0.1 M (200 mL), se equilibró en PBS pH 7.2-7.4 y se empacó en una columna con capacidad para 10 mL.

## Anexo III. Reacción del ácido biscinconínico (BCA) con el ion cuproso



Sal sódica de BCA

Reacción BCA-Cobre

El principio de la cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA) se basa en la reducción del  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  por las proteínas, en condiciones alcalinas (reacción de Biuret), y la formación de color púrpura por la quelación de dos moléculas de BCA por una del ion  $\text{Cu}^{+1}$  (Smith *et al.*, 1985).

#### Anexo IV. Preparación de buffer PBS con iones

Con el fin de evitar que el PBS en presencia de cationes divalentes se precipite cuando se refrigera, se preparan las soluciones A 10X y B 10X, que se diluyen y se mezclan al momento del ensayo:

Por 1 L de cada solución 10X:

Solución A 10X:

174 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ... 23.43 g

35 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  .... 4.83 g

Solución B 10X:

50 mM  $\text{CaCl}_2$  ... 7.2 g

35 mM  $\text{KCl}$ ... 2,6 g

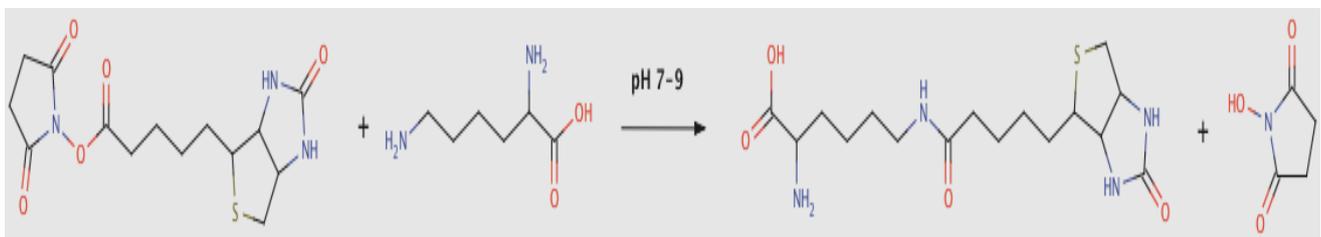
50 mM  $\text{MnCl}_2$  ... 6,3 g

1370 mM de  $\text{NaCl}$  ...80 g

En el momento del ensayo, tomar 5 mL de la solución A y 5 mL de la solución B, en 40 mL de agua, para obtener PBS 1X con iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$  a 5 mM. No refrigerar. Adaptado de <http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/5075.html>.

#### Anexo V. Biotinilación de proteínas

Inicialmente, se mezclaron 0.5 mg de sulfo-N-hidroxisuccinimida éster de biotina (sulfo-NHS-LC-biotina) con 0.5 mg de lectina en PBS 1X (p/p). La mezcla se dejó interactuar toda la noche a temperatura ambiente. Luego, se realizaron tres lavados para eliminar la sulfo-NHS-LC-biotina en exceso, por ultrafiltración con centrifugación, usando dispositivos con *MW cut off* de 10 kDa (*Centricon*®). Todo el procedimiento anterior se realizó dos veces durante dos días seguidos, para aumentar la eficiencia de marcación dada la hidrólisis del éster de la biotina.



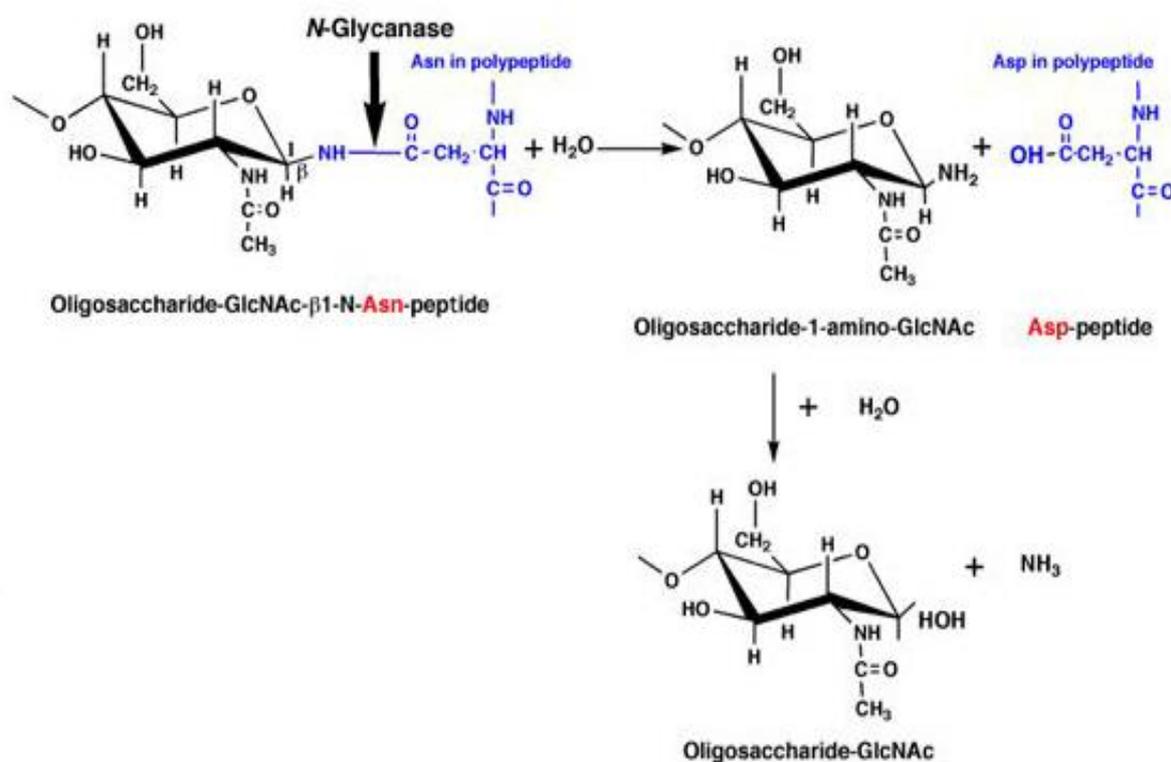
Reacción espontánea de sulfo-N-hidroxisuccinimida éster de biotina con aminas formando enlaces amida. (Hermanson G. T, 1996).

Para cada lectina biotinilada, sobre una membrana de nitrocelulosa, se sembraron en puntos separados 5  $\mu\text{L}$  de cada dilución. De igual manera, se sembró un blanco de BSA. Cada membrana se dejó en reposo durante 1h a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de la membrana, cada uno de 5 min, usando PBS-Tween 0.1%. La incubación con estreptavidina peroxidasa 1:500 en PBS-BSA 1%, se dejó durante 1h en agitación suave a temperatura ambiente. Después de cinco lavados, se realizó el revelado usando una solución de 0.5 mg/mL de DAB en

PBS y, 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% (frío). La reacción se detuvo con agua desionizada una vez aparecieron los puntos de color café sobre la membrana, y ésta se dejó secar sobre papel absorbente. El conjugado estreptavidina peroxidasa fue preparado por acoplamiento de la estreptavidina (1 mg) a la peroxidasa (5 mg), siguiendo la metodología descrita por Hermanson *et al.*, 1996.

### Anexo VI. Análisis de glicofomas realizados por la *Universität für Bodenkultur Wien (BOKU)*

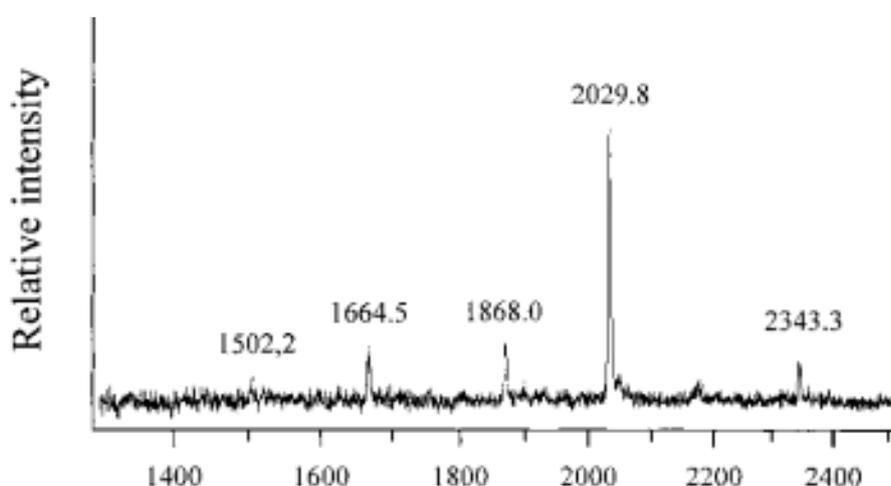
El análisis de las glicofomas se realizó en el Laboratorio de Glicobiología Molecular de la Universidad BOKU (Viena, Austria) siguiendo una metodología que fue desarrollada en dicho laboratorio (Kolarich & Altmann 2000). El método permite el análisis de glicoproteínas separadas por SDS-PAGE, en el cual bandas electroforéticas correspondientes a 4  $\mu\text{g}$  de glicoproteína son suficientes para permitir la detección de las principales especies de los glicanos. Se comienza con el procedimiento establecido para el mapeo de péptidos por espectrometría de masas. Dichos péptidos obtenidos por tripsinización son subsecuentemente deglicosilados con N-glicosidasa (Figura 1S). Los oligosacáridos se limpian pasándolos por una columna trifásica (*Dowex 50W x 8 + LiChroprep RP-18 (40–63  $\mu\text{m}$ ) + AG3*) y se analizan por MALDI-MS usando una mezcla de las matrices ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), 1-hidroxiisoquinolina (HIC) y arabinosazona (ARA). Este método ha sido utilizado con varias glicoproteínas vegetales, así como de invertebrados y vertebrados (Kolarich & Altmann 2000; Iskratsch *et al.*, 2009).



**Figura VI-1. Mecanismo de reacción de la N-glicosidasa (PNGasa).** La PNGasa hidroliza el enlace amida de la β-aspartilglicosilamina y produce glicosilamina, la cual es luego hidrolizada no enzimáticamente (<http://jcggdb.jp/GlycoPOD/protocolShow>).

En las muestras de transferrina nativa (NeuANeuA) se observa la dominancia de la estructura biantenaria sialilada (m/z 2245). Usando glicosidasas y glicosiltransferasas como se describe en la metodología del Capítulo 2 del presente trabajo, se han obtenido porcentajes de conversión entre el 50-100% de las diferentes glicofomas de transferrina (Tabla VI-1). En las muestras de fetuina nativa (F5) se observa dominancia de estructuras triantenarias por MALDI-TOF MS de los N-glicanos liberados (especies di- y trisialiladas de m/z 2222, 2588 y 2878). En la muestra de asialofetuina (F4) se comprobó la presencia de un asialoglicano triantenario mayoritario (m/z 2029) (Figura 2S). En la asialoagalactofetuina (F2) se encontraron estructuras asialoalacto bi- y triantenarias (m/z 1339 y 1542). En la Tabla 1-2S se presentan datos de MALDI-MS para N-glicofomas presentes en transferrina o fetuina.

Glicofoma	m/z	Conversión	% Conversión
NeuANeuA	2245	-	-
GalGal	1664	NeuANeuA a GalGal	80%
$\alpha$ Gal $\alpha$ Gal	1987	GalGal a $\alpha$ Gal $\alpha$ Gal	100%
GnGn	1339	GalGal a GnGn	100%
$\beta$ GN $\beta$ GN	1745	GnGn a $\beta$ GN $\beta$ GN	100%
GnGnF3	1493	GnGn a GnGnF3	50%
MM	934	GnGn a MM	100%



**Figura VI-2. Glicanos de asialofetuina bovina.** Las proporciones de las intensidades de los picos en el análisis de carbohidratos reflejan la abundancia de los diversos glicanos. Datos de la Universidad BOKU.

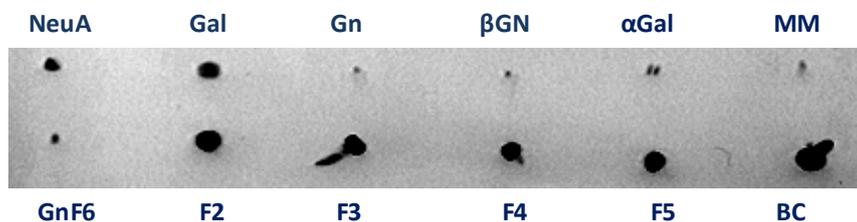
**Tabla VI-2. Interpretación de datos de MALDI-MS para N-glicofomas presentes en transferrina o fetuina**

Composición molar				Nombre abreviado de estructura de glicano	Promedio de masa calculado de $[M+Na]^+$ (Da)
Hex	HexNAc	Pen	dHex		
3	2	0	0	MM (Man3)	933.8
4	4	0	0	GalGn (GalGal sin un residuo de galactosa terminal)	1502.4
5	4	0	0	GalGal	1664.5
5	4	0	0	F4 triantenaria sin un residuo de galactosa terminal	1867.7
5	5	0	0	F4 triantenaria	2029.8
5	5	+ un ácido siálico		F5 triantenaria con un solo NeuAc terminal	2343.0

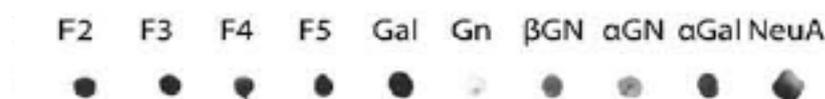
Abreviaciones de nombres de los glicanos están explicadas en el Capítulo 3. Datos de la Universidad BOKU.

## Anexo VII. Reconocimiento de glicofomas por lectina RCA-I

Lectina RCA-I (control interno, presente trabajo):

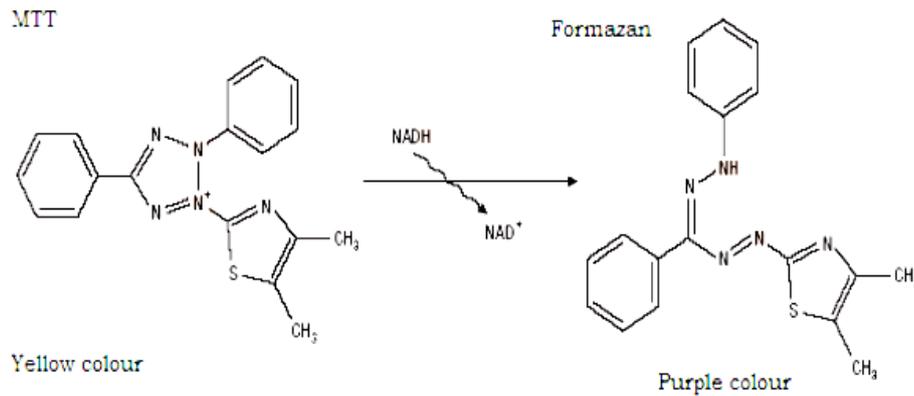


Lectina RCA-I (Iskratsch *et al.*, 2009):



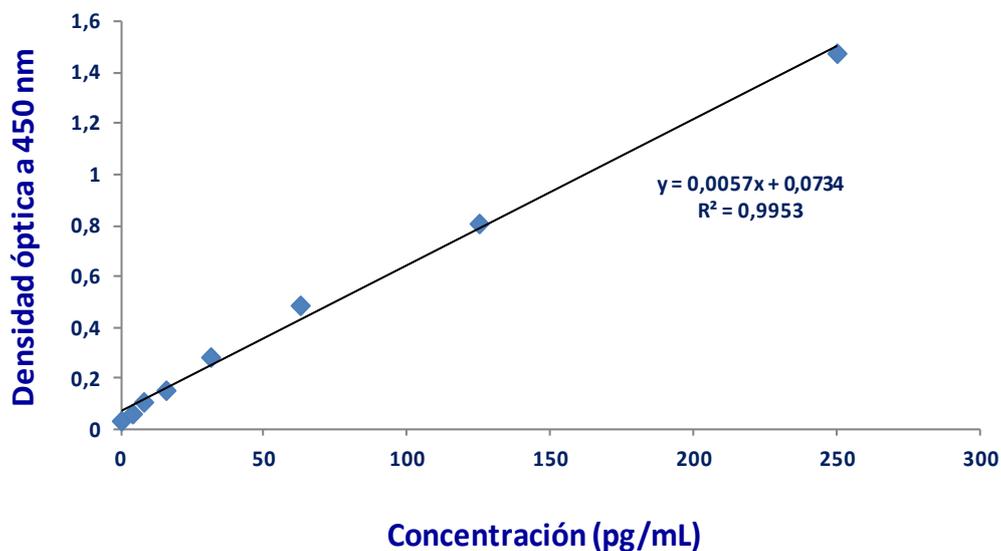
**Reconocimiento de glicofomas por lectina RCA-I por medio de ensayos *dotblot*.** Arriba: ensayo de control interno de reconocimiento por lectina RCA-I realizado en el presente trabajo en condiciones similares a las de Iskratsch *et al.* (2009). Abajo: reconocimiento de glicofomas por RCA-I realizado por Iskratsch *et al.* La descripción de las glicofomas es la detallada en la Fig. 3-5 del presente trabajo. Nota:  $\alpha$ GN es una glicofoma usada por Iskratsch *et al.*, pero no durante el presente trabajo. NeuA corresponde a transferrina nativa con glicanos biantenarios con residuos terminales de ácido acetilneuramínico en enlace  $\alpha$ 2,6 con galactosa (Sia $\alpha$ 2,6 en Fig. 3-7 presente trabajo).

### Anexo VIII. Principio del ensayo de viabilidad celular usando colorante MTT



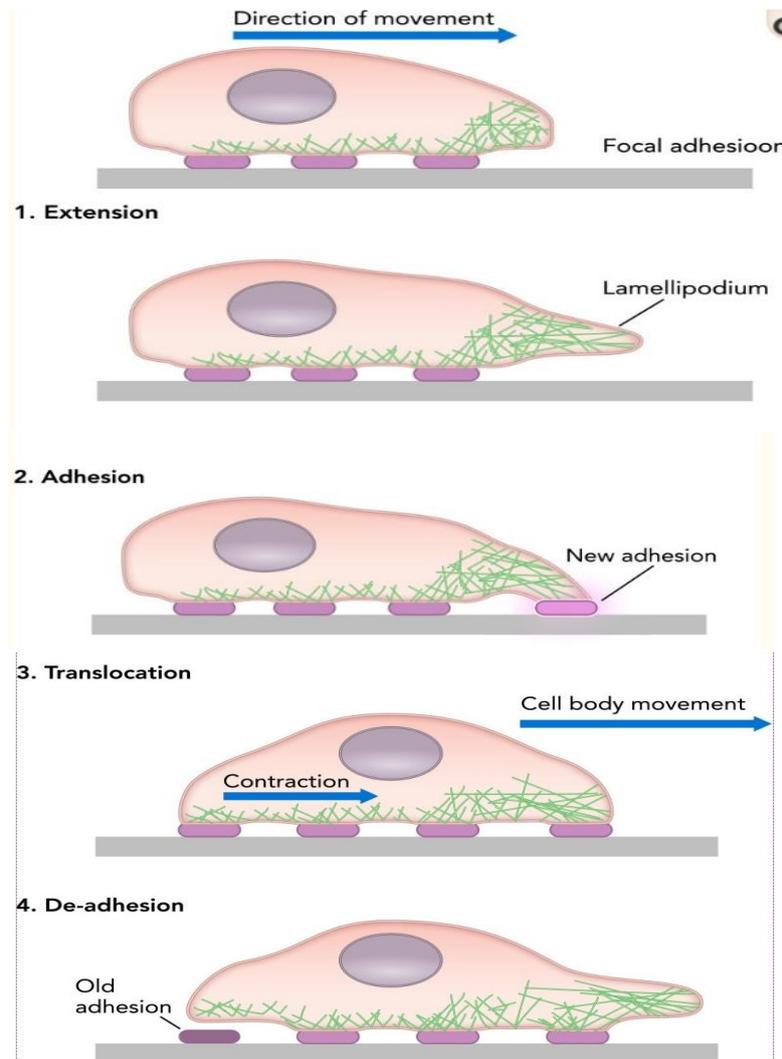
Las enzimas oxidoreductasas celulares dependientes de NAD(P)H presentes en la mitocondria pueden, bajo condiciones definidas, reflejar la cantidad de células viables presentes. Estas enzimas reducen el colorante amarillo MTT a formazan insoluble, púrpura. Recuperado de Mosmann, 1983.

### Anexo IX. Curva estándar de concentración de Factor de crecimiento epidérmico (EGF)



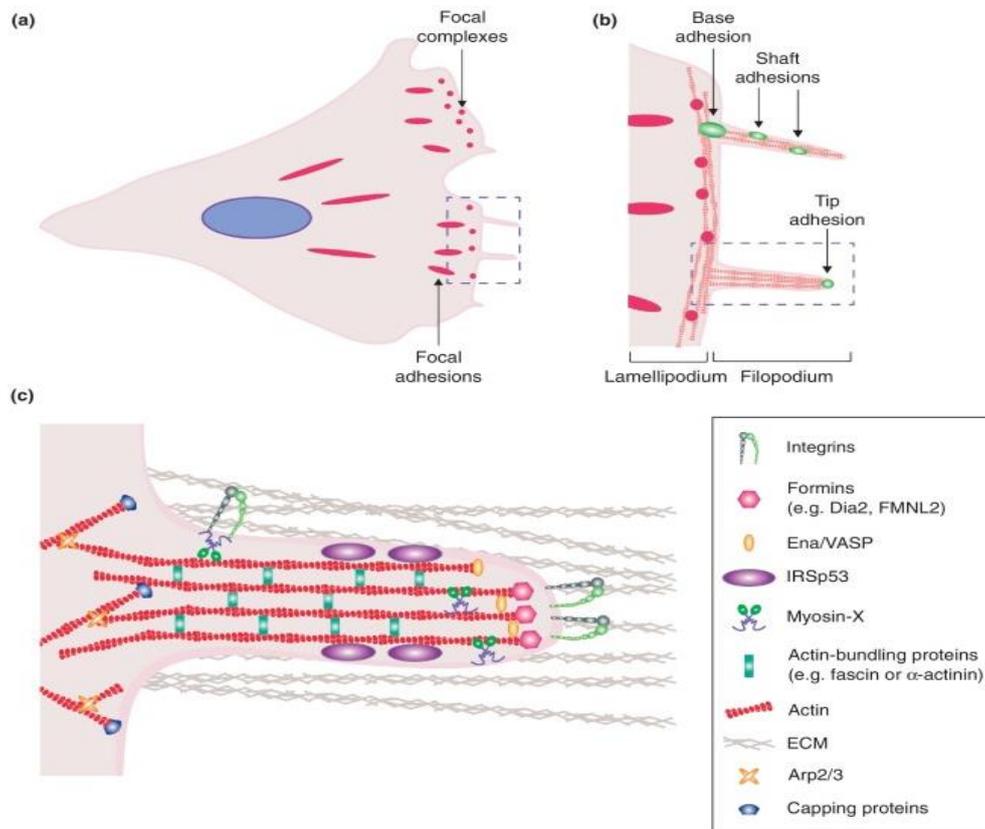
Para realizar la curva se usaron concentraciones seriadas entre 250 pg/mL y 3.9 pg/mL del EGF recombinante humano y el control de 0 pg/mL.

## Anexo X. Representación esquemática de los pasos de migración celular



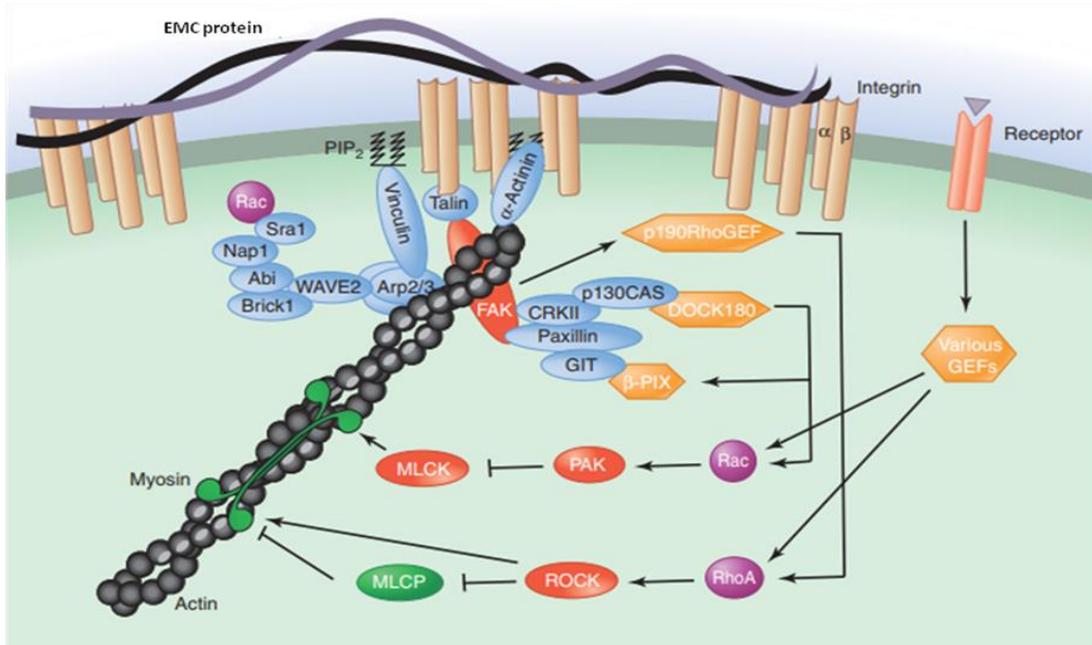
El proceso de migración celular requiere de la extensión de potrusiones celulares (lamelipodia y filopodia), la interacción de moléculas superficiales de esas potrusiones con ligandos en la MEC subyacente para crear adhesiones focales transitorias célula – MEC, la contracción celular mediada por actomiosina y la translocación del cuerpo celular hacia adelante con el desprendimiento concomitante de las adhesiones en el extremo posterior de la célula. Las integrinas contribuyen a la regulación de la migración celular mediante el reconocimiento de moléculas de la MEC que permiten las adhesiones célula – MEC, y la modulación de vías de señalización intracelular, que conducen a la reorganización del citoesqueleto y la migración celular (Peplow *et al.*, 2013). Imagen recuperada de Tschumperlin, 2013.

## Anexo XI. Formación de filopodios y lamelipodios



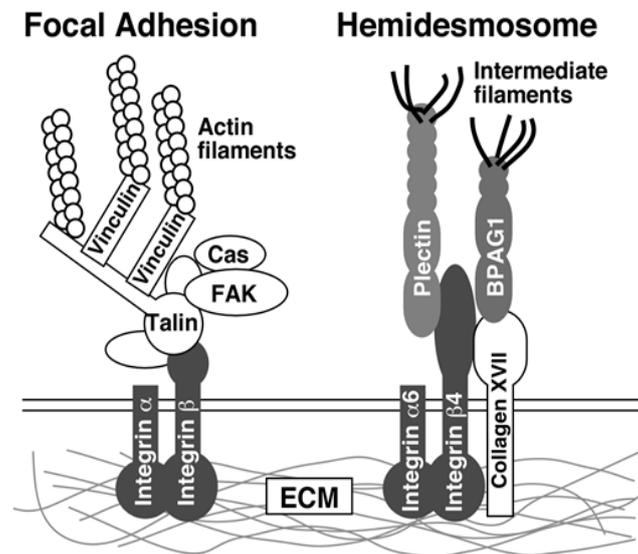
**Protuberancias en la membrana celular durante la migración celular.** (a) En el borde delantero de la célula se regula el remodelamiento y polimerización de la actina (mediados por Arp2/3) para impulsar las protrusiones de membrana (lamelipodia) y el movimiento celular hacia adelante. (b) La polimerización lineal de actina conduce a la formación de filopodios que exploran el entorno celular. (c) La formación de filopodios es facilitada por proteínas (eg. IRSp53) que tubulan la membrana plasmática, y por la actividad motora de la miosina que dirige la convergencia de fibras de actina en la periferia celular. Dentro del filopodio, fascina y  $\alpha$ -actinina entrecruzan los filamentos de actina, y forminas o Ena/VASP promueven la elongación de filamentos de actina. La miosina transporta proteínas hacia las puntas de los filopodia, incluyendo integrinas, que cumplen un papel en el mantenimiento de los filopodia y sensan el entorno. Recuperado de Jacquemet *et al*, 2015. Este proceso requiere de la GTPasa pequeña Rac1, del regulador de polaridad celular Par3 y el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3). Las fuerzas de tracción filopodiales se generan por una combinación del flujo retrógrado de actina y el agrupamiento helicoidal de filamentos de actina dentro del eje de filopodio (Jacquemet *et al*, 2015). En queratinocitos se ha observado que La fosforilación de la subunidad  $\beta 4$  promueve el desensamble de los hemidesmosomas y la traslocación de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  hacia los lamelipodios, donde ayuda a estabilizar estas estructuras (Wilhelmsen *et al*, 2006).

## Anexo XII. Formación de adhesiones entre célula y proteínas de la MEC



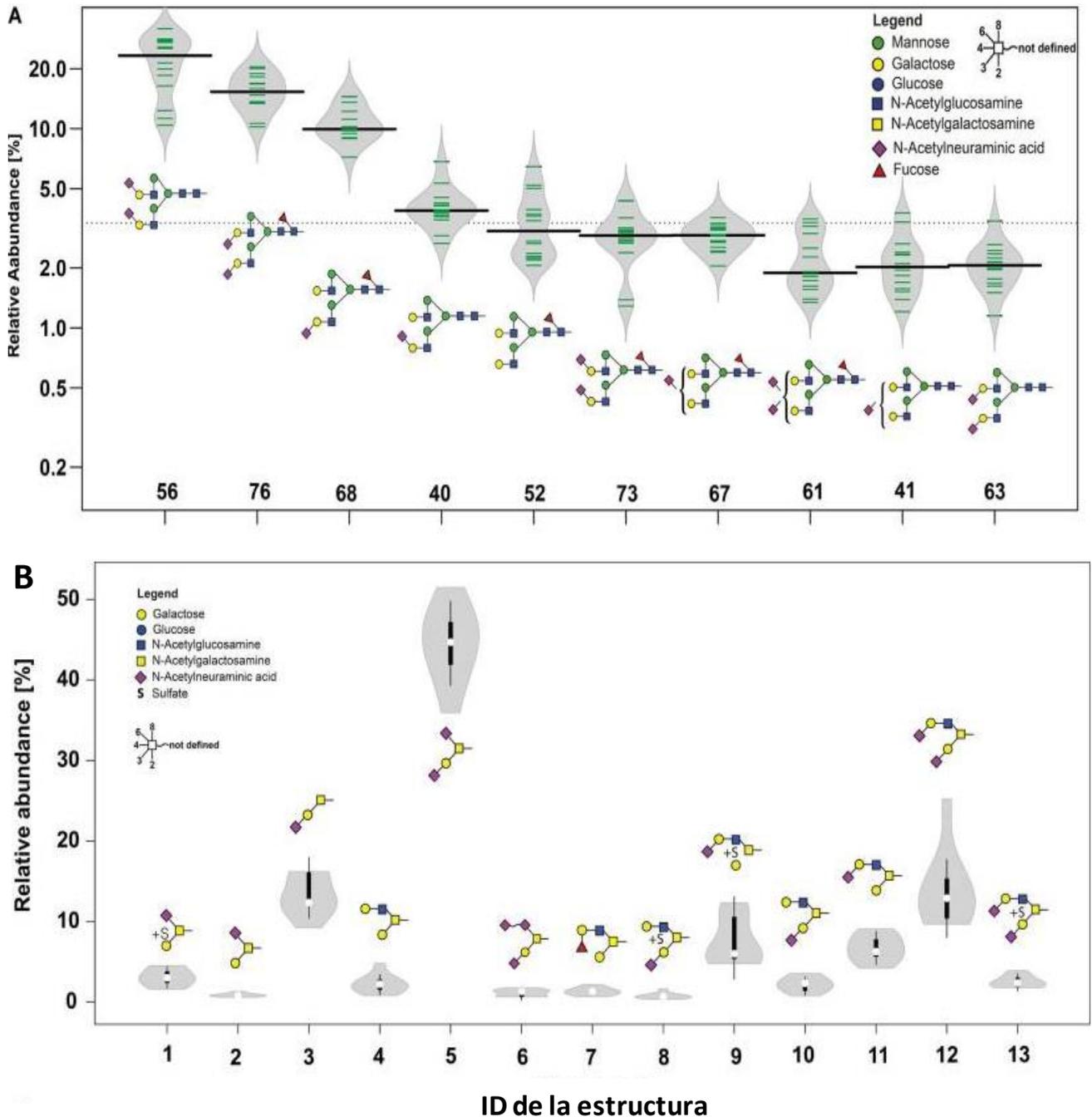
**Las adhesiones a través de integrinas conectan el sustrato con la actina y generan señales reguladoras de Rho GTPasas y migración celular.** La conexión estructural a la actina está mediada por talina, vinculina y  $\alpha$ -actinina. La señalización está mediada por complejos de adhesión. El módulo paxilina/quinasa de adhesiones focales FAK modula y se conecta con factores de intercambio de guanina (GEFs) que a su vez modulan las actividades Rac y Rho, las cuales a su vez regulan las actividades del complejo Arp2/3 y de la miosina II. Las fuerzas de contracción generadas por las proteínas motoras de miosina II se coordinan con la polimerización de la actina en el borde delantero durante la migración. En células epiteliales, la miosina II promueve el movimiento retrógrado de filamentos de actina alejándolos de la zona activa de polimerización de actina en el lamelipodio. Este flujo retrógrado puede reducir la tasa de protrusión neta. Las fuerzas tanto del flujo retrógrado como de la polimerización de la actina pueden "dirigirse" hacia el sustrato a través de las adhesiones basadas en integrinas unidas a los filamentos de actina, lo cual mejora la velocidad de protrusión, porque la fuerza total de la polimerización de la actina actúa en las adhesiones y la membrana en el borde delantero de la célula migrante. La actividad de la miosina II es modulada por fosforilación de su cadena ligera reguladora de la miosina (RLC), y su ensamblaje en filamentos se regula por fosforilación de su cadena pesada. Entre las quinazas que pueden fosforilar la RLC están la quinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y la proteína quinasa asociada a Rho (ROCK); la miosina fosfatasa hidroliza el fosfato. Recuperado de Devreotes & Horwitz, 2015.

### Anexo XIII. Estructuras de adhesiones focales y de hemidesmosomas.



Las adhesiones focales (FAs) conectan la MEC a los filamentos de actina. Las integrinas se unen a proteínas de la MEC via su dominio extracelular, y a proteínas intracelulares (talina, quinasa de adhesiones focales FAK, p130Cas y vinculina) para formar las FAs. La talina une las β-integrinas a los filamentos de actina. La fuerza de tracción en las FAs causa la exposición del sitio de unión a la vinculina de la talina por cambios conformacionales, lo que resulta en el aumento de la asociación de la vinculina-talina y la unión de los filamentos de actina -FAs. Los hemidesmosomas conectan la MEC a filamentos de queratina. La integrina α6β4 se une MEC via su dominio extracelular, y a la plectina via su dominio citoplasmico. En la epidermis, el colágeno XVII también se une a la MEC via su dominio extracelular, y a BPAG1 via su dominio citoplásmico. Plectina y BPAG1 unen a la integrina α6β4 y al colágeno XVII a los filamentos intermedios de queratina, respectivamente. Ambos complejos de adhesión pueden interactuar con moléculas de la MEC como laminina, colágeno IV, nidogen y perlecan. Recuperado de Ohashi *et al*, 2017.

## Anexo XIV. Glicofenotipo de la piel humana sana.



**Representación de los glicanos más abundantes en la piel humana** (N-glicanos arriba; O-glicanos abajo) a partir de biopsias de 14 pacientes sanos. ID: número de identificación del glicano. El cuadrado blanco en cada panel muestra la posición de los tipos de enlace en las estructuras. Recuperado de Möglinger *et al*, 2018.

Möglinger *et al* (2018) investigaron la glicosilación en biopsias de piel humana usando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y electroforesis en gel capilar con detección de fluorescencia inducida por láser, identificando 107 estructuras en el N-glicoma de la piel humana sana, el cual está dominado por N-glicanos biantenarios de tipo complejo (82%) que

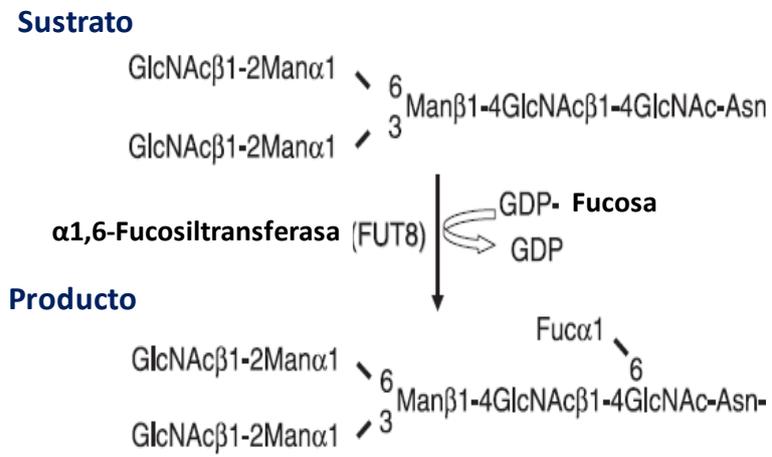
exhiben niveles similares de sialilación  $\alpha 2,3$  y  $\alpha 2,6$  (Panel A). Cuando esta presente, la fucosa en enlace  $\alpha 1,6$  está unida al núcleo de los N-glicanos. Los componentes menores del N-glicoma de la piel son de los tipos oligomanósido (5%), híbrido (3%), biseccionado (2,6%) y paucimanosido (1,4%). El O-glicoma es mucho menos diverso mostrando solo 13 estructuras diferentes a partir de los núcleos 1 o 2, los cuales pueden contener desde cero hasta tres residuos de ácido siálico, y una pequeña proporción posee fucosa unida en enlace  $\alpha 1,2$  (Panel B). Las estructuras ID5, ID3 e ID12 representan más del 60% de los O-glicanos de la piel humana sana. En carcinomas de piel se han observado cambios en la glicosilación, como por ejemplo, aumentos en la proporción de N-oligomanósidos y de O-glicanos del núcleo tipo 2 (Möginger *et al*, 2018).

Anexo XV. Algunas lectinas que interactúan con las diferentes capas de la epidermis *		
Capa de la epidermis	Lectina	Especificidad
Estratos córneo y lúcido	PHA-L	N-glicanos tri- o tetraantenarios con ramificaciones $\beta$ 1,6
	BS II	GlcNAc
	WGA	NeuA $\alpha$ 2,3Gal-R; HexNAc $\beta$ 1,4-R
	PWM	GlcNAc[( $\beta$ 1,4)GlcNAc]5; [Gal $\beta$ 1,4GlcNAc]2
	RCA	R'-Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R; Gal $\alpha$ / $\beta$
	SBA	( $\alpha$ , $\beta$ )GalNAc/Gal
	SNA	NeuA $\alpha$ 2,6Gal-R; NeuNA $\alpha$ 2,6GalNAc
	UEA I	$\alpha$ -Fuc; L-Fuca1,2Gal $\beta$ 1,4GlcNAc $\beta$ 1,6
Estratos espinoso y granuloso	Con A	Oligomanósidos; GN <sub>2</sub> Man <sub>3</sub> ; $\alpha$ -Man; $\alpha$ -Glc;
	RCA	R'-Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R; Gal $\alpha$ / $\beta$
	HPA	$\alpha$ -GalNAc -R/Ser/Thr
	SBA	( $\alpha$ , $\beta$ )GalNAc/Gal
	PNA	Gal $\beta$ 1,3GalNAc
	SNA	NeuA $\alpha$ 2,6Gal-R; NeuNA $\alpha$ 2,6GalNAc
Estrato basal	GNA	$\alpha$ -Man
	PHA-L	N-glicanos tri- o tetraantenarios con ramificaciones $\beta$ 1,6
	PWM	GlcNAc [( $\beta$ 1,4)GlcNAc]-5; [Gal $\beta$ 1,4GlcNAc]2
	RCA	R'-Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R; Gal $\alpha$ / $\beta$
	SNA	NeuA $\alpha$ 2,6Gal-R; NeuNA $\alpha$ 2,6GalNAc

\* BS II: lectina II de *Bandeiraea simplicifolia*; ConA: lectina tipo I de *Canavalia ensiformis*; GNA: lectina de *Galanthus nivalis*; HPA: lectina de *Helix pomata* (caracol); PHA-L: lectina de *Phaseolus vulgaris* (leucoaglutinina); PNA: lectina de *Arachis hypogaea* (maní); PWM: lectina de *Phytolacca americana* RCA: lectina I de *Ricinus communis*; SNA: lectina de *Sambucus nigra*; SBA: lectina de soya; UEA: lectina de *Ulex Europaeus*; WGA: lectina de germen de trigo. Man: manosa; Glc: glucosa; Gal: galactosa, GalNAc: N-acetilgalactosamina; GlcNAc: N-acetilglucosamina; Gal $\beta$ 1,4GlcNAc: N-acetilgalactosamina; NeuA: ácido siálico; GN<sub>2</sub>Man<sub>3</sub>: pentasacárido complejo biantenarico GlcNAc $\beta$ 1,2Man $\alpha$ 1,6(GlcNAc $\beta$ 1,2Man $\alpha$ 1,3)Man. Tabla a partir de datos de Méhul, 2003, y especificidades refinadas de algunas lectinas son las reportadas en Iskratsch *et al*, 2009 y Maupin *et al*, 2012.

Usando lectinas comerciales marcadas con fluoresceína se identificaron carbohidratos presentes en las capas de la epidermis humana. RCA-I y SNA, con especificidad por R'-Gal $\beta$ 1,4GlcNAc-R y NeuA $\alpha$ 2,6Gal-R, respectivamente, interactúan con todas las capas de la epidermis. En la epidermis humana la N,N-diacetilglucosamina (LacdiNAc; GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc) es uno de los glicotopes con mayor expresión, y N-glicanos oligomanósidos se encuentran en mayor proporción en la epidermis que en la dermis (Uematsu *et al*, 2009).

### Anexo XVI. Reacción de la $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa sobre N-glicanos.



Recuperado de Matsumoto *et al*, 2008.

## 8. Bibliografía

1. Adak, S., DeAndrade, D., Pike, L.J. (2011). The tethering arm of the EGF receptor is required for negative cooperativity and signal transduction. *J Biol Chem*; 286(2):1545-55. doi: 10.1074/jbc.M110.182899.
2. Agrawal, B.B.L., Goldstein, I.J. (1967). Protein carbohydrate interaction. VI. Isolation of Concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels, *Biochim Biophys Acta*; 147 262-71.
3. Ahmad, N., Gabius, H.J, Kaltner, H., André, S., Kuwabara, I., Liu, F.T., Oscarson, S., Norberg, T., Brewer, C.F. (2002). Thermodynamic binding studies of cell surface carbohydrate epitopes to galectins-1, -3, and -7: Evidence for differential binding specificities. *Can J Chem*, 80: 1096-104.
4. Ahmed, M. & Narain, R. (2015). Carbohydrate-based materials for targeted delivery of drugs and genes to the liver. *Nanomedicine* (Lond), 10(14): 2263-88. doi: 10.2217/nnm.15.58.
5. Ainouz, I.L., Sampaio, A.H., Freitas, A.L., Benevides, N.M., Mapurunga, S. (1995). Comparative study on hemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *B. triquetrum*. *Rev Bras Fisiol Veg*, 7:15-9.
6. Ainouz, I.L, Moreira, R.A., Campos, F.D.A.P., Richardson, M., Begbie, R., Stewart, J.C., Watt, W.B., Pusztai, A. (1987). The isolation and amino acid sequence of the  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora*. *Phytochem*, 26(5):1435-40.
7. Akahani, S, Nangia-Makker, P, Inohara, H, Kim, HR, Raz, A. (1997). Galectin-3: novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. *Cancer Res*, 57:5272-6.
8. Almanza, M., Vega, N., Pérez, G. (2004). Isolating and characterising a lectin from *Galactia lindenii* seeds that recognises blood group H determinants. *Arch Biochem Biophys*, 429:180-90.
9. Altmann, F., Staudacher, E., Wilson, I. B. H., Ma'rz, L. (1999). Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J*, 16:109-23.
10. Ambrosi, M., Cameron, N.R., Davis, B.G. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org Biomol Chem*, 3(9):1593-608.
11. Andrade-Lima, D. (1954). Contribution to the Study of the Flora of Pernambuco, Brazil. Monografia I. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
12. André, S., Kaltner, H., Manning, J.C., Murphy, P.V., Gabius, H.J. (2015). Lectins: Getting Familiar with Translators of the Sugar Code. *Molecules*, 20:1788-1823. doi:10.3390/molecules20021788.
13. Angata T. (2018). Possible Influences of Endogenous and Exogenous Ligands on the Evolution of Human Siglecs. *Front Immunol*; 9:2885. doi: 10.3389/fimmu.2018.02885. eCollection 2018.
14. Aoki, T. (2017). A Comprehensive Review of Our Current Understanding of Red Blood Cell (RBC) Glycoproteins. *Membranes*, 7, 56. doi:10.3390/membranes7040056.
15. Arcila-Barrera, S., Olea-Salgado, F., Umaña-Pérez, A. (2017). Optimización de marcación con CFSE para evaluación de proliferación de linfocitos sometidos a estrés nutricional. 52 Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Cali, Colombia, Octubre 2017.
16. Ashwell, G. & Morell, A.G. (1977). Membrane glycoproteins and recognition phenomena. *Trends Biochem Sci*, 2(4):76-8.
17. Balcão, V.M., & Vila, M.M.D.C. (2015). Structural and functional stabilization of protein entities: *state-of-the-art*. *Adv Drug Deliv Rev*, 93: 25-41.
18. Banerjee R., Das K., Ravishankar R., Suguna K., Surolia A., Vijayan M. (1996). Conformation, Protein-Carbohydrate Interactions and a Novel Subunit Association in the Refined Structure of Peanut Lectin-Lactose Complex. *J Mol Biol*, 259: 281-96.
19. Barboni, E.A., Bawumia, S., Henrick, K., Hughes, R.C. (2000). Molecular modeling and mutagenesis studies of the N-terminal domains of galectin-3: evidence for participation with the C-terminal carbohydrate recognition domain in oligosaccharide binding. *Glycobiol*, 10:1201-8.
20. Bardelli, A., & Jänne, P.A. (2012). Road to resistance: EGFR mutation and cetuximab. *Nat Med*; 18(2):199-200.
21. Barral-Netto M, Santos SB, Barral A, Moreira LI, Santos CF, Moreira RA, Oliveira JT, Cavada BS. (1992). Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunol Invest*, 21(4):297-303.
22. Basak, T., Vega-Montoto, L., Zimmerman, L.J., Tabb, D.L., Hudson, B.G., Vanacore, R.M. (2016). Comprehensive Characterization of Glycosylation and Hydroxylation of Basement Membrane Collagen IV by High-Resolution Mass Spectrometry. *J Proteome Res*; 15(1):245-58.
23. Batista, F.A., Goto, L.S., Garcia, W., de Moraes, D.I, de Oliveira Neto, M., Polikarpov, I., Cominetti, M.R., Selistre-de-Araújo, H.S., Beltramini, L.M., Araújo, A.P. (2010). Camptosemin, a tetrameric lectin of *Camptosema ellipticum*: structural and functional analysis. *Eur Biophys J*; 39:1193-1205.
24. Benard V. & Bokoch, G.M. (2002). Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Meth Enzymol*, 345: 349-59. doi:10.1016/s0076-6879(02)45028-8.
25. Benson, K.F., Newman, R.A., Jensen, G.S. (2015). Antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and skin regenerative properties of an Aloe vera-based extract of Nerium oleander leaves (nae-8®). *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 8: 239-48. doi: 10.2147/CCID.S79871.
26. Bhaskar Rao, A., Prasad, E., Deepthi, S.S., Haritha, V., Ramakrishna, S., Madhusudan, K., Surekha, M.V., Venkata Rao, Y.S. (2015). Wound healing: a new perspective on glycosylated tetrahydrocurcumin. *Drug Des Devel Ther*, 9: 3579-88. doi: 10.2147/DDDT.S85041.
27. Bielefeld, K.A., Amini-Nik, S., Alman, B.A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cell Mol Life Sci*, 70: 2059-81. doi: 10.1007/s00018-012-1152-9.

28. Billon-Grand, G., Rasclé, C., Droux, M., Rollins, J.A., Poussereau, N. (2012). pH modulation differs during sunflower cotyledon colonization by the two closely related necrotrophic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol Plant Pathol*, 13(6): 568–78.
29. Borkow, G. (2014). Using Copper to Improve the Well-Being of the Skin. *Curr Chem Biol*, 8(2):89-102.
30. Borsig L. (2018). Selectins in cancer immunity. *Glycobiol*; 28(9):648-55. doi:10.1093/glycob/cwx105.
31. Boyd, W.C. & Shapleigh, E. (1954). Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). *Science*, 119(3091): 419.
32. Briquez, P.S., Hubbell, J.A., Martino, M.M. (2015). Extracellular Matrix-Inspired Growth Factor Delivery Systems for Skin Wound Healing. *Adv Wound Care* (New Rochelle), 4(8): 479-89.
33. Brustein, V.P., Souza-Araújo, F.V., Vaz, A.F., Araújo, R.V., Paiva, P.M., Coelho, L.C., Carneiro-Leão, A.M., Teixeira, J.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., Correia, M.T. (2012). A novel antimicrobial lectin from *Eugenia malaccensis* that stimulates cutaneous healing in mice model. *Inflammopharmacol*, 20(6): 315-22.
34. Bueno, M.L., Contreras-Vega, Mario., Pérez G. (1994). Estimulación in vitro de linfocitos utilizando dos nuevas lectinas aisladas de *Dioclea Lehmanni* y *Erythrina costaricensis*. *Rev Acad Colomb Cienc*, 19(73): 337-41.
35. Calisto, F.C., Calisto, S.L., Souza, A.P., França, C.M., Ferreira, A.P., Moreira, M.B. (2015). Use of low-power laser to assist the healing of traumatic wounds in rats. *Acta Cir Bras*, 30(3): 204-8. doi: 10.1590/S0102-865020150030000007.
36. Cândido Ede, S., Pinto, M.F., Pelegrini, P.B., Lima, T.B., Silva, O.N., Pogue R., Grossi-de-Sá, M.F., Franco, O.L. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J*, 25: 3290-3305.
37. Cao, Z., Said, N., Amin, S., Wu, H.K., Bruce, A., Garate, M., Hsu, D.K., Kuwabara, I., Liu, F.T., Panjwani, N. (2002). Galectins-3 and -7, but not Galectin-1, play a role in re epithelialization of wounds. *J Biol Chem*, 277: 42299-305. doi:10.1074/jbc.M20098 1200.
38. Carafoli, F., Clout, N.J., Hohenester, E. (2009). Crystal structure of the LG1-3 region of the laminin alpha2 chain. *J Biol Chem*; 284(34):22786-92.
39. Carreño, N., Quintero, M., Reyes, E., Reyes, E.A., Vega, N. (2016). Aminosequence for H-type II specific lectin from *Galactia lindenii* seeds and production of recombinant lectin in a bacterial system. Poster 153: *International Carbohydrate Symposium*, ICS XXVIII. 17-23 Julio, New Orleans, USA.
40. Carrington, D.M., Auffret, A., Hanke, D.E. (1985). Polypeptide ligation occurs during post- translational modification of concanavalin A. *Nature*. 313, 64-7.
41. Carvalho, E.V.M.M., Oliveira, W.F., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S. (2018). Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. *Life Sciences*, 207, 152-7.
42. Castilho, R.M., Squarize, C.H., Gutkind, J.S. (2013). Exploiting PI3K/mTOR signaling to accelerate epithelial wound healing. *Oral Dis*; 19, 551-8.
43. Castro-Sanchez, L., Soto-Guzman, A., Navarro-Tito, N., Martinez-Orozco, R., Salazar, E.P. (2010). Native type IV collagen induces cell migration through a CD9 and DDR1-dependent pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Eur J Cell Biol*; 89(11):843-52.
44. Cavada, B.S., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Cordeiro, E.F., Oliveira, J.T.A., Moreira, R.A. (1996a). Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. *R Bras Fisiol Veg*; 8, 31-6.
45. Cavada, B.S., Ramos, M.V., Cordeiro, E.F., Grangeiro, T.B., Oliveira, J.T.A.: Urano de Carvalho. A.F.F., Moreira, R.A. (1996b). Purification and partial characterization of a lectin from *Dioclea virgata* Benth seeds. *R Bras Fisiol Veg*; 8, 37-42
46. Cavada B.S, Marinho E.S., Souza E.P., Benevides R.G., Delatorre P., Souza L.A., Nascimento, K.S., Sampaio, A.H., Moreno, F.B., Rustiguel, J.K., Canduri, F., de Azevedo, W.F. Jr., Debray, H. (2006). Purification, partial characterization and preliminary X-ray diffraction analysis of a mannose - specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 62(Pt 3): 235-7.
47. Cavada, B.S., Silva, M.T.L., Osterne, V.J.S., Pinto-Junior, V.R., Nascimento, A.P.M., Wolin, I.A.V., Heinrich, I.A., Nobre, C.A.S., Moreira, C.G., Lossio, C.F., Rocha, C.R.C., Martins, J.L., Nascimento, K.S., Leal, R.B. (2018). *Canavalia bonariensis* lectin: Molecular bases of glycoconjugates interaction and anti glioma potential. *Int J Biol Macromol*, 106:369-378.
48. Cavalcante, T.T., Anderson Matias da Rocha, B., Alves Carneiro, V., Vassiliepe Sousa Arruda, F., Fernandes do Nascimento, A.S., Cardoso Sá, N., do Nascimento, K.S., Sousa Cavada, B., Holanda Teixeira, E. (2011). Effect of Lectins from *Diocleinae* Subtribe against Oral *Streptococci*. *Molecules*, 16: 3530-43. doi:10.3390/molecules16053530.
49. Chahud, F., Ramalho, L.N., Ramalho, F.S., Haddad, A., Roque-Barreira, M.C. (2009). The lectin KM+ induces corneal epithelial wound healing in rabbits. *Int J Exp Pathol*, 90(2): 166-73. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00626.x.
50. Chamma, R., Veiga, S.S., Travassos, L.R., Brentani, RR. (1993). Functionally distinct roles for glycosylation of alpha and beta integrin chains in cell-matrix interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90(5):1795-9.
51. Chandra, N.R., Prabu, M.M., Suguna, K., Vijayan, M.M. (2001). Structural similarity and functional diversity in proteins containing legume lectin fold. *Protein Eng* 14(11): 857-66.
52. Chandrasekaran, S., Tanzer, M.L., Giniger, M.S. (1994). Oligomannosides initiate cell spreading of laminin-adherent murine melanoma cells. *J Biol Chem*; 269(5):3356-66.
53. Christlet, T.H.T. & Veluraja, K. (2001). Database analysis of O-glycosylation sites in proteins. *Biophys J*; 80(2):952-60.

54. Chung, H., Suh, E.K., Han, I.O., Oh, E.S. (2011). Keratinocyte-derived Laminin-332 Promotes Adhesion and Migration in Melanocytes and Melanoma: *J Biol Chem*; 286(15):13438–47.
55. Collins, P.M., Bum-Erdene, K., Yu, X., Blanchard, H. (2014). Galectin-3 Interactions with Glycosphingolipids. *J Mol Biol*, 426(7):1439-51.
56. Colombo, I., Sangiovanni, E., Maggio, R., Mattozzi, C., Zava, S., Corbett, Y., Fumagalli, M. *et al.* (2017). HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm*; 2017:7435621. doi: 10.1155/2017/7435621.
57. Cooper, D., Iqbal, A.J., Gittens, B.R., Cervone, C., Perretti, M. (2012). The effect of galectins on leukocyte trafficking in inflammation: sweet or sour? *Ann NY Acad Sci*, 1253:181–92. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06291.x
58. Coriolano, M.C., Saturnino, A.C.R.D., Cintra, E.A., Beltrão, E.I.C., Coelho, L.C.B.B. (2010). Purification in milligram quantities and Partial Characterization of *Parkia pendula* Seed Lectin. *J Biotech*, 150: 454, Supplement S454 [P-M.76]. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.664.
59. Coriolano, M.C., de Melo, C.M., Silva Fde, O., Schirato, G.V., Porto, C.S., dos Santos, P.J., Correia, M.T., Porto, A.L., Carneiro-Leão, A.M., Coelho, L.C. (2014). *Parkia pendula* seed lectin: potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. *Appl Biochem Biotechnol*, 172(5): 2682-93.
60. Correia, M.T. & Coelho, L.C. (1995). Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl Biochem Biotechnol*, 55(3):261-73.
61. Correia, J.L., do Nascimento, A.S., Cajazeiras, J.B., Gondim, A.C., Pereira, R.I., de Sousa, B.L., da Silva, A.L., Garcia, W., Teixeira, E.H., do Nascimento, K.S., da Rocha, B.A., Nagano, C.S., Sampaio, A.H., Cavada, B.S. (2011). Molecular Characterization and Tandem Mass Spectrometry of the Lectin Extracted from the Seeds of *Dioclea sclerocarpa* Ducke. *Molecules*, 16: 9077–89. doi:10.3390/molecules16119077.
62. Cortázar, T.M., Wilson, I.B.H., Hykollari, A., Reyes, E.A, Vega, N.A. (2018). Differential recognition of natural and remodeled glycotopes by three Diocleae lectins. *Glycoconj J*, 35: 205-16.
63. Cromer, R., Spohr, U., Khare, D.P., LePendu, J., Raymond U, Lemieux, R.U. (1992). Molecular recognition XII. The binding of the H human blood group determinants and congeners by a lectin of *Galactia tenuiflora*. *Canadian J Chem*, 1992, 70(5): 1511-30.
64. Cui, B., Li, L., Zeng, Q., Lin, F., Yin, L., Liao, L., Huang, M., Wang, J. (2017). A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. *J. Nat Med*, 71, 409-21, 10.1007/s11418-017-1073-x.
65. Cummings, R.D. & Pierce, J.M. (2014). The Challenge and Promise of Glycomics. *Chem Biol*, 21(1): 1-15.
66. Cummings, R.D., & Schnaar, R.L. (2017). R-Type Lectins. Capítulo 31 en: *Essentials of Glycobiology* [Internet]. 3ra edición. Varki A, Cummings RD, Esko JD, *et al.*, editors. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015-2017.
67. D'Arcy SM, Donoghue CM, Koeleman CA, Van den Eijnden DH, Savage AV. (1989). Determination of the structure of a novel acidic oligosaccharide with blood-group activity isolated from bovine submaxillary-gland mucin. *Biochem J*; 260(2):389-93.
68. Dam T.K., Oscarson, S., Brewer, C.F. (1998a). Thermodynamics of binding of the core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates and deoxy analogs to *Dioclea grandiflora* lectin. *J Biol Chem*, 273: 32812–17.
69. Dam T.K., Oscarson, S., Sacchettini, J.C., Brewer, C.F. (1998b). Differential solvation of “core” trimannoside complexes of the *Dioclea grandiflora* lectin and Concanavalin A detected by primary solvent isotope effects in isothermal titration microcalorimetry. *J Biol Chem*, 273: 32826–32.
70. Dam T.K., Cavada B.S, Grangeiro T.B, Santos C.F, de Sousa F.A, Oscarson S, Brewer C.F. (1998c). Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. *J Biol Chem* 273(20):12082-8.
71. Dam T.K., Roy, R., Das, S.K., Oscarson, S., Brewer, C.F. (2000). Binding of multivalent carbohydrates to Concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin. *J Biol Chem*, 275:14223–30.
72. Dam, T.K., Oscarson, S., Roy, R., Das, S.K., Pagé, D., Macaluso, F., Brewer, C.F. (2005). Thermodynamic, kinetic, and electron microscopy studies of concanavalin A and *Dioclea grandiflora* lectin cross-linked with synthetic divalent carbohydrates. *J Biol Chem*, 280(10): 8640 -6.
73. Dam T.K., Gabius H.J., Andre S., Kaltner H., Lensch M., Brewer CF. (2005b). Galectins bind to the multivalent glycoprotein asialofetuin with enhanced affinities and a gradient of decreasing binding constants, *Biochem*, 44:12564-71.
74. Dam, T.K. & Brewer, C.F. (2008). Effects of clustered epitopes in multivalent ligand–receptor interactions, *Biochem*, 47: 8470-6.
75. Dam, T.K. & Brewer, C.F. (2010). Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiol*; 20(3):270-9.
76. Dam, T.K., Cavada, B.S., Nagano, C.S., Rocha, B.A., Benevides, R.G., Nascimento, K.S., de Sousa, L.A., Oscarson, S., Brewer, C.F. (2011). Fine specificities of two lectins from *Cymbosema roseum* seeds: a lectin specific for high-mannose oligosaccharides and a lectin specific for blood group H type II trisaccharide. *Glycobiol*; 21 (7): 925-33.
77. Defaus S, Gupta P, Andreu D, Gutiérrez-Gallego R. (2014). Mammalian protein glycosylation - structure versus function. *Analyst*, 139(12): 2944-67.
78. De Melo, C.M, Porto, C.S., Melo-Júnior, M.R., Mendes C.M., Cavalcanti, C.C., Coelho, L.C., Porto A.L., Leão, A.M., Correia, M.T. (2011). Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. *Internal J Pharmaceutics*, 408:113-9.

79. De Oliveira J.T., De Matos, A.J., Santos, A.L., Pinto, R., Gomes, J., Hespanhol, V., *et al.* (2011). Sialylation regulates galectin-3/ligand interplay during mammary tumour progression—a case of targeted uncloaking. *Int J Dev Biol.*; 55:823–34.
80. De Schutter, K., Van Damme, E.J. (2015). Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. *Molecules*, 20: 9029-53; doi: 10.3390/molecules20059029.
81. De Souza G.A., Oliveira P.S., Trapani S., Santos A.C., Rosa J.C., Laure H.J., Faça, V.M., Correia, M.T., Tavares, G.A., Oliva, G., Coelho, L.C., Greene, L.J. (2003). Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiol*, 13:961-72.
82. De Vasconcelos, M.A., Cunha, C.O., Arruda, F.V., Carneiro, V.A., Bastos, R.M., Mercante, F.M., do Nascimento, K.S., Cavada, B.S., dos Santos, R.P., Teixeira, E.H. (2013). Effect of Leguminous Lectins on the Growth of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecules*, 18: 5792-803. doi:10.3390/molecules18055792.
83. De Vries AL, Komatsu S, Feeney RE. (1970). Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *J Biol Chem*, 245:2901–8
84. Del Val Alonso, M. (2014). Estudio de los sueros ricos en factores de crecimiento y de su efecto sobre células de epitelio corneal. Trabajo de Grado en Biotecnología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco.
85. Debels, H., Hamdi, M., Abberton, K., Morrison, W. (2015). Dermal matrices and bioengineered skin substitutes: a critical review of current options. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 3(1): e284. doi: 10.1097/GOX.0000000000000219.
86. Defaus S, Gupta P, Andreu D, Gutiérrez-Gallego R. (2014). Mammalian protein glycosylation--structure versus function. *Analyst*; 139(12):2944-67.
87. Devreotes, P., & Horwitz, A.R. (2015). Signaling Networks that Regulate Cell Migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 7:a005959.
88. Di Lella, S., Sundblad, V., Cerlani, J.P., Guardia, C.M., Estrin, D.A., Vasta, G.R., Rabinovich G.A. (2011). When Galectins Recognize Glycans: From Biochemistry to Physiology and Back Again. *Biochem*, 50(37): 7842–57. doi: 10.1021/bi201121m.
89. Ditamo, Y., Rupil, LL., Sendra, V.G., Nores, G.A., Roth, G.A., Irazoqui, F.J. (2016). In vivo immunomodulatory effect of the lectin from edible mushroom *Agaricus bisporus*. *Food Funct*, 7(1): 262-9. doi: 10.1039/c5fo00360a.
90. Do Nascimento-Neto L.G., Carneiro, R.F., da Silva, S.R, da Silva, B.R., Vassiliepe Sousa Arruda, F., Carneiro, V.A., do Nascimento, K.S., Saker-Sampaio, S., da Silva, V.A. Jr., Porto, A.L., Cavada, B.S., Sampaio, A.H., Teixeira, E.H., Nagano, C.S. (2012). Characterization of Isoforms of the Lectin Isolated from the Red Algae *Bryothamnion seaforthii* and Its Pro-Healing Effect. *Mar Drugs*, 10: 1936-54.
91. Do Nascimento, A.S., Gondim, A.C., Cajazeiras, J.B., Correia, J.L., Pires Ade, F., do Nascimento, K.S., da Silva, A.L., Nagano, C.S., Assreuy, A.M., Cavada, B.S. (2012). Purification and partial characterization of a novel lectin from *Dioclea lasiocarpa* Mart seeds with vasodilator effects. *J Mol Recognit*; 25, 657-64.
92. Draganescu, D., Ibanescu, C., Tamba, B.I., Andritoiu, C.V., Dodi, G., Popa, M.I. (2015). Flaxseed lignan wound healing formulation: characterization and in vivo therapeutic evaluation. *Int J Biol Macromol*, 72: 614-23. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.09.012.
93. Duk M, Lisowska E, Kordowicz M, Wasniowska K. (1982). Studies on the specificity of the binding site of *Vicia graminea* anti-N lectin. *Eur J Biochem* 123:105–12.
94. Eckert, R.L., Efimova, T., Dashti, S.R., Balasubramanian, S., Deucher, A., Crish, J.F., Sturniolo, M., Bone, F. (2002). Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to mitogen activated protein kinase. *J Investig Dermatol Symp Proc*; 7 (1):36-40.
95. EMBL, European Molecular Biology Laboratory; [www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/protein\\_purification/extraction\\_clarification/lysis\\_buffer\\_additives/](http://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_purification/extraction_clarification/lysis_buffer_additives/).
96. Fan, L., Tong, J., Tang, C., Wu, H., Peng, M., Yi, J. (2016). Preparation and characterization of carboxymethylated carrageenan modified with collagen peptides. *Int J Biol Macromol*, 82: 790-7. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.10.063.
97. Fernández-Alonso, J.L., Vega, N.A., P.J.L., Vega, N.A., Pérez, G. (2003). Lectin prospecting in Colombian Labiatae. A systematic-ecological approach. *Caldasia*, 31(6):617-33.
98. Fernández-Alonso, J.L., Vega, N.A., Pérez, G. (2009). Lectin prospecting in Colombian labiatae. A systematic-ecological approach - III. Mainly exotic species (cultivated or naturalised). *Caldasia*, 31(2): 227-45.
99. Ferreira, I.G., Pucci, M., Venturi, G., Malagolini, N., Chiricolo, M., Dall'Olio, F. (2018). Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling. *Int J Mol Sci*; 19(2). pii: E580. doi: 10.3390/ijms19020580.
100. Ferroni, L., Bellini, G., Emer, V., Rizzuto, R., Isola, M., Gardin, C., Zavan, B. (2015). Treatment by Therapeutic Magnetic Resonance (TMR™) increases fibroblastic activity and keratinocyte differentiation in an in vitro model of 3D artificial skin. *J Tissue Eng Regen Med*. doi: 10.1002/term.2031.
101. Freire-de-Lima, L., Gelfenbeyn, K., Ding, Y., Mandel, U., Clausen, H., Handa, K., Hakomori, S. (2011). Involvement of O-glycosylation defining oncofetal fibronectin in epithelial-mesenchymal transition process. *PNAS*; 108(43): 17690–5.
102. Friedrichs, J., Manninen, A., Muller, D.J. (2008). Galectin-3 regulates integrin alpha2beta1-mediated adhesion to collagen-I and -IV. *J Biol Chem*, 283: 32264-72.

103. Fukuda, N., Yoshimaru, A., Hidaka, T., Ohta, H., Yamamoto, K., Yomo, H. (1994). Isolation and Characterization of *N*-Acetylgalactosamine-specific Lectin from *Galactia tashiroi* Seeds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 58 (2): 423-24.
104. Futosi, K., Fodor, S., Mócsai, A. (2013). Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*; 17(3): 638 – 650. doi: 10.1016/j.intimp.2013.06.034.
105. Gabius H.J., André, S., Jiménez-Barbero, J., Romero, A., Solís, D. (2011a). From lectin structure to functional glycomics: Principles of the sugar code. *Trends Biochem Sci*, 36: 298 – 313.
106. Gabius, H.J. (2011b). The how and why of Ca<sup>2+</sup> involvement in lectin activity. *Trends Glycosci Glycotechnol*, 23: 168-77. doi: 10.4052/tigg.23.168.
107. Gabius, H.J., Kaltner, H., Kopitz, J., André, S. (2015). The glycobiology of the CD system: a dictionary for translating marker designations into glycan/lectin structure and function. *Trends Biochem Sci*; 40(7):360-76.
108. Ganiko, L., Martins, A., Freymüller, E., Mortara, R, Roque-Barreira, M. (2005). Lectin KM+ induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. *Biochim Biophys Acta*, 1721(1):152-63.
109. García-Maldonado E, Cano-Sánchez P, Hernández-Santoyo A. (2017). Molecular and functional characterization of a glycosylated Galactose-Binding lectin from *Mytilus californianus*. *Fish Shellfish Immunol*; 66:564-74.
110. GE Healthcare Handbook: Ion Exchange Chromatography, Principles and Methods. 2010.
111. GE Healthcare Handbook: Size Exclusion Chromatography, Principles and Methods. 2014.
112. Gel filtration Handbook. 8 th Edition. Amersham Pharmacia Biotech 18-1022-18.
113. Goldstein, I.J., Poretz R.D. (1986). Isolation, physicochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. En: Liener, I.E., Sharon, N., Goldstein, I.J. (eds). *The Lectins*, pp.52-57. Academic Press, Orlando, USA.
114. Geshi N, Johansen JN, Dilokpimol A, Rolland A, Belcram K, Verger S, Kotake T, *et al.* (2013). A galactosyltransferase acting on arabinogalactan protein glycans is essential for embryodevelopment in *Arabidopsis*. *Plant J*; 76(1):128-37.
115. Green, E.D., Adelt, G., Baenziger, J.U., Wilson, S., Van Halbeek, H. (1988). The asparagines linked oligosaccharides on bovine fetuin: structural analysis of N –glycanase released oligosaccharides by 500 megahertz 1H NMR spectroscopy. *J Biol Chem*; 263, 18253-68.
116. Grossmann, L.; Ebert, S.; Weiss, J.; Hinrichs, J. (2018) Effect of precipitation, lyophilization, and organic solvent extraction on preparation of protein-rich powders from the microalgae *Chlorella protothecoides*. *Algal Research*, 29:266-76
117. Guo S, DiPietro, L.A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res* 89(3): 219-29.
118. Guo, X., Huang, S., Sun, J., Wang, F. (2015). Comparison of the cytotoxicities and wound healing effects of hyaluronan, carbomer and alginate on skin cells in vitro. *Adv Skin Wound Care*, 28(9): 410-4.
119. Gupta, G.S., Gupta, A., Gupta, R.K. (2012). *Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications*. Springer, Heidelberg.
120. Gupta, D., Oscarson, S., Raju, T.S., Stanley, P., Toone, E.J., Brewer, C.F. (1996). A comparison of the fine saccharide-binding specificity of *Dioclea grandiflora* lectin and concanavalin A. *Eur J Biochem*, 242: 320–6.
121. Gurskaya, N.G., K.A. Lukyanov, *et al.*, 2016. Spontaneously Transformed Human Keratinocyte Cell Culture (HaCaT). In: *Visualizing RNA Dynamics in the Cell. Methods in Enzymology*, 2016.
122. Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y., Longaker, M.T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193): 314-21. doi:10.1038/nature07039.
123. Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Smith, P.K. *Immobilized Affinity Ligand Techniques*. Academic Press, 1992. 454p.
124. Hermanson, G.T. *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego. 1996; pgs: 375-8; 580-3.
125. Hidalgo Roa, D.J. (2017). *Detección, purificación y caracterización parcial de lectinas presentes en algas marinas colombianas*. Tesis de Maestría, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.
126. Hirabayashi J, Yamada M, Kuno A, Tateno H. (2013). Lectin microarrays: concept, principle and applications. *Chem Soc Rev*; 42(10):4443-58.
127. Hirabayashi, J., Tateno, H., Shikanai, T., Aoki-Kinoshita, K.F., Narimatsu, H. (2015). The Lectin Frontier Database (L<sub>F</sub>DB), and Data Generation Based on Frontal Affinity Chromatography. *Molecules*, 20: 951-73. doi:10.3390/molecules20010951.
128. Hirohashi, S., Clausen, H., Yamada, T., Shimosato, Y., Hakomori, S.I. (1985). Blood group A cross-reacting epitope defined by monoclonal antibodies NCC Lu-35 and 81 expressed in cancer of blood group O or B individuals. Its identification as Tn antigen. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 7039-43.
129. Holick, M.F., Chen, T.C., Lu, Z., Sauter, E. (2007). Vitamin D and skin physiology: a D-lightful story. *J Bone Miner Res*, 22 Suppl 2: V28-33. doi: 10.1359/jbmr.07s211.
130. Horváth D, Sipos A, Major E, Kónya Z, Bátor R, Dedinszki D, *et al.* (2018). Myosin phosphatase accelerates cutaneous wound healing by regulating migration and differentiation of epidermal keratinocytes via Akt signaling pathway in human and murine skin. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*; 864(10):3268-80.
131. Hsiao, C.T., Cheng, H.W., Huang, C.M., Li, H.R., Ou, M.H., Huang, J.R., Khoo, K.H., *et al.* (2017). Fibronectin in cell adhesion and migration via N-glycosylation. *Oncotarget*; 8(41): 70653–68.
132. Hsu, D.K., Yang, R.Y., Pan, Z., Yu, L., Salomon, D.R., Fung-Leung, W.P., Liu, F.T. (2000). Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. *Am J Pathol*, 156:1073 –83.
133. <http://croptechnology.unl.edu/pages/informationmodule.php?idinformationmodule=1130447094&topicorder=6&maxto=13&mint=1>.
134. Invitrogen manual KHG0061: ELISA Kit for Human EGF, Catalog # KHG0061. Internet: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/KHG0061\\_revA5.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/KHG0061_revA5.pdf)

135. Isaji T, Sato Y, Zhao Y, Miyoshi E, Wada Y, et al. (2006) N-glycosylation of the  $\beta$ -propeller domain of the integrin  $\alpha 5$  subunit is essential for  $\alpha 5\beta 1$  heterodimerization, expression on the cell surface, and its biological function. *J Biol Chem* 281: 33258–67.
136. Iskratsch, T., Braun, A., Paschinger, K., Wilson, I.B. (2009). Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins. *Anal Biochem*, 386(2):133–46. doi: 10.1016/j.ab.2008.12.005.
137. Isseroff, R.R., Martinez, D.T., Ziboh, V.A. (1985). Alterations in fatty acid composition of murine keratinocytes with in vitro cultivation. *J Invest Dermatol*, 85:131–4.
138. Jacquemet, G., Hamidi, H., Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr Opin Cell Biol*; 36:23-31.
139. Jiménez-Barbero, J., Asensio, J.L., Cuevas, G., Canales, A., Fernández-Alonso, M.C., Cañada, F.J. (2006). Conformational insights on the molecular recognition processes of carbohydrate molecules by proteins and enzymes: A 3D view by using NMR. *Biocatalysis and Biotransformation*, 24(1-2):13- 22. doi: 10.1080/10242420600598103.
140. Jaff, M.S. (2010). Higher frequency of secretor phenotype in O blood group – its benefits in prevention and/or treatment of some diseases. *Int J Nanomedicine*. 5: 901–5.
141. Jiménez, C.C., de la Torre, B.G., Andreu, D., Gutiérrez-Gallego, R. (2008). Neo-glycopeptides: the importance of sugar core conformation in oxime-linked glycoprobes for interaction studies. *Glycoconj J*, 25: 879–87.
142. Kamili N.A., Arthur, C.M., Gerner-Smidt, C., Tafesse, E., Blenda, A., Dias-Baruffi, M., Stowell, S.R. (2016). Key regulators of galectin-glycan interactions. *Proteomics*; 16(24):3111-25.
143. Kapucuoglu, N., Basak, P.Y., Bircan, S., Sert, S., Akkaya, V.B. (2009). Immunohistochemical galectin-3 expression in non-melanoma skin cancers. *Pathol Res Pract*, 205: 97–103.
144. Kariya Y, Kato R, Itoh S, Fukuda T, Shibukawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K et al. (2008). N-Glycosylation of laminin 332 regulates its biological functions. A novel function of the bisecting GlcNAc. *J Biol Chem*, 283(48):33036-45.
145. Kariya, Y., Kawamura, C., Tabei, T., Gu, J. (2010). Bisecting GlcNAc residues on laminin-332 down-regulate galectin-3-dependent keratinocyte motility. *J Biol Chem*, 285: 3330-40.
146. Kariya, Y & Gu, J. (2011). N-Glycosylation of  $\beta 4$  Integrin Controls the Adhesion and Motility of Keratinocytes. *PLoS ONE*, 6(11): e27084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027084>.
147. Klemm, D., Heublein, B., Fink, H.P., Bohn, A. (2005). Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angewandte Chemie - International Edition*; 44(22): 3358-93. doi-org.ezproxy.unal.edu.co/10.1002/anie.200460587
148. Koivisto, L., Alavian, K., Hakkinen, L., Pelech, S., McCulloch, C.A., Larjava, H. (2003). Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes. *J Cell Sci*, 116, 3749-60.
149. Koivisto, L., Hakkinen, L., Larjava, H. (2012). Re-epithelialization of wounds. *Endodontic Topics*, 24: 59-93. doi: 10.1111/etp.12007.
150. Kolarich, D. & Altmann, F. (2000). N-Glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole e1. *Anal Biochem*. 285, 64-75.
151. Krishnaswamy, V.R. & Korrapati, P.S. (2014). Role of Dermatopontin in re-epithelialization: Implications on keratinocyte migration and proliferation. *Scientific Reports*, 4: 7385. doi: 10.1038/srep07385.
152. Krzeminski, M., Singh, T., André, S., Lensch, M., Wu, A.M., Bonvin, A.M.J.J., Gabius, H.J. (2011). Human galectin-3 (Mac-2 antigen): Defining molecular switches of affinity to natural glycoproteins, structural and dynamic aspects of glycan binding by flexible ligand docking and putative regulatory sequences in the proximal promoter region. *Biochim Biophys Acta*, 1810: 150–61. doi:10.1016/j.bbagen.2010.11.001.
153. Kübler, D., Hung, C.W., Dam, T.K., Kopitz, J., André, S., Kaltner, H., Lohr, M., Manning, J.C., He, L., Wang, H., Middelberg, A., Brewer, C.F., Reed, J., Lehmann, W.D., Gabius, H.J. (2008). Phosphorylated human galectin-3: facile large-scale preparation of active lectin and detection of structural changes by CD spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1780:716-22.
154. Kuno, A., Uchiyama, N., Koseki-Kuno, S., Ebe, Y., Takashima, S., Yamada, M., Hirabayashi, J. (2005). Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. *Nat. Methods*, 2:851–6.
155. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-5.
156. Lajoie, P., Goetz, J.G., Dennis, J.W., Nabi, I.R. (2009). Lattices, rafts, and scaffolds: domain regulation of receptor signaling at the plasma membrane. *J Cell Biol*, 185(3): 381–85.
157. Lam, S.K. & Ng, T.B. (2011). Lectins: production and practical applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 89:45-55. doi: 10.1007/s00253-010-2892-9.
158. Larsen, L., Chen, H.Y., Saegusa, J., Liu, F.T. (2011). Galectin-3 and the skin. *J Dermatol Sci*; 64(2):85-91.
159. Lee, M. R. F., Tweed, J. K. S., and Sullivan, M. L. (2013). Oxidation of ortho-diphenols in red clover with and without polyphenol oxidase (PPO) activity and their role in PPO activation and inactivation. *Grass Forage Sci*. 68, 83–92.
160. Lee, Y. C. (1993). Biochemistry of carbohydrate-protein interaction, *FASEB J*, 6:3193-3200.
161. Lee, C.G., Oh, M.J., Park, S.Y., An, H.J., Kim, J.H. (2018). Inhibition of polyLacNAc biosynthesis with release of CMP-Neu5Ac feedback inhibition

- increases the sialylation of recombinant EPO produced in CHO cells. *Sci Rep*; 8(1):7273. doi: 10.1038/s41598-018-25580-9.
162. Lependu, J., Gerard, G., Lambert, F., Mollicone, R., Oriol, R. (1986). A new anti-H lectin from the seeds of *Galactia tenuiflora*. *Glycoconjugate J*, 3(2):203-16.
  163. Lillehoj, E.P., Hyun SW, Feng C, Zhang L, Liu A, Guang W, Nguyen C, *et al.* (2012). NEU1 sialidase expressed in human airway epithelia regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) and MUC1 protein signaling. *J Biol Chem*;287(11):8214-31.
  164. Lima, L.R., Bezerra, M.F., Almeida, S.M., Silva, L.P., Beltrão, E.I., Carvalho Júnior, L.B. (2013). Glycophenotype Evaluation in Cutaneous Tumors Using Lectins Labeled with Acridinium Ester. *Disease Markers*, 35 (3):149-54.
  165. Lin, P. & Ng, T.B. (2008). Preparation and Biological properties of a melibiose binding lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *J Agric. Food Chem*, 56:10481-6.
  166. Liu, F.T., Patterson, R.J., Wang, J.L. (2002). Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta*, 1572: 263-73.
  167. Liu, W., Hsu, D.K., Chen, H.Y., Yang, R.Y., Carraway, K.L., Isseroff, R.R., Liu, F.T. (2012). Galectin-3 regulates intracellular trafficking of epidermal growth factor receptor through Alix and promotes keratinocyte migration. *J Invest Dermatol*, 132(12): 2828-37. doi:10.1038/jid.2012.211.
  168. Loris, R., Hamelryck, T., Bouckaert, J., Wyns, L. (1998). Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta*, 1383, 9-36.
  169. Loris, R. (2002). Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochim Biophys Acta*, 1572: 198-208.
  170. Madariaga, D., Martínez-Sáez, N., Somovilla, V.J, Coelho, H., Valero-González, J., Castro-López, J., Asensio, J.L., Jiménez-Barbero, J., Busto, J.H., Avenzoza, A., Marcelo, F., Hurtado-Guerrero, R., Corzana, F., Peregrina, J.M. (2015). Detection of tumor-associated glycopeptides by lectins: the peptide context modulates carbohydrate recognition. *ACS Chem Biol*, 10(3):747-56. doi: 10.1021/cb500855x.
  171. Mackinnon, A.C., Gibbons, M.A., Farnworth, S.L., Leffler, H., Nilsson, U.J., Delaine, T., Simpson, A.J., Forbes, S.J. *et al.* (2012). Regulation of transforming growth factor- $\beta$ 1-driven lung fibrosis by galectin-3. *Am J Respir Crit Care Med*; 185(5):537-46.
  172. Manning, B.D., & Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*. 129(7): 1261–74.
  173. Maresca, B., Cigliano, L., Spagnuolo, M.S., Dal Piaz, F., Corsaro, M.M., Balato, N., Nino, M., Balato, A., Ayala, F., Abrescia, P. (2012) Differences between the Glycosylation Patterns of Haptoglobin Isolated from Skin Scales and Plasma of Psoriatic Patients. *PLoS ONE* 7(12): e52040. doi:10.1371/journal.pone.0052040.
  174. Matsui, T., Hamako, J., Ozeki, Y., Titani, K. (2001). Comparative study of blood group recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins, and complex-type oligosaccharides, *Biochim Biophys Acta*, 1525:50-7.
  175. Maupin, K.A., Liden, D., Haab, B.B. (2012). The fine specificity of mannose-binding and galactose-binding lectins revealed using outlier analysis of glycan array data. *Glycobiol*; 22(1):160-9.
  176. Méhul, B., Corre, C., Capon, C., Bernard, D., Schmidt, R. (2003). Carbohydrate expression and modification during keratinocyte differentiation in normal human and reconstructed epidermis. *Exp Dermatol*, 12(5):537-45.
  177. Melgarejo, L.M., Pérez, G. (1997). Immunolocalization of the Lectins P2 and P4 from *Dioclea lehmanni* Seeds. *Plant Cell Physiol*, 38(4): 480-483.
  178. Melgarejo, L.M., Vega, N., Pérez, G. (2005). Isolation and characterization of novel lectins from *Canavalia ensiformis* DC and *Dioclea grandiflora* Mart. Ex Benth. seeds. *Braz J Plant Physiol*, 17(3): 315-24.
  179. Melnykova, N. M., Mykhalkiv, L. M., Mamenko, P. M., Kots, S. Ya. (2013). The areas of application for plant lectins. *Biopolymers and Cell*, 29(5): 357–66.
  180. Metelmann, H.R., Brandner, J.M., Schumann, H., Bross, F., Fimmers, R., Böttger, K., Scheffler, A., Podmelle, F. (2015). Accelerated reepithelialization by triterpenes: proof of concept in the healing of surgical skin lesions. *Skin Pharmacol Physiol*, 28(1):1-11. doi: 10.1159/000357501.
  181. Monteiro Tinel, J.M., Benevides, M.F., Frutuoso, M.S., Rocha, C.F., Arruda, F.V., Vasconcelos, M.A., *et al.* (2014). A Lectin from *Dioclea violacea* Interacts with Midgut Surface of *Lutzomyia migonei*, Unlike Its Homologues, *Cratylia floribunda* Lectin and *Canavalia gladiata* Lectin
  182. Möginger, U., Grunewald, S., Hennig, R., Kuo, C.W., Schirmeister, F., Voth, H., Rapp, E., *et al.* (2018). Alterations of the Human Skin N- and O-Glycome in Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *Front Oncol*; 8:70. doi: 10.3389/fonc.2018.00070.
  183. Moreira, R.A., Barros, A.C.H., Stewart, J.C., Pusztai, A. (1983). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart.). *Planta* (Heidelh.) 158: 63 – 69.
  184. Moreira, R.A., Cavada, B.S. (1984). Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biol Plantarum*; 26, 113-20.
  185. Moreira, R.A., Cordeiro, E.F., Ramos, M.V., Grangeiro, T.B., Martins, J.L., Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S. (1996). Isolation and partial characterization of a lectin from seeds of *Dioclea violacea*. *Braz J Plant Physiol*. 8, 23-9.
  186. Moreira, R.A., Monteiro, A.C.O., Horta, A.C.G., Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S. (1997). Isolation and characterization of *Dioclea altissima* Var. *Megacarpa* seed lectin. *Phytochem*; 46, 139-44.
  187. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 65 (1-2): 55 - 63.
  188. Murphy, P.S. & Evans, G.R.D. (2012). Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products. *Plastic Surgery Internal*, Volume Article ID 190436, 8 pages doi:10.1155/2012/190436.

189. Murphy, P.V., André, S., Gabius, H.J. (2013). The Third Dimension of Reading the Sugar Code by Lectins: Design of Glycoclusters with Cyclic Scaffolds as Tools with the Aim to Define Correlations between Spatial Presentation and Activity. *Molecules*, 18: 4026-53; doi:10.3390/molecules18044026.
190. Naeem, A., Saleemuddin, M., Khan, R.H. (2007). Glycoprotein Targeting and Other Applications of Lectins in Biotechnology. *Current Protein and Peptide Sci*, 8: 261-71.
191. Nagae, M. & Yamaguchi, Y. (2014). Three-Dimensional Structural Aspects of Protein–Polysaccharide Interactions. *Int J Mol Sci*, 15: 3768-83; doi:10.3390/ijms15033768.
192. Nagae, M., Soga, K., Morita-Matsumoto, K., Hanashima, S., Ikeda, A., Yamamoto, K., Yamaguchi, Y. (2014). Phytohemagglutinin from *Phaseolus vulgaris* (PHA-E) displays a novel glycan recognition mode using a common legume lectin fold. *Glycobiol*; 24(4):368-78.
193. Nagano, C.S., Calvete, J.J., Baretino, D., Pérez, A., Cavada, B.S., Sanz, I. (2008). Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer–tetramer equilibrium through crystallographic analysis of recombinant *Diocleinae* lectins. *Biochem J*, 409: 417–28. doi:10.1042/BJ20070942.
194. Nakatsujii, T. & Gallo, R.L. (2012). Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas. *J Invest Dermatol*, 132(3): 887-95. doi: 10.1038/jid.2011.387.
195. Nasir W, Frank M, Kunze A, Bally M, Parra F, Nyholm PG, et al. (2017). Histo-Blood Group Antigen Presentation Is Critical for Binding of Norovirus VLP to Glycosphingolipids in Model Membranes. *ACS Chem Biol*; 12(5):1288-96.
196. Navarro, Y. & Pérez, G. (1978). Detección y caracterización preliminar de lectinas presentes en semillas de leguminosas. *Rev Col Quím*, 8:25-43.
197. Neto, L.G, Pinto Lda, S., Bastos, R.M., Evaristo, F.F., Vasconcelos, M.A., Carneiro, V.A., Arruda, F.V., Porto, A.L., Leal, R.B., Júnior V.A., Cavada, B.S., Teixeira, E.H. (2011). Effect of the Lectin of *Bauhinia variegata* and Its Recombinant Isoform on Surgically Induced Skin Wounds in a Murine Model. *Molecules*, 16: 9298-315.
198. Newlaczyk, A.U. & Yu, L.G. (2011). Galectin-3: A jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett*, 313:123-8.
199. Ochieng, J., Furtak, V., Lukyanov, P. (2004). Extracellular functions of galectin-3. *Glycoconj J*, 19: 527–35.
200. Oguchi, M., Kobayasi, T., Asboe-Hansen, G. (1985). Secretion of type IV collagen by keratinocytes of human adult. *J Invest Dermatol*; 85(1):79-81.
201. Ohashi, K., Fujiwara, S., Mizuno, K. 2017. Roles of the cytoskeleton, cell adhesion and rho signalling in mechanosensing and mechanotransduction. *J Biochem*, 161(3): 245–54.
202. Ohtsubo, K. & Marth, J.D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* 126: 855–67.
203. Ojeh, N., Pastar, I., Tomic-Canic, M., Stojadinovic, O. (2015). Stem Cells in Skin Regeneration, Wound Healing, and Their Clinical Applications. *Int J Mol Sci*, 16 (10): 25476-501. doi: 10.3390/ijms161025476.
204. Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S., Moreira, R.A. (1991). Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. *Rev Bras Botânica*, 14, 63-8.
205. Page, C., Dawson, P., Woollacott, D., Thorpe, R., Mire-Sluis A. (2000). Development of a lyophilization formulation that preserves the biological activity of the platelet-inducing cytokine interleukin-11 at low concentrations. *J Pharm Pharmacol*, 52(1):19-26.
206. Palcic, M.M. & Hindsgaul, O. (1991). Flexibility in the donor substrate specificity of  $\beta$ 1,4-galactosyltransferase: Application in the synthesis of complex carbohydrates. *Glycobiol*, 1, 205-9.
207. Panjwani, N. (2014). Role of galectins in reepithelialization of wounds. *Ann Transl Med*, 2(9):89. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.09.09.
208. Paschinger K, Fabini G, Schuster D, Rendić D, Wilson IB. (2005). Definition of immunogenic carbohydrate epitopes. *Acta Biochim Pol*;52(3):629-32.
209. Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N.C., Ramirez, H., Nusbaum, A.G, Sawaya, A., Patel, S.B., Khalid, L., Isseroff, R.R., Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care*, 3(7): 445-64. doi: 10.1089/wound.2013.0473.
210. Patrino, A., Pesce, M., Grilli, A., Speranza, L., Franceschelli, S., De Lutiis, M.A, Vianale, G., et al. (2015). mTOR Activation by PI3K/Akt and ERK Signaling in Short ELF-EMF Exposed Human Keratinocytes. *PLoS One*;10(10):e0139644. doi: 10.1371/journal.pone.0139644.
211. Peplow, P.V. & Chatterjee, M.P. (2013). A review of the influence of growth factors and cytokines in *in vitro* human keratinocyte migration. *Cytokine*, 62(1): 1-21. doi: 10.1016/j.cyto.2013.02.015.
212. Pérez, G. & de Navarro, Y. (1978). Detección y caracterización preliminar de lectinas presentes en semillas de leguminosas. *Rev Colomb Quim.*, 8: 25 - 43.
213. Pérez, G. (1984). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Erythrina edulis*. *Phytochem*, 23:1229-32.
214. Pérez, G., Hernández, M., Mora, E. (1990). Isolation and characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea Lehmanni*. *Phytochem*, 29:1745-9.
215. Pérez, G., Perez, C., Cavada, B.S., Moreira, R.A., Richardson, M. (1991). Comparison of the amino acid sequences of the lectins from seeds of *Dioclea lehmanni* and *Canavalia maritima*. *Phytochem*; 30, 1619-21.
216. Pérez, G. (1995). Purification and Characterization of a Lectin from the Seeds of *Erythrina costaricensis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 27(8):857-63.
217. Pérez, G. (1998). Isolation and characterization of a novel lectin from *Dioclea lehmanni* (Fabaceae) seeds. *Int J Biochem Cell Biol*, 30:843–53.
218. Pérez S., Rivet A., Imberty A. (2015) 3D-Lectin Database. In: Taniguchi N., Endo T., Hart G., Seeberger P., Wong CH. (eds) *Glycoscience: Biology and Medicine*. Springer, Tokyo.

219. Piller, V., Piller, F., Cartron, J.P. (1990). Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. *Eur J Biochem*, 191: 461-6.
220. Pinto, L.S., Nagano, C.S., Oliveira, T.M., Moura, T.R., Sampaio, A.H., Debray, H., Pinto, V.P., Dellagostin, O.A., Cavada, B.S. (2008). Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *J Biosci*, 33(3):355-63.
221. Pinto-Júnior, V.R., de Santiago, M.Q., Osterne, V.J., Correia, J.L., Pereira-Júnior, F.N., Cajazeiras, J.B., de Vasconcelos, M.A., Teixeira, E.H., do Nascimento, A.S., Miguel, T.B., Miguel Ede, C., Sampaio, A.H., do Nascimento, K.S., Nagano, C.S., Cavada B.S. (2013). Purification, Partial Characterization and Immobilization of a Mannose-Specific Lectin from Seeds of *Dioclea lasiophylla* Mart. *Molecules*, 18: 10857-69; doi:10.3390/molecules180910857.
222. Pinto-Junior, V.R., Correia, J.L., Pereira, R.I., Pereira-Junior, F.N., Santiago, M.Q., Osterne, V.J., Madeira, J.C., Cajazeiras, J.B., Nagano, C.S., Delatorre, P., Assreuy, A.M., do Nascimento, K.S., Cavada, B.S. (2016) Purification and molecular characterization of a novel mannose-specific lectin from *Dioclea reflexa* seeds with inflammatory activity. *J Mol Recognit*, 29, 134-42.
223. Pickart, L., Vasquez-Soltero, J.M., Margolina, A. (2015). GHK Peptide as a Natural Modulator of Multiple Cellular Pathways in Skin Regeneration. *Biomed Res Int*, 2015:648108. doi: 10.1155/2015/648108.
224. Poiroux G, Barre A, van Damme EJM, Benoist H, Rougé P. (2017). Plant Lectins Targeting O-Glycans at the Cell Surface as Tools for Cancer Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Int J Mol Sci*; 18(6), 1232; doi:10.3390/ijms18061232.
225. Pramanik, J., Chatterjee, U., Mondal, G., Targon-Campana, P., Chatterjee, B. P. (2010). Tn/T Specific Agglutinin from Estuarine Crab *Scylla serrata* with Potent Mitogenic Activity on Mouse Splenocytes and Antiproliferative Effect on Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Cell. *Glycobiol Insights*, 2, 83–99
226. Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J.M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17: 1063-72. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x.
227. Queiroz, C., Mendes Lopes, M.L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L. (2008) Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Rev Int*, 24: 4, 361 - 75.
228. Quintero M., Reyes Montaña E., Pérez G., Vega N. (2013). Expression of two types *Diocleinae* Subtribe Lectins. *17th European Carbohydrate Symposium* (Eurocarb 17) Tel-Avid (Israel). Abstracts book pag 67.
229. Quintero, M. (2014). Elucidación parcial de la estructura primaria de la lectina LGL-P2 y purificación y caracterización parcial de la lectina LGL-P4 presentes en semillas de *Galactia lindenii*. Tesis de Maestría, Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.
230. Ramos, M.V., Moreira Rde, A., Oliveira, J.T., Cavada, B.S., Rougé, P. (1996). The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91(6):761-6.
231. Rangel, T.B., Assreuy, A.M., Pires, A.F., Carvalho, A.U., Benevides, R.G., Simões, R.C., Silva, H.C., Bezerra, M.J., Nascimento, A.S., do Nascimento, K.S., Nagano, C.S., Sampaio, A.H., Delatorre, P., Rocha, B.A., Fernandes, P.M., Cavada, B.S. (2011). Crystallization and characterization of an inflammatory lectin purified from the seeds of *Dioclea wilsonii*. *Molecules*. 16, 5087– 103.
232. Rapoport, E.M., Kurmyshkina, O.V., Bovin, N.V. (2008). Mammalian Galectins: Structure, Carbohydrate Specificity, and Functions. *Biochem (Moscow)*, 73(4):393-405.
233. Ravn, V., Dabelsteen, E. (2000). Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS*. 108, 1-28.
234. Reynolds, M., & Pérez, S. (2011). Thermodynamics and chemical characterization of protein-carbohydrate interactions: The multivalency issue. *Comptes Rendus Chimie*, 14(1), 74-95.
235. Richardson, M., Campos F.D., Moreira, R.A., Ainouz, I.L., Begbie, R., Watt, W.B., Pusztai, A. (1984). The complete amino acid sequence of the major alpha subunit of the lectin from the seeds of *Dioclea grandiflora* (Mart). *Eur J Biochem*. 144:101-11.
236. Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651): 1704-9.
237. Rocha BAM, Moreno FBMB, Delatorre P, Souza EP, Marinho ES, Benevides RG, Rustiguel JKR et al. (2009). Purification, characterization, and preliminary x-ray diffraction analysis of a lactose-specific lectin from *Cymbosema roseum* seeds. *Appl Biochem Biotech*, 152:383–93.
238. Rogers GN, Herrler G, Paulson JC, Klenk HD. (1986). Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells. *J Biol Chem*, ;261(13):5947-51.
239. Romo-Arévalo E, Arzate H, Montoya-Ayala G, Rodríguez-Romero A. (2016). High-level expression and characterization of a glycosylated human cementum protein 1 with lectin activity. *FEBS Lett*;590(1):129-38.
240. Roskoski Jr, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66:105-43.
241. Rougé P, Peumans WJ, Van Damme EJ, Barre A, Singh T, Wu JH, Wu AM. (2011). Glycotope structures and intramolecular affinity factors of plant lectins for Tn/T antigens. *Adv Exp Med Biol*;705:143-54.
242. Roy A., Kucukural A, Zhang Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc*, 5:725-38.
243. Roy A., Zhang Y. (2012). Recognizing Protein-Ligand Binding Sites by Global Structural Alignment and Local Geometry Refinement. *Structure* 20 (6): 987–97.
244. Roy, I. & Gupta, M.N. (2004). Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol Appl Biochem*, 39(Pt 2):165-77.

245. Rozwarski, D.A., Swami, B.M., Brewer, C.F., Sacchettini, J.C. (1998). Crystal structure of the lectin from *Dioclea grandiflora* complexed with core trimannoside of asparagine-linked carbohydrates. *J Biol Chem*, 273(49): 32818 - 32825.
246. Sá, R.C.S., Nóbrega de Almeida, R., Bhattacharyya, J. (2013). Pharmaceutical properties and toxicology of *Dioclea grandiflora*. *Pharm Biol*, 51(5): 659–67.
247. Saegusa, J., Hsu, D.K., Liu, W., Kuwabara, I., Kuwabara, Y., Yu, L., Liu, F.T. (2008). Galectin-3 protects keratinocytes from UVB-induced apoptosis by enhancing AKT activation and suppressing ERK activation. *J Invest Dermatol*, 128(10):2403-11.
248. Sano, H., Hsu, D.K., Apgar, J.R., Yu, L., Sharma, B.B., Kuwabara, I., Izui, S., Liu, F.T. (2003). Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest*, 112: 389–97.
249. Santoro, M.M. & Gaudino, G. (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res*, 304: 274-86.
250. Santos-de-Oliveira, R., Dias-Baruffi, M., Thomaz, S.M., Beltramini, L.M., Roque-Barreira, M.C. (1994). A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J Immunol*, 153(4):1798-807.
251. Saravanan, C., Liu, F.T., Gipson, I.K., Panjwan, N.I. (2009). Galectin-3 promotes lamellipodia formation in epithelial cells by interacting with complex N-glycans on  $\alpha 3\beta 1$  integrin. *J Cell Sci*, 122(20): 3684–93. doi: 10.1242/jcs.045674.
252. Sato, S. & Hughes, R.C. (1992). Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, poly lactosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem*; 267(10):6983-90.
253. Satomi, Y., Shimomishi, Y., Takao, T. (2004). N-glycosylation at Asn491 in the Asn-Xaa-Cys motif of human transferrin. *FEBS Lett*; 576, 51- 6.
254. Savage A.V., D'Arcy, S.M., Donoghue, C.M. (1991). Structural characterization of neutral oligosaccharides with blood-group A and H activity isolated from bovine submaxillary mucin. *Biochem J*; 279 (Pt 1):95-103.
255. Sehlbach M, König S, Mormann M, Sendker J, Hensel A (2013). Arabinogalactan protein cluster from *Jatropha curcas* seed embryo contains fasciclin, xylogen and LysM proteins. *Carbohydr Polym*; 98(1):522-31.
256. Smit CH, van Diepen A, Nguyen DL, Wuhrer M, Hoffmann KF, Deelder AM, Hokke CH. (2015). Glycomic Analysis of Life Stages of the Human Parasite *Schistosoma mansoni* Reveals Developmental Expression Profiles of Functional and Antigenic Glycan Motifs. *Mol Cell Proteomics*; 14(7):1750-69.
257. Spiro, R.G., Bhojroo, V.D. (1974). Structure of the O-glycosidically linked carbohydrate units of fetuin. *J Biol Chem*; 249, 5704-17.
258. Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, 166(2): 368-79.
259. Seetharaman, J., Kanigsberg, A., Slaaby, R., Leffler, H., Samuel, H., Barondes, S.H., Rini, J.M. (1998). X-ray Crystal Structure of the Human Galectin-3 Carbohydrate Recognition Domain at 2.1-Å Resolution. *J Biol Chem*, 273(21): 13047-52. doi: 10.1074/jbc.273.21.13047.
260. Sharif, M.K., Faiz ul Hassan Shah; Masood Sadiq Butt; Hafiz Rizwan Sharif. (2017). Role of nanotechnology in enhancing bioavailability and delivery of dietary factors. *Nutrient Delivery*, 587–618. doi: 10.1016/B978-0-12-804304-2.00015-9.
261. Sierra, A.Y. & Pérez, G. (1999). Extracción, purificación y caracterización de dos lectinas en semillas de *Dioclea sericea*. *Rev Acad Colomb Cienc*, 23(88): 445 - 454.
262. Silva, J.A., Damico, D.C., Baldasso, P.A., Mattioli, M.A., Winck, F.V., Fraceto, L.F., Novello, J.C., Marangoni, S. (2007). Isolation and biochemical characterization of a galactoside binding lectin from *Bauhinia variegata* Candida (BvcL) seeds. *Protein J*, 26, 193 - 201.
263. Silva, M., Silva, S., Nascimento, K., Nagano, C., Cavada, B. (2014). Physico-chemical characterization and partial sequence of a lectin from *Canavalia bonariensis* Lindl seeds. *BMC Proc*, 8 (Suppl 4): P227. doi: 10.1186/1753-6561-8-S4-P227.
264. Singer, A.J. & Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*, 341(10):738-46. doi:10.1056/NEJM199909023411006.
265. Singh T, Wu JH, Peumans WJ, Rougé P, Van Damme EJ, Wu AM. (2007). Recognition profile of *Morus nigra* agglutinin (Morniga G) expressed by monomeric ligands, simple clusters and mammalian polyvalent glycotopes. *Mol Immunol*; 44(4):451-62.
266. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem*, 150: 76-85.
267. Song, C., Luchtman, D., Kang, Z., Tam, E.M., Yatham, L.N., Su, K.P., Lam, R.W. (2015). Enhanced inflammatory and T-helper-1 type responses but suppressed lymphocyte proliferation in patients with seasonal affective disorder and treated by light therapy *J. Affect. Disord*, 185, 90-6.
268. Sousa, B.L., Silva Filho, J.C., Kumar, P., Pereira, R.I., Łyskowski, A., Rocha, B.A., Delatorre, P., et al (2015). High-resolution structure of a new Tn antigen-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* and a comparative analysis of Tn-binding legume lectins. *Int J Biochem Cell Biol*; 59:103-10.
269. Souza Teixeira, C., da Silva, H.C., de Moura, T.R., Pereira-Júnior, F.N., do Nascimento, K.S., Nagano, C.S., Sampaio, A.H., Delatorre, P., Rocha, B.A., Cavada, B.S. (2012). Crystal structure of

- the lectin of *Camposema pedicellatum*: implications of a conservative substitution at the hydrophobic subsite. *J Biochem*, 152(1):87-98.
270. Springer G. (1984). T and Tn, general carcinoma autoantigens. *Science*, 224:1189–206.
271. Stowell SR, Arthur CM, Mehta P, Slanina KA, Blixt O, Leffler H, Smith DF, Cummings RD. (2008). Galectin-1, -2, and -3 exhibit differential recognition of sialylated glycans and blood group antigens; 283(15):10109-23.
272. Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 111: A3.B.1-3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.
273. Sumner, J.B., Howell, S.F. (1936). The identification of the hemagglutinin of the jack bean with Concanavalin A. *J Bacteriol*; 32, 227-37.
274. Sunarti, S. (2015). Successful Treatment of Unstageable Pressure Ulcer by Using Advanced Wound Dressing. *Acta Med Indones*, 47(3): 251-2.
275. Surahio, A.R., Khan, A.A., Farooq, M., Fatima, I. (2014). Role of honey in wound dressing in diabetic foot ulcer. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 26(3): 304-6.
276. Talaga, M.L., Fan, N., Fueri, A.L., Brown, R.K., Chabre, Y.M., Bandyopadhyay, P., et al. (2014). Significant Other Half of a Glycoconjugate: Contributions of Scaffolds to Lectin–Glycoconjugate Interactions. *Biochem*, 53 (27), 4445-54.
277. Tarentino, A.L., Plummer, T.H. (1994). Enzymatic deglycosylation of asparagine-linked glycans: purification, properties, and specificity of oligosaccharide-cleaving enzymes from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol*; 230: 44 - 57. doi:10.1016/0076-6879(94)30006-2
278. Timoshenko, A.V., Kaltner, H., Andre, S., Gabius, H.J, Lala, PK. (2010). Differential Stimulation of VEGF-C Production by Adhesion/Growth-regulatory Galectins and Plant Lectins in Human Breast Cancer Cells. *Anticancer Res*, 30: 4829-34.
279. Tirabassi, R. (2013). Surviving the Big Chill: Freezing and Thawing Mammalian Cells. <http://bitesizebio.com/13684/freezing-and-thawing-mammalian-cells-tutorial/>.
280. Tran D.T., & Ten Hagen, K.G. (2013). Mucin-type O-glycosylation during development. *J Biol Chem*; 288(10):6921-9.
281. Tsuboi, S., Hatakeyama, S., Ohyama, C., Fukuda, M. (2012). Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis. *Trends Mol Med*, 18, 224-32.
282. Uemura, T., Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Miyazaki, S., Satomi, S., et al. (2009). Contribution of sialidase NEU1 to suppression of metastasis of human colon cancer cells through desialylation of integrin  $\beta$ 4. *Oncogene*, 28: 1218–29.
283. Vandenborre G., Van Damme E.J.M., Smaghe G. (2009). Natural Products: Plant Lectins as Important Tools in Controlling Pest Insects. In: Ishaaya I., Horowitz A. (eds) *Biorational Control of Arthropod Pests*. Springer, Dordrecht.
284. Van Driessche, E., Beeckmans, S., Dejaegere, R., Kanarek, L. (1984). Thiourea: The antioxidant of choice for the purification of proteins from phenol-rich plant tissues. *Anal Biochem*, 141(1):184-8.
285. Vanti, G.L., Katageri, I.S., Inamdar, S.R., Hiremathada, V., Swamy, B.M. (2018). Potent insect gut binding lectin from *Sclerotium rolfsii* impart resistance to sucking and chewing type insects in cotton. *J Biotechnol*; 278: 20-7.
286. Varela E.S., Lima J.P., Galdino, A.S., Pinto Lda, S., Bezerra, W.M., Nunes, E.P., Alves, M.A., Grangeiro, T.B. (2004). Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from internal transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. *Phytochem*, 65(1):59-69.
287. Vasconcelos, I.M., Cavada, B.S., Moreira, R.A., Oliveira, J.T.A. (1991). Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. *J Food Biochem*, 15, 137-54.
288. Vasta, G.R. (2012). Galectins as Pattern Recognition Receptors: Structure, Function, and Evolution. *Adv Exp Med Biol*, 946: 21 – 36. doi:10.1007/978-1-4614-0106-3\_2.
289. Vega, N. & Pérez, G. (2006). Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochem*, 67: 347-55.
290. Vijayan, M. & Chandra, N. (1999). Lectins. *Curr Opin Struct Biol*; 9, 707–14.
291. Wah, D.A., Romero, A., Gallego del Sol, F., Cavada, B.S., Ramos, M.V., Romero, A., et al. (2001). Crystal structure of native and Cd/Cd substituted *Dioclea guianensis* seed lectin. A novel manganese-binding site and structural basis of dimer-tetramer association. *J Mol Biol*, 310, 885-94.
292. Wang, W., Hause, B., Peumans, W.J., Smaghe, G., Mackie, A., Fraser, R., Van Damme, E.J.M. (2003). The Tn antigen-specific lectin from ground ivy is an insecticidal protein with an unusual physiology. *Plant Physiol*, 132, 1322–34.
293. Watson, A., Morris, V.L., Chan, B.M. (2009). Coordinated integrin and growth factor regulation of primary keratinocyte migration mediated through extracellular signal regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Arch Dermatol Res*; 301(4):307-17.
294. Wee, P. & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9, 52; doi:10.3390/cancers9050052.mpd.com.
295. Wenzel M, Gers-Barlag H, Schimpl A, Rüdiger H. (1993). Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. *Biol Chem Hoppe Seyler*; 374(9):887-94.
296. Wilches Torres A., Rojas Caraballo J., Sanabria E., Reyes Montaña E, FernÁndez Alonso JI, Varrot A., Imberty A., Vega N. (2017). Purification and biochemical characterization of a T/TN specific lectin from *Lepechinia bullata* seeds (Lamiaceae). *IJPPS*, 9(11):165-74.
297. Wilgus T.A, Roy, S., McDaniel J.C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care*, 2(7):379-88. doi: 10.1089/wound.2012.0383.

298. Wilson, I. B. H. & Altmann, F. (1998). Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens. Core a1,3-fucose and xylose present in all pollens examined. *Glycoconj J*, 15:1055–70.
299. Windwarder, M. & Altmann, F. (2014). Site-specific analysis of the O-glycosylation of bovine fetuin by electron-transfer dissociation mass spectrometry. *J Proteomics*, 108:258–68.
300. Wu, A.M., Duk, M., Lin, M., Broadberry, R.E., Lisowska, E. (1995). Identification of variant glycoporphins of human red cells by lectinoblotting: application to the mi.III variant that is relatively frequent in the Taiwanese population. *Transfusion*, 35, 571–6.
301. Wu, AM. (2004). Polyvalency of Tn (GalNAc $\alpha$ 1→Ser/Thr) glycotope as a critical factor for *Vicia villosa* B4 and glycoprotein interactions. *FEBS Lett* 562:51–8.
302. Wu, A.M., Wu, J.H., Yang, Z., Singh, T., Goldstein, I.J., Sharon, N. (2008). Differential contributions of recognition factors of two plant lectins *Amaranthus caudatus* lectin and *Arachis hypogea* agglutinin, reacting with Thomsen-Friedenreich disaccharide (Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-Ser/Thr). *Biochimie*; 90(11-12):1769-80.
303. Wu, A.M., Wu JH, Liu JH, Chen YY, Singha B, Chow LP, Lin JY. (2009) Roles of mammalian structural units, ligand cluster and polyvalency in the *Abrus precatorius* agglutinin and glycoprotein recognition process. *Mol Immunol* 46:3427–37.
304. Wu A.M., Liu JH., Singh T., Yang Z. (2011) Recognition Roles of Mammalian Structural Units and Polyvalency in Lectin–Glycan Interactions. In: Wu A. (eds) *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-3. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol 705. Springer, Boston, MA.
305. [www.education.com/worksheets/article/parts-of-a-seed-1/](http://www.education.com/worksheets/article/parts-of-a-seed-1/)
306. [www.protocol-online.org/biology-forums/posts/5075.html](http://www.protocol-online.org/biology-forums/posts/5075.html).
307. Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol*, 16(2): 99–117.
308. Yang, E.H., Rode, J., Howlader, M.A., Eckermann, M., Santos, J.T., Hernandez Armada, D., Zheng, R, *et al.* (2017). Galectin-3 alters the lateral mobility and clustering of  $\beta$ 1-integrin receptors. *PLoS One*; 12 (10):e0184378. doi: 10.1371/journal.pone.0184378.
309. Yang, R.Y., Liu, F.T. (2003). Galectins in cell growth and apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, 60:267-76.
310. Ye, Q., & She, Q.B. (2013) Integration of AKT and ERK Signaling Pathways in Cancer: Biological and Therapeutic Implications. *J Pharmacol Clin Toxicol* 1(2): 1009.
311. Yoon, S.J., Nakayama, K, Hikita, T., Handa, K., Hakomori, SI. (2006). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*;103(50):18987-91
312. Yu, H.L., Zhao, T.F., Wu, H., Pan, Y.Z., Zhang, Q., Wang, K.L., Zhang, C.C., Jin, Y.P. (2015). Pinellia ternata lectin exerts a pro-inflammatory effect on macrophages by inducing the release of pro-inflammatory cytokines, the activation of the nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway and the overproduction of reactive oxygen species. *Int J Mol Med*, 36(4):1127-35. doi: 10.3892/ijmm.2015.2315.
313. Zegers, M.M. & Friedl, P. (2014). Rho GTPases in collective cell migration. *Small GTPases*; 5:e28997, doi: 10.4161/sgtp.28997.
314. Zhang, K., Tian, Y., Yin, L., Zhang, M., Beck, L.A., Zhang, B., Okunieff, P., Zhang, L., Vidyasagar, S. (2011). Fibroblast growth factor-peptide improves barrier function and proliferation in human keratinocytes after radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 81(1): 248-54. doi: 10.1016/j.ijrobp.2011.02.004.
315. Zhang, Q., Fong, C.C., Yu, W.K., Chen, Y., Wei, F., Koon, C.M., Lau, K.M., Leung, P.C., Lau, C.B., Fung, K.P., Yang, M. (2012). Herbal formula *Astragali Radix* and *Rehmanniae Radix* exerted wound healing effect on human skin fibroblast cell line Hs27 via the activation of transformation growth factor (TGF- $\beta$ ) pathway and promoting extracellular matrix (ECM) deposition. *Phytomedicine*, 20(1): 9-16. doi: 10.1016/j.phymed.2012.09.006.
316. Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9: 40; doi: 10.1186/1471-2105-9-40.
317. Zhao, M. (2009). Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration. *Semin Cell Dev Biol*, 20(6): 674-82. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.12.009.
318. Zhao, Y., Itoh, S., Wang, X., Isaji, T., Miyoshi, E., Kariya, Y., *et al.* (2006). Deletion of core fucosylation on  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 integrin down-regulates its functions. *J Biol Chem*; 281(50):38343-50.
319. Zhong, J., Paul, A., Kellie, S.J., O'Neill, G.M. (2010). Mesenchymal migration as a therapeutic target in glioblastoma. *J Oncol*; 2010:430142. doi: 10.1155/2010/430142.
320. Zhuo, Y., Chammas, R., Bellis, S.L. (2008). Sialylation of  $\beta$ 1 Integrins Blocks Cell Adhesion to Galectin-3 and Protects Cells against Galectin-3-induced Apoptosis. *J Biol Chem*, 283(32): 22177-85. doi: 10.1074/jbc.M8000015200.