

Síntesis de glicoconjugados de albúmina sérica bovina y oligosacáridos de quitosano para el análisis de adhesión bacteriana

► Ana Irene Ledesma-Osuna^{1a*}, Gabriela Pérez Chenoweth², Luz Vázquez Moreno^{1b}, Beatriz Montaña Leyva^{3a}, Concepción Lorenia Medina Rodríguez^{4a}, María Irene Silvas García^{4a}, Benjamín Ramírez Wong^{5a}

¹ PhD en Ciencias.

² Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos.

³ PhD en Biotecnología.

⁴ PhD en Ciencias de Alimentos.

⁵ PhD en Ingeniería Agrícola.

^a Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora, Hermosillo, México.

^b Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Asociación Civil, (CIAD,AC), Hermosillo, Sonora, México.

* Autora para correspondencia.

Resumen

El aumento de la resistencia a los antibióticos por parte de bacterias patógenas ha motivado la búsqueda de alternativas para disminuir su utilización. Dentro de las opciones propuestas se encuentra la terapia de antiadherencia, en la cual se utilizan moléculas análogas a los glicopéptidos que son reconocidos por las bacterias para impedir la unión de éstas al tejido celular. En este estudio se llevó a cabo la obtención de glicoconjugados por medio de la reacción de Maillard partiendo de albúmina sérica bovina (BSA) y oligosacáridos de quitosano (oligosacáridos sin ultrafiltrar, ultrafiltrados y ultrafiltrados acetilados), en proporción 1:1 (p/p) a tres temperaturas de incubación (50, 60 y 70 °C) por 30 min. La caracterización de los conjugados sintetizados se realizó utilizando electroforesis (SDS-PAGE), espectroscopía de infrarrojo y espectroscopía de fluorescencia. Se realizaron ensayos de reconocimiento usando aglutinina de germen de trigo (WGA) y bacterias [*Escherichia coli* (K88ac y K88+)]. La caracterización por medio de electroforesis y espectroscopía de infrarrojo evidenció la unión de los oligosacáridos de quitosano a la estructura de la BSA. Además, los ensayos evidenciaron el reconocimiento de las moléculas sintetizadas tanto por la lectina WGA como por las bacterias. Los glicoconjugados sintetizados sin ultrafiltrar ni acetilar mostraron resultados muy favorables en el reconocimiento por ambas bacterias, lo que constituye una ventaja práctica, ya que su implementación a mayor escala reduciría costos de producción.

Palabras clave: Terapia anti-adherente; Glicoconjugados; *Escherichia coli*; Oligosacáridos de quitosano

Synthesis of glycoconjugates of bovine albumin and chitosan oligosaccharides for the analysis of bacterial adhesion

Abstract

The increase in antibiotic resistance by pathogenic bacteria has motivated the search for alternatives to reduce the use of antibiotics. Among these alternatives is anti-adhesion therapy, in which molecules that mimic the glycoepitopes that recognise bacteria are used to prevent their binding to cellular tissue. In this study, glycoconjugates were obtained by means of the Maillard reaction starting from bovine serum albumin (BSA) and chitosan oligosaccha-

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

rides (unfiltered oligosaccharides, ultrafiltered and acetylated ultrafiltered), in a ratio of 1:1 (w/w) at three incubation temperatures (50, 60 and 70 °C) per 30 min. The characterisation was performed using the techniques of electrophoresis (SDS-PAGE), infrared spectroscopy and fluorescence spectroscopy. Recognition assays were performed using wheat germ agglutinin (WGA) and *Escherichia coli* bacteria (K88ac and K88+). Characterisation by electrophoresis and infrared spectroscopy demonstrated the binding of chitosan oligosaccharides to the structure of BSA. In addition, the tests showed the recognition of the molecules synthesised by both the WGA lectin and the *E. coli* bacteria. The glycoconjugates synthesised without ultrafiltration or acetylation showed very favourable results in recognition with both bacteria, which is an advantage, since its implementation on a larger scale would reduce production costs.

Keywords: Anti-adherence therapy; Glycation; *Escherichia coli*; Chitosan oligosaccharides

Síntese de glicoconjugados de albumina serica bovina e oligossacarídeos de quitosana para análise de adesão bacteriana

Resumo

O aumento da resistência aos antibióticos por bactérias patogênicas tem motivado a busca de alternativas para reduzir seu uso. Entre essas alternativas está a terapia anti-adesão, na qual são utilizadas moléculas análogas aos glicopéptidos que são reconhecidas pelas bactérias para impedir sua união ao tecido celular. Neste estudo, os glicoconjugados foram obtidos por meio da reação de Maillard a partir de albumina sérica bovina (BSA) e oligossacarídeos de quitosana (oligossacarídeos não ultrafiltrados, ultrafiltrados e acetilados ultrafiltrados), na proporção de 1:1 (p/p) em três temperaturas de incubação (50, 60 e 70 °C) durante 30 min. A caracterização dos conjugados sintetizados foi realizada utilizando a eletroforese (SDS-PAGE), espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de fluorescência. Os ensaios de reconhecimento foram realizados utilizando aglutinina de germe de trigo (WGA) e bactérias [*Escherichia coli* (K88ac e K88+)]. A caracterização por meio de eletroforese e espectroscopia de infravermelho demonstrou a união dos oligossacarídeos de quitosana à estrutura da BSA. Além disso, os testes evidenciaram o reconhecimento das moléculas sintetizadas tanto pela lectina WGA quanto pelas bactérias. Os glicoconjugados sintetizados sem ultrafiltração ou acetilação apresentaram resultados muito favoráveis no reconhecimento por ambas as bactérias, o que é uma vantagem, visto que sua implementação em maior escala reduziria custos de produção.

Palavras-chave: Terapia anti-adesão; Glicoconjugados; *Escherichia coli*; Oligossacarídeos de quitosana

Introducción

La falta de regulación en el uso de antibióticos ha contribuido al aumento de bacterias patógenas multirresistentes (1) (2). Debido a esto, han surgido múltiples investigaciones con la finalidad de estudiar nuevos enfoques para disminuir la utilización de estos fármacos. Uno de los enfoques que se ha estudiado es la síntesis de moléculas para el bloqueo de la unión de bacterias a tejidos, conocida como terapia antiadherente. Estas moléculas pueden imitar los sitios de reconocimiento en bacterias o bien células blanco a las que se unen con la finalidad de prevenir que la unión se lleve a cabo (3).

El estudio de la antiadherencia se inicia por la identificación de las moléculas que intervienen en la adhesión de las bacterias a las células blanco. Las lectinas bacterianas (adhesinas) reconocen glicanos de superficie unidos a estructuras más complejas denominadas glicoconjugados. Partiendo de este conocimiento es

como la terapia de antiadherencia utiliza diversas estrategias químicas para la obtención de glicoconjugados sintéticos que contengan estructuras específicas análogas a los receptores reconocidos por las adhesinas bacterianas (4). Para la síntesis de glicoconjugados se han desarrollado métodos que ayudan a obtener estas moléculas con funcionalidad biológica, es decir que puedan ser reconocidas por lectinas y adhesinas bacterianas. La glicación de proteínas de tipo no enzimático (reacción de Maillard) consiste en la unión química de hidratos de carbono reductores a grupos amino de proteínas (5) (6) lo que da como resultado glicoproteínas que pueden ser analizadas en el contexto de antiadherencia.

En este estudio se sintetizaron glicoconjugados con la finalidad de utilizarlos para bloquear la unión de las adhesinas de *Escherichia coli* K88ac y *Escherichia coli* K88+ a los tejidos. Para esto, es necesario identificar y evaluar las estructuras de glicanos que son reconocidas por las adhesinas de estas bacterias. En estudios de reconocimiento

de secuencias de hidratos de carbono se ha descrito que glucosamina y *N*-acetilglucosamina son las estructuras reconocidas por cepas de *Escherichia coli* (7) (8). Por esto, partiendo de esta información, se decidió utilizar al quitosano, polímero constituido por glucosamina y en menor grado *N*-acetilglucosamina, como fuente de estos hidratos de carbono para la síntesis de glicoconjugados con potencial de reconocimiento biológico (9).

Materiales y Métodos

Materiales

El quitosano fue obtenido de Qingdao Yuda Century Economy & Trade (Qingdao, China). La albúmina sérica bovina (BSA), el diclorhidrato de α -fenilendiamina de Sigma Fast OPD; la estreptavidina peroxidasa, la acrilamida, el dodecil sulfato de sodio (SDS), la biotina (éster de biotinamidocaproato de *N*-hidroxisuccinamida), el sulfato de potasio y el resto de los reactivos fueron de grado analítico de la marca Sigma Aldrich (México); el glicoconjugado de albúmina sérica bovina-triacetilglucosamina fue adquirido de Vector Laboratories (Newark, CA, EE.UU.). Se utilizaron medios de cultivo de agar y caldo triptéina de soja de Becton Dickinson (New Jersey, EE.UU.).

Obtención de oligosacáridos de quitosano por ultrafiltración

Una solución de quitosano al 1% en agua destilada fue sometida a ultrafiltración usando una membrana con límite de exclusión de 1000 Da y un equipo de ultrafiltración (Millipore® Massachusetts, EE.UU.). Se recolectó la fracción mayor a 1000 Da, se liofilizó y se usó para la síntesis de glicoconjugados.

Síntesis de glicoconjugados

La síntesis de glicoconjugados se realizó por medio de la reacción de Maillard, la cual fue promovida bajo condiciones alcalinas y tratamiento térmico. Se utilizó una proporción 1:1 (p/p) de proteína BSA y oligosacáridos de quitosano. Se sintetizaron tres grupos de glicoconjugados: grupo I. BSA:quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF), grupo II. BSA:quitosano ultrafiltrado (BSA-OUF) y grupo III. BSA:quitosano ultrafiltrado y acetilado posterior a la síntesis (BSA-OUFac). La síntesis se llevó cabo en soluciones de proteína:hidrato de carbono en *buffer* de carbonato de sodio a pH 9,0, liofilizadas, colocadas en condiciones de 43% de humedad, temperaturas de 50, 60 y 70 °C, y tiempo de incubación de 30 min. Después del tiempo de incubación, se estimó el contenido de proteína por el método de Bradford (10).

Para la acetilación del tercer grupo de glicoconjuga-

dos, se utilizó una mezcla de *buffer* de amonio (pH 9,4) y anhídrido acético (100 μ L de ambas soluciones) por cada 1000 μ g del glicoconjugado y se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Después, estas soluciones se secaron en un equipo Vacufuge® plus (marca Eppendorf; Hamburg, Alemania) por dos horas a 30 °C en condiciones de vacío (11). Posteriormente se suspendieron en *buffer* de fosfato de potasio (pH 7,2 y NaCl 0,15 M). Se realizó la diálisis de los tres grupos de glicoconjugados utilizando una membrana de 10 000 Da y se conservaron a -4 °C.

Caracterización de glicoconjugados

Electroforesis

La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes y reductoras (SDS-PAGE) con el objetivo de determinar diferencias en el peso molecular de los glicoconjugados obtenidos al ser comparados con la proteína BSA nativa y los patrones de migración de los estándares de peso molecular de amplio rango utilizados, con los cuales la ecuación de regresión fue obtenida. Se calculó el aumento en peso molecular por efecto de la adición de hidratos de carbono a la proteína BSA nativa (12).

Espectroscopía de infrarrojo

Los glicoconjugados liofilizados fueron colocados en un equipo un Cary 630 (Agilent; California, EE.UU.) y se obtuvieron señales de las vibraciones de los enlaces presentes en las muestras por efecto del tratamiento aplicado y al ser comparadas con los espectros de emisión de la proteína nativa (13). La espectroscopía de infrarrojo permite evidenciar la unión de los oligosacáridos de quitosano a la estructura de la proteína.

Espectroscopía de fluorescencia

La técnica presenta información sobre cambios conformacionales en la estructura terciaria de proteínas, tomando como referencia la presencia de los aminoácidos triptófano, fenilalanina y tirosina, los cuales poseen propiedades de fluorescencia (14). En el caso de la proteína BSA, ésta posee tres residuos de triptófano, los cuales se usan de referencia para obtener información sobre la modificación en la estructura debida a la unión de oligosacáridos. Para estas mediciones las muestras de glicoconjugados y BSA nativa se ajustaron a 0,05 unidades de absorbancia a 280 nm en *buffer* de fosfato de potasio salino pH 7,2, NaCl 0,15 M (PBS) y fueron excitadas a 295 nm, recolectando los espectros de emisión de fluorescencia entre 300 y 400 nm, en un espectrómetro de fluorescencia (Agilent; California, EE.UU.).

Ensayos de reconocimiento con lectina

Se inmovilizaron en microplaca 500 ng de cada tratamiento disueltos en *buffer* de carbonato de sodio a pH 9,6

por toda la noche a 4 °C. Posteriormente se realizaron 4 lavados con *buffer* tris-salino con Tween™ 20 (T-TBS) y se realizó un bloqueo por una hora a 37 °C con una solución con BSA al 1%. Nuevamente, se realizaron lavados con T-TBS, para después utilizar 100 µL de solución de lectina WGA por pocillo a una concentración de 0,001 µg/mL y se incubó 2 horas a 37 °C. Se realizaron lavados y se continuó con la incubación con estreptavidina peroxidasa (dilución 1:2000) por una hora, manteniendo la temperatura de 37 °C. Después se realizaron lavados y se agregó la solución reveladora de *o*-fenilendiamina (OPD), se incubó por 30 min antes de leer la absorbancia a 450 nm en lector de microplaca (marca BIORAD; California, EE.UU.). Los tratamientos evaluados consistieron en los glicoconjugados sintetizados, BSA nativa y control positivo BSA-triacetilglucosamina comercial (5).

Ensayos de reconocimiento con bacterias

El crecimiento de las bacterias *E. coli* K88ac y *E. coli* K88+ se llevó a cabo en tres pasos; el primero fue el crecimiento en caldo tripticasa soya, el segundo paso fue sembrar por estría en placa con agar de tripticasa soya y el tercero fue sembrar nuevamente en el mismo agar tomando una colonia aislada. El crecimiento de la segunda placa fue suspendido en *buffer* PBS, ajustando a 0,250 unidades de densidad óptica a 600 nm equivalente a $2,0 \times 10^8$ UFC/mL. Además, como parte de la preparación para los ensayos de reconocimiento con bacterias, los glicoconjugados obtenidos, así como la BSA nativa y el control positivo, se sometieron a una biotilación, utilizando 4 mg de biotina por cada 5 mg de proteína.

La solución de bacterias se ajustó con 1% de glutaraldehído y se utilizó para realizar la inmovilización en microplaca con 100 µL por pocillo, incubando a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente, se realizó un bloqueo con 300 µL de solución de BSA al 1,5% por toda la noche a 5 °C. Luego, se realizaron cuatro lavados con 100 µL con solución T-PBS (*buffer* PBS con Tween™ 20) y 5 minutos cada uno, para continuar con una incubación con 100 µL de solución de glicoconjugados, BSA y control positivo que contenían 1 µg de cada tratamiento biotilado, por 1 hora 30 min. Después de este tiempo, se repitieron los lavados y se continuó con la adición de 100 µL de solución de estreptavidina peroxidasa (dilución 1:2000) por 1 hora. Se realizaron cuatro lavados bajo las mismas condiciones mencionadas, se agregó el revelador OPD y se midió absorbancia a 450 nm después de incubar por 30 minutos (15).

Análisis estadístico y diseño de experimentos

Se realizó un análisis de varianza a un 95% de grado de confianza y un análisis de medias utilizando la prueba de Tuckey. El diseño de experimentos fue completa-

mente al azar y el análisis se realizó con el programa estadístico InfoStat (versión 2019). El procesamiento de los datos y la presentación de gráficos se realizaron con los *softwares* OriginPro versión 8 y SigmaPlot versión 10.

Resultados

Electroforesis

Esta técnica permite evidenciar la glicación por medio de los cambios en los patrones de migración de la proteína glicada al compararlos con la proteína nativa (sin glicar), lo que se debe al aumento en peso molecular (Fig. 1). En este trabajo se calcularon los pesos moleculares y las diferencias en peso con relación a la proteína nativa (BSA) de cada uno de los grupos de glicoconjugados sintetizados (Tabla I). Se observó aumento en peso molecular en cada uno de los glicoconjugados sintetizados. De manera general, se observó un mayor aumento en peso molecular a mayor temperatura de síntesis, con excepción del grupo III donde no se observaron diferencias entre los tratamientos sintetizados a 60 y 70 °C; sin embargo, fueron los glicoconjugados que mayor aumento en peso mostraron (6,45 kDa). Los tratamientos de los grupos I y II mostraron el mismo comportamiento entre sí.

Tabla I. *Peso molecular de glicoconjugados sintetizados y aumentos en peso obtenidos a partir de la migración en electroforesis SDS-PAGE*

Glicoconjugados	Peso molecular (kDa)	Aumento de peso molecular (kDa)
Grupo I ¹		
BSA	67,89	--
BSA-OSUF 50 °C	69,59	1,70
BSA-OSUF 60 °C	71,29	3,40
BSA-OSUF 70 °C	72,98	5,00
Grupo II ²		
BSA	68,09	--
BSA-OUF 50 °C	69,98	1,80
BSA-OUF 60 °C	71,87	3,78
BSA-OUF 70 °C	73,76	5,67
Grupo III ³		
BSA	68,62	--
BSA-OUFAC 50 °C	71,13	2,48
BSA-OUFAC 60 °C	75,07	6,45
BSA-OUFAC 70 °C	75,07	6,45

¹ Albúmina sérica bovina (BSA): quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF).

² BSA: quitosano ultrafiltrado (BSA-OUF).

³ BSA: quitosano ultrafiltrado y acetilado posterior a la síntesis (BSA-OUFAC).

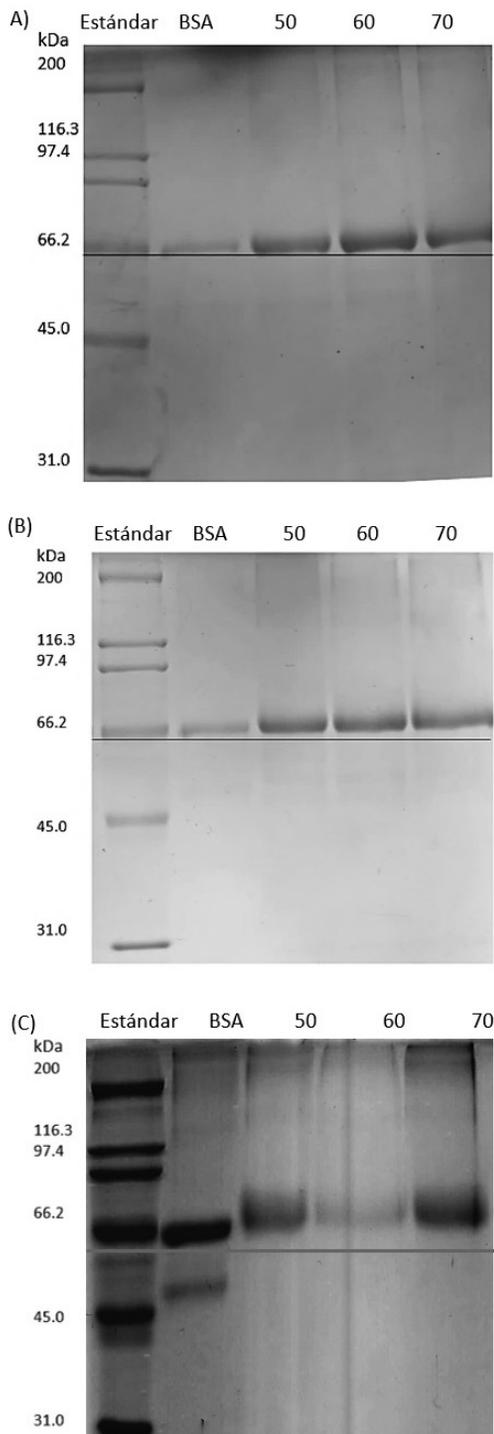


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE de albúmina sérica bovina (BSA) y glicoconjugados sintetizados a 50, 60 y 70 °C. A) grupo I: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF); B) grupo II: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano obtenidos por ultrafiltración usando una membrana de 1000 Da (BSA-OUF) y C) grupo III: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y acetilados posterior a la síntesis (BSA-OUFAC). Se usó como estándar una mezcla de proteínas de peso molecular de amplio rango.

Espectroscopía de infrarrojo

Por medio de la espectrometría de infrarrojo se obtuvieron los espectros de la proteína BSA nativa y de cada uno de los grupos de glicoconjugados sintetizados. Se observaron picos asociados a grupos funcionales presentes en la proteína BSA y se compararon con los observados en los espectros de los glicoconjugados.

En la Figura 2 se pueden observar picos de baja intensidad entre $3280\text{-}3290\text{ cm}^{-1}$, los cuales son representativos de grupos funcionales O-H y N-H presentes en agua y proteínas, respectivamente (16). Estas señales se observaron en proteína nativa y en los glicoconjugados de los grupos I y II (Fig. 2A) (Fig. 2B). El pico alrededor de los 1650 cm^{-1} cuya señal es representativa del grupo funcional amida presente en proteínas (16), se observa en las Figuras 2A, 2B y 2C. Las señales que aparecen entre $1000\text{ y }1100\text{ cm}^{-1}$ son típicas de las familias de hidratos de carbono y se pueden observar en los espectros de los glicoconjugados sintetizados; dichas bandas no se encuentran presentes en la BSA nativa.

Espectroscopía de fluorescencia

Los patrones de emisión de fluorescencia permitieron evaluar la estructura terciaria de proteínas. Las diferencias en los patrones emitidos por los distintos glicoconjugados sugieren cambios en la estructura terciaria de la proteína BSA por efecto de la modificación con hidratos de carbono (Fig. 3).

Se observa que los glicoconjugados de los grupos I (BSA-OSUF) y II (BSA-OUF) mostraron un comportamiento similar (Fig. 3A) (Fig. 3B). Se observó un aumento en la intensidad de la emisión de fluorescencia al comparar con la proteína sin conjugar y también se observó un desplazamiento de la longitud de onda de máxima emisión hacia la derecha o hacia el color rojo del espectro electromagnético. Los glicoconjugados del grupo III (BSA-OUFAC) mantuvieron el desplazamiento hacia el color rojo del espectro; sin embargo, la intensidad de fluorescencia disminuyó en cada uno de los glicoconjugados de este grupo (Fig. 3C).

Ensayos de reconocimiento con lectina

En la Figura 4 se muestran los resultados de los ensayos realizados con la finalidad de evaluar si la lectina de germen de trigo (WGA) era capaz de reconocer los glicoconjugados sintetizados. Se puede observar que los tres tipos de conjugados fueron reconocidos por la lectina WGA e incluso con mayor intensidad que el control positivo. De los tres tipos de conjugados, el tratamiento que fue sometido a acetilación presentó mayor intensidad de reconocimiento (Fig. 4C).

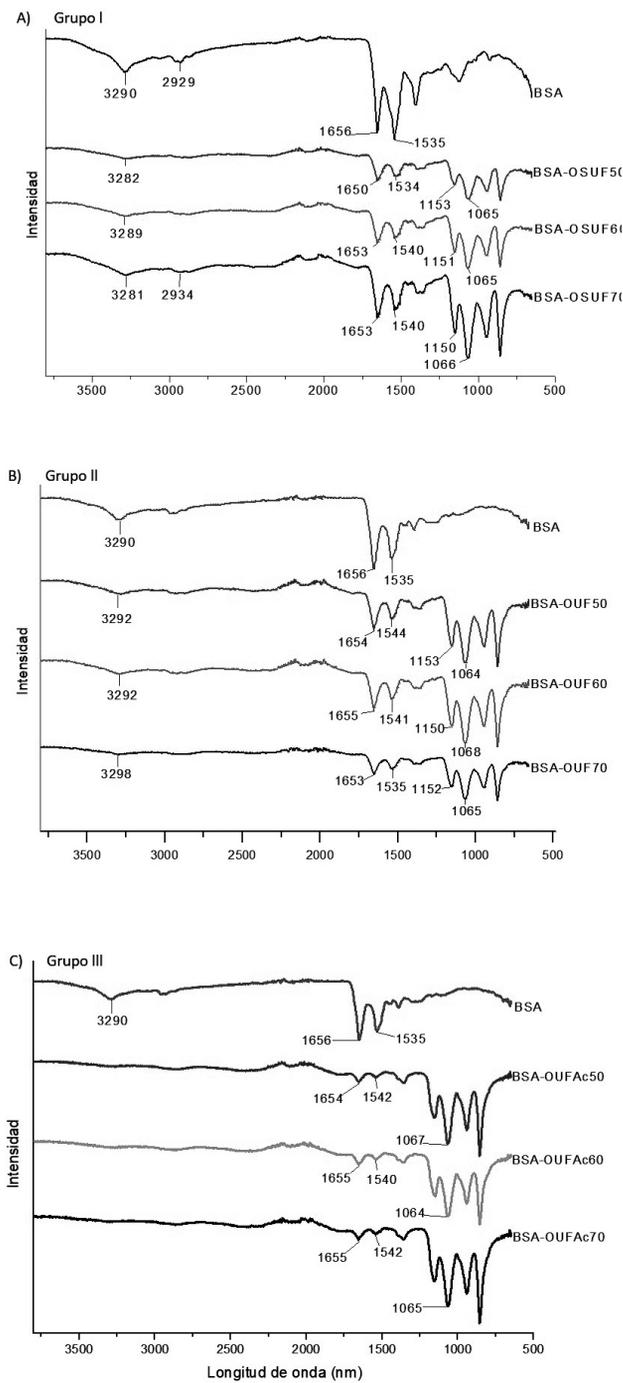


Figura 2. Espectros de infrarrojo de albúmina sérica bovina (BSA) y glicoconjugados sintetizados por incubación a 50, 60 y 70 °C. A) grupo I: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF); B) grupo II: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano obtenidos por ultrafiltración usando una membrana de 1000 Da (BSA-OUF) y C) grupo III: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y acetilados posterior a la síntesis (BSA-OUFAc).

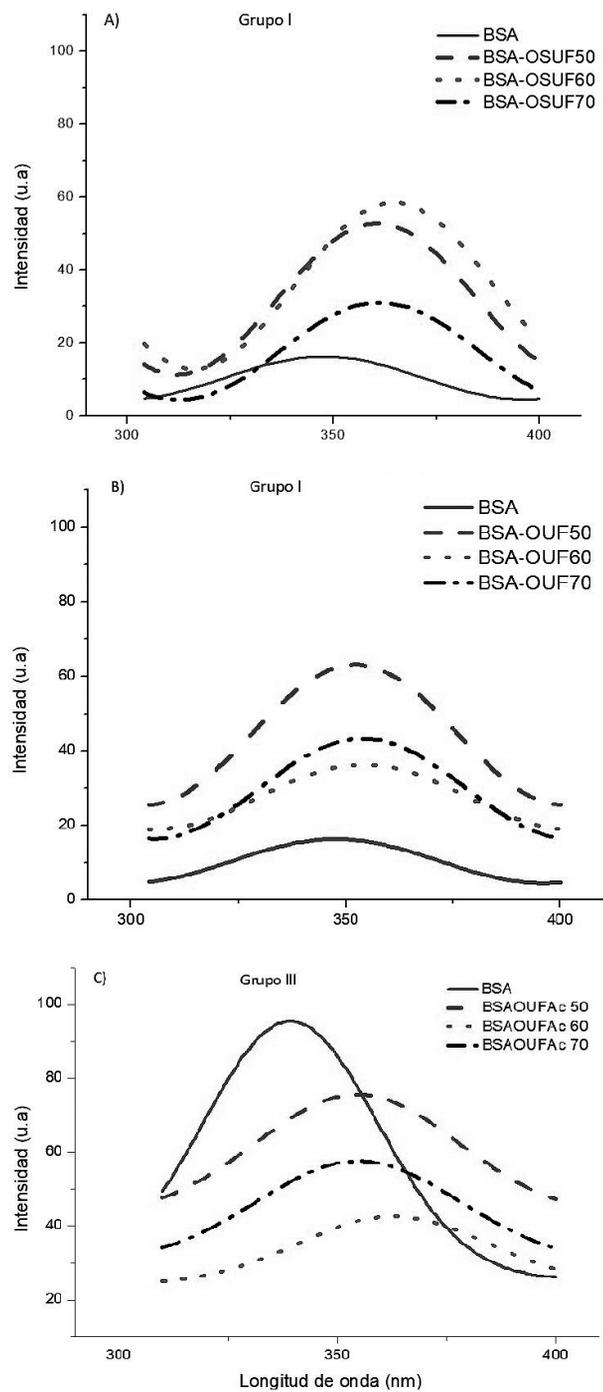


Figura 3. Patrones de emisión de fluorescencia de albúmina sérica bovina (BSA) y glicoconjugados sintetizados a 50, 60 y 70 °C. A) grupo I: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF); B) grupo II: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano obtenidos por ultrafiltración usando una membrana de 1000 Da (BSA-OUF) y C) grupo III: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y acetilados posterior a la síntesis (BSA-OUFAc).

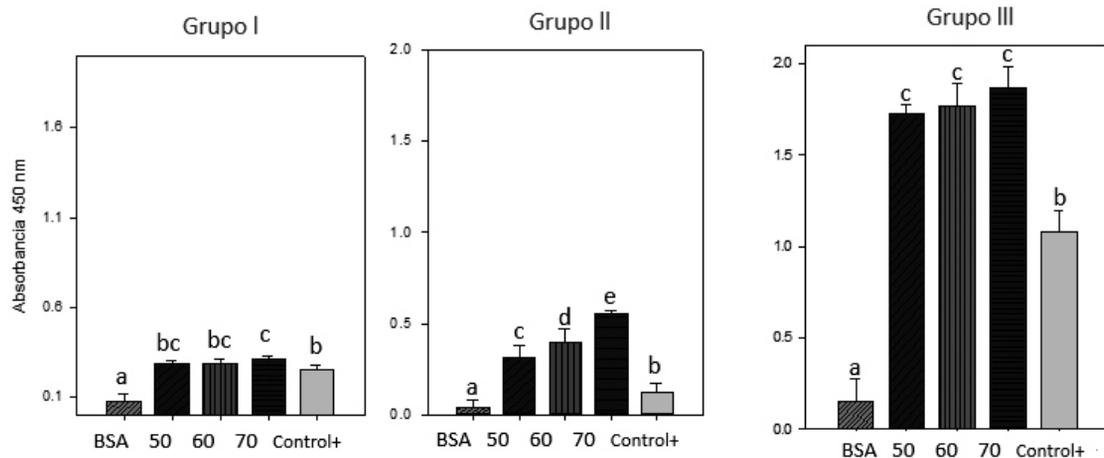


Figura 4. Ensayos de reconocimiento de los tratamientos por la lectina de germen de trigo (WGA). Los glicoconjugados fueron sintetizados por incubación a 50, 60 y 70 °C. A) grupo I: albúmina sérica bovina (BSA) conjugada con oligosacáridos de quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF); B) grupo II: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano obtenidos por ultrafiltración usando una membrana de 1000 Da (BSA-OUF) y C) grupo III: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y acetilados posterior a la síntesis (BSA-OUFAc). Se evaluó la proteína sin conjugar (BSA) y un glicoconjugado comercial de BSA-triacetilglucosamina como control (+).

No se observaron diferencias significativas por la temperatura de síntesis usada, excepto en el tratamiento con oligosacáridos ultrafiltrados, donde se observó que, a mayor temperatura de síntesis, se presentaba una mayor interacción con la lectina WGA. Se observó, además, que los tratamientos con ultrafiltración (grupo II) presentaron mayor reconocimiento que los tratamientos sin ultrafiltrar (grupo I).

Ensayos de reconocimiento por bacterias

En la Figura 5 se observan los resultados de los ensayos realizados con la finalidad de evaluar si las adhesinas de las cepas de *E. coli* K88+ y *E. coli* K88ac eran capaces de reconocer los glicoconjugados sintetizados. Primeramente, se puede observar que las bacterias seleccionadas en este estudio mostraron reconocimiento hacia los tres tipos de glicoconjugados. En ambas bacterias se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos y el control positivo, aunque fue más pronunciada esta diferencia con la cepa de *E. coli* K88+. En la Figura 5A se observa que las interacciones de *E. coli* K88+ y glicoconjugados del grupo I (BSA-OSUF) presentaron diferencias significativas y se obtuvieron valores mayores a menor temperatura de conjugación. En los glicoconjugados del grupo II (BSA-OUF) se observó que, al aumentar la temperatura de conjugación, aumentaba el reconocimiento; sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los 60 y los 70 °C. En los conjugados del grupo III (BSA-OUFAc) se pudieron observar diferencias significativas entre las tres temperaturas de conjugación, pero se obtuvo una mayor interacción a mayor temperatura. La cepa de *E. coli* K88ac presentó un com-

portamiento semejante (Fig. 5B); sin embargo, en los tres tipos de conjugados no se presentaron diferencias significativas entre las temperaturas de incubación de 60 y 70 °C.

Discusión y Conclusiones

Los resultados de la caracterización de los tres grupos de glicoconjugados sintetizados indicaron que se llevó a cabo la unión química de los oligosacáridos de quitosano a la estructura de la proteína BSA. Los incrementos en peso molecular mostraron un mayor grado de conjugación a temperaturas de incubación más elevadas (60 y 70 °C). Este comportamiento de la reacción de conjugación tipo Maillard utilizada para la síntesis, llevada a cabo en mayor grado a temperaturas más elevadas, ha sido ampliamente documentado (17) (18). También es importante señalar que la proteína BSA tiene un gran número de aminoácidos con cadenas laterales básicas (60 residuos de lisina), las cuales han demostrado, en estudios previos, tener mayor reactividad para la reacción de Maillard y pueden participar en la unión de los oligosacáridos de quitosano (5) (17) (19). Aun así, los aumentos en peso molecular no excedieron los 6,45 KDa, por lo que la reactividad de los oligosacáridos de quitosano usados fue baja. La longitud de cadena se relaciona de manera inversa con la reactividad para este tipo de reacción (20), sin embargo, la unión de hidratos de carbono del tipo oligosacárido es deseable ya que la extensión de cadena puede permitir que el hidrato de carbono terminal esté expuesto sobre la superficie de la proteína y de esta manera, favorecer el reconocimiento al interactuar con lectinas o adhesinas bacterianas.

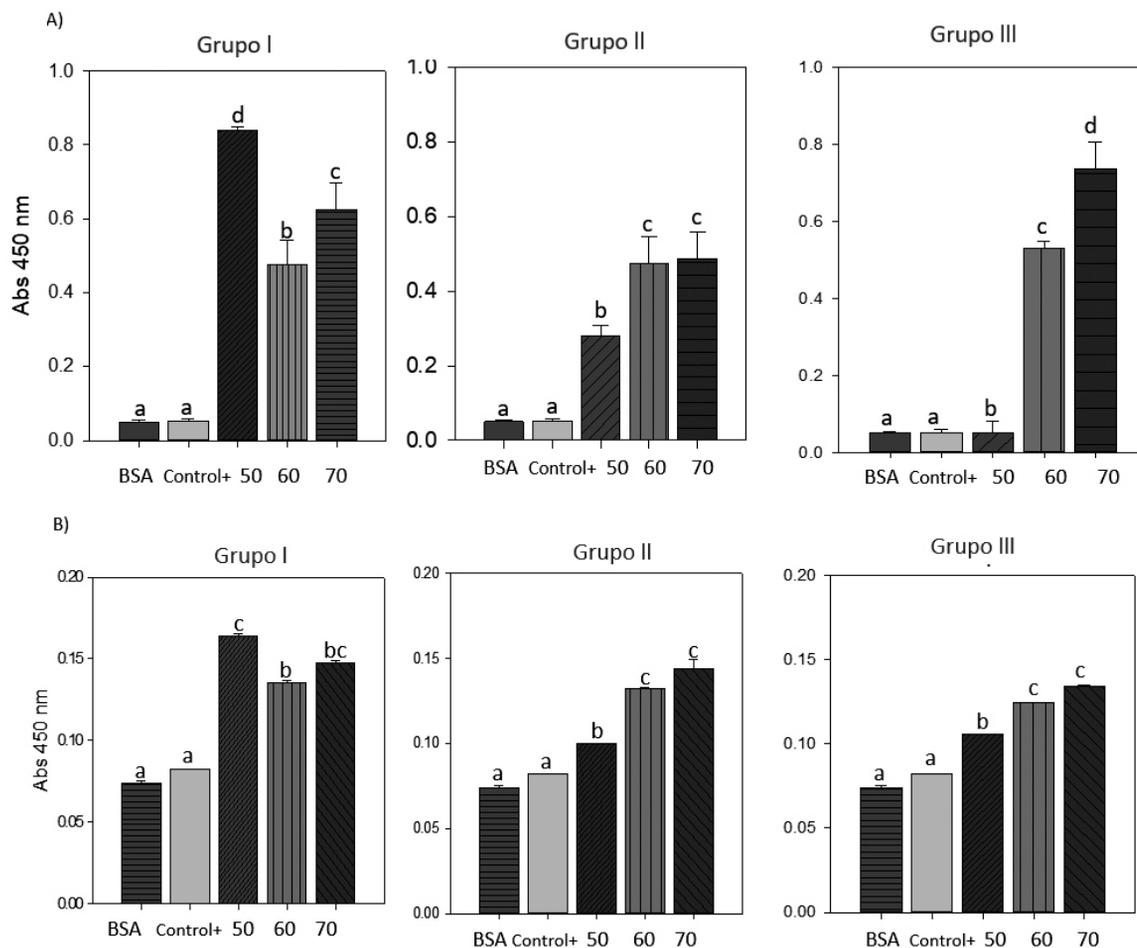


Figura 5. Ensayos de reconocimiento de las bacterias *E. coli* K88+ (A) y *E. coli* K88ac (B) hacia los glicoconjugados sintetizados por incubación a 50, 60 y 70 °C. Grupo I: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano sin ultrafiltrar (BSA-OSUF); grupo II: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano obtenidos por ultrafiltración usando una membrana de 1000 Da (BSA-OUF) y grupo III: BSA conjugada con oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y acetilados posterior a la síntesis (BSA-OUFac). Se evaluó la proteína sin conjugar (BSA) y un glicoconjugado comercial de BSA-triacetilglucosamina como control (+).

Los espectros de infrarrojo obtenidos en cada uno de los grupos de glicoconjugados mostraron picos alrededor de 1000 a 1100 cm^{-1} que son característicos de las familias de hidratos de carbono, lo cual es un sólido indicador de que la unión química de los distintos oligosacáridos a la estructura de la proteína se favoreció (16) (21). Estos resultados coinciden con los aumentos en peso molecular observados por medio de electroforesis. Los picos a 3280-3290 cm^{-1} , característicos de los enlaces O-H y N-H que no se observaron en los tratamientos sometidos a acetilación (grupo III), pueden deberse a que este procedimiento no solo afectó a la estructura del oligosacárido de quitosano, sino también a la proteína BSA y a la cantidad de agua presente, cuyos grupos O-H son en parte responsables de esta señal.

Por otra parte, las diferencias en los patrones de emisión de fluorescencia indican cambios conformaciona-

les en la estructura tridimensional de la proteína por efecto del tratamiento de glicación. La fluorescencia en proteínas se debe a la presencia de aminoácidos aromáticos, contribuyendo principalmente el aminoácido triptófano. Los cambios en fluorescencia bajo las condiciones de estudio se atribuyen a variaciones en el microambiente alrededor del aminoácido triptófano presente en la proteína. Dada su naturaleza hidrofóbica, el triptófano en medio acuoso tiende a encontrarse ocluido en la estructura de la proteína (22). El aumento en la intensidad de emisión de fluorescencia indicaría una mayor exposición de los residuos de triptófano al microambiente acuoso de la proteína, como se observó en los glicoconjugados de los grupos I y II, mientras que la disminución de esta emisión indica que la posición de estos residuos se encuentra en la parte interna de la estructura globular de la proteína, como en el caso de los conjugados del grupo III (23). Esto, probablemente

estuvo favorecido por la unión de grupos acetilo de naturaleza hidrofóbica agregados durante la acetilación. Cabe señalar que las condiciones de glicación, como pH y temperatura, también pudieron causar cambios en la estructura de la proteína, provocando agregación o desnaturalización de la misma, incidiendo en los patrones de emisión obtenidos. El desplazamiento de la longitud de onda de máxima emisión hacia la derecha del espectro indicaría que el microambiente que rodea a los residuos de triptófano es de característica hidrofílica, lo que puede implicar que los oligosacáridos se unieron a algún residuo cercano a la posición de triptófanos en la secuencia de aminoácidos de la proteína BSA, o bien, que el tratamiento aplicado provocó el desdoblamiento parcial de la cadena polipeptídica quedando los triptófanos más expuestos al medio acuoso (23) (24).

Después que los análisis realizados indicaron la unión de oligosacáridos a la estructura proteica, se evaluó la susceptibilidad de ser reconocidos por lectinas y adhesinas bacterianas. Se utilizó la lectina WGA, que reconoce específicamente estructuras de ácido siálico y *N*-acetilglucosamina (25). Los tres tipos de glicoconjugados sintetizados fueron reconocidos por la lectina WGA, en mayor medida en los tratamientos sometidos a acetilación. Este comportamiento posiblemente fue debido a que la lectina tiene mayor afinidad hacia residuos de *N*-acetilglucosamina que hacia glucosamina. El tratamiento de ultrafiltración también favoreció el reconocimiento; esto, posiblemente se debió a que con este procedimiento se eliminaron oligosacáridos de menor tamaño molecular y sólo se usaron para la síntesis los oligosacáridos de cadenas más largas, los cuales, una vez unidos a la estructura de la proteína, estarían más expuestos para el reconocimiento por la lectina; es decir, presentarían un menor impedimento estérico. Estos resultados indican que los oligosacáridos de quitosano presentes en los glicoconjugados sintetizados están disponibles para el reconocimiento por lectinas.

También las adhesinas de *E. coli* K88+ y *E. coli* K88ac fueron capaces de reconocer tanto estructuras de *N*-acetilglucosamina (tratamientos sometidos a acetilación) como de glucosamina (oligosacáridos de quitosano ultrafiltrados y sin ultrafiltrar), a diferencia de los ensayos con lectinas, que mostraron mayor especificidad hacia estructuras con *N*-acetilglucosamina (glicoconjugados acetilados, grupo III). Estas diferencias pueden ser debidas a que la lectina reconoce principalmente estructuras terminales, mientras que las distintas variantes de *E. coli* reconocen hidratos de carbono terminales específicos, con distintas afinidades hacia estructuras semejantes. Además, la presencia de ciertas estructuras puede promover mayor reconocimiento. Grange *et al.* (7) describieron que cada variante K88 tenía una especificidad de unión a hidratos de carbono diferente, pero relacionada. Propusieron que la secuencia mínima de hidratos de carbono que presenta mayor afinidad debe

contener una *N*-acetilhexosamina y, si además está unida una galactosa en enlace beta a esta estructura, se mejora dicha unión. En base a los hallazgos de esta investigación se podría decir que no sólo la unión a galactosa promueve el reconocimiento biológico, sino también la presencia de glucosamina o *N*-acetilglucosamina, las cuales son parte de la estructura del oligosacárido de quitosano empleado en esta investigación.

En conclusión, bajo las condiciones empleadas fue posible la síntesis de glicoconjugados. Esto fue evidenciado por electroforesis y análisis de infrarrojo. A mayor temperatura de síntesis se lograron mayores aumentos en peso molecular, y de manera general mayor reconocimiento biológico por lectinas y adhesinas bacterianas, excepto los conjugados del grupo I (sin ultrafiltrar) que aún a la temperatura de 50 °C presentaron un alto grado de reconocimiento, tanto por lectinas como adhesinas bacterianas.

El tratamiento más sencillo, es decir, sin ultrafiltrar ni acetilar y con la menor temperatura de incubación, mostró resultados muy favorables en el reconocimiento con ambas bacterias; esto es muy deseable desde el punto de vista práctico ya que se reducirían costos operativos al tratar de usar este glicoconjugado a gran escala como una estrategia profiláctica que reduzca el uso indiscriminado de antibióticos. Aunado a ello, el quitosano usado para la síntesis se encuentra en la naturaleza de manera muy abundante y el método de síntesis de glicoconjugados, es bastante sencillo y no requiere de reactivos tóxicos o de elevado costo. Sin embargo, se requieren estudios adicionales *in vivo* para evaluar la efectividad y viabilidad con sujetos de experimentación previo a la implementación de esta estrategia.

Agradecimientos

Gabriela Pérez Chenoweth recibió beca de CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología), México, para realizar sus estudios de posgrado.

Fuentes de financiación

La investigación fue financiada con recursos del Proyecto de Convocatoria Ciencia Básica 2011-168810.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. ANA IRENE LEDESMA OSUNA
Universidad de Sonora, Calle Rosales y Blvd. Luis Encinas s/n,
Col. Centro, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México.
Correo electrónico: anairene.ledesma@unison.mx

Referencias bibliográficas

1. Huttunen S, Toivanen M, Liu C, Tikkanen-Kaukanen C. Novel anti-infective potential of salvianolic acid B against human serious pathogen *Neisseria meningitidis*. BMC Res Notes 2016; 9 (1): 1-6.
2. Oteo J, Aracil MB. Caracterización de mecanismos de resistencia por biología molecular: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2015; 33 (S2): 27-33.
3. Sattin S, Bernardi A. Glycoconjugates and glycomimetics as microbial anti-adhesives. Trends Biotechnol 2016; 34 (6): 483-95.
4. Abraham SN, Sharon N, Ofek I, Schwartzman JD. Adhesion and colonization. En: Tang YW, Sussman M, Liu D, Poxton I, Schwartzman J, editors. Molecular Medical Microbiology. 2nd ed. Amsterdam, Países Bajos: Academic Press; 2015; p. 409-21.
5. Ledesma-Osuna AI, Ramos-Clamont G, Guzman-Partida AM, Vazquez-Moreno L. Conjugates of bovine serum albumin with chitin oligosaccharides prepared through the Maillard reaction. J Agric Food Chem 2010; 58 (22): 12000-5.
6. Sarabia-Sainz HM, Mata-Haro V, Sarabia-Sainz JA, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont G. Maillard neoglycans as inhibitors for *in vitro* adhesion of F4+ of enterotoxigenic *Escherichia coli* to piglet intestinal cells. Acta Biochim Pol 2017; 64 (4): 679-86.
7. Grange PA, Mouricout MA, Levery SB, Francis DH, Erickson AK. Evaluation of receptor binding specificity of *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial adhesin variants using porcine serum transferrin and glycosphingolipids as model receptors. Infect Immun 2002; 70 (5): 2336-43.
8. Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. EcoSal Plus 2016; 7 (1): 1-80.
9. Pujalte CE. Quitosano: un polisacárido natural biodegradable y biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicina. Rev Plásticos Modernos: Ciencia y Tec de Polim 2001; 535: 81-91.
10. Kruger NJ. The Bradford method for protein quantitation. En: Walker JM, editor. The protein protocols handbook, Totowa, NJ: Humana Press; 2009: 17-24.
11. Jackson P. Polyacrylamide gel electrophoresis of fluorophore-labelled reducing saccharides: a review. En: Jackson P, Gallagher JT, editors. A laboratory guide to glycoconjugate analysis (Biomethods). Basilea, Suiza: Birkhäuser Verlag GmbH. 1997: 113-39.
12. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227 (5259): 680-5.
13. Snehalatha M, Ravikumar C, Hubert JI, Sekar N, Jayakumar VS. Spectroscopic analysis and DFT calculations of a food additive carmoisine. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 2009; 72 (3): 654-62.
14. Zoellner H, Hou JY, Hochgrebe T, Poljak A, Duncan MW, Golding J, *et al.* Fluorometric and mass spectrometric analysis of nonenzymatic glycosylated albumin. Biochem Biophys Res Commun 2001; 284 (1): 83-9.
15. Sarabia-Sainz HM, Armenta-Ruiz C, Sarabia-Sainz JA, Guzmán-Partida AM, Ledesma-Osuna AI, Vázquez-Moreno L, *et al.* Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to neoglycans synthesised with prebiotic galactooligosaccharides. Food Chem 2013; 141 (3): 2727-34.
16. Mondragón Cortez P. Principios y aplicaciones de la espectroscopía de infrarrojo en el análisis de alimentos y bebidas. 1^a ed. Jalisco, México: CONACYT-CIATEJ; 2020.
17. Ledesma-Osuna AI, Ramos-Clamont G, Vázquez-Moreno L. Characterization of bovine serum albumin glycosylated with glucose, galactose and lactose. Acta Biochim Pol 2008; 55 (3): 491-7.
18. Liu G, Zhong Q. High temperature-short time glycation to improve heat stability of whey protein and reduce color formation. Food Hydrocol 2015; 44: 453-60.
19. Cardoso HB, Wierenga PA, Gruppen H, Schols HA. Maillard induced glycation behaviour of individual milk proteins. Food Chem 2018; 252: 311-7.
20. Badui Dergal S. Química de los alimentos. 4^a ed. México DC: Pearson Educación; 2016.
21. Khajehpour M, Dashnau JL, Vanderkooi JM. Infrared spectroscopy used to evaluate glycosylation of proteins. Anal Biochem 2016; 348 (1): 40-8.
22. Dashnau JL, Zelent B, Vanderkooi JM. Tryptophan interactions with glycerol/water and trehalose/sucrose cryosolvents: infrared and fluorescence spectroscopy and *ab initio* calculations. Biophys Chem 2005; 114 (1): 71-83.
23. Uversky VN. A multiparametric approach in analysis of protein structure an unfolding-refolding reaction. En: Uversky VN, Permiákov EA, editors. Methods in protein structure and stability analysis: luminescence spectroscopy and circular dichroism. Nueva York, EE.UU.: Nova Science Publishers; 2007. p. 19-23.
24. Lakowicz JR. Principles of fluorescence spectroscopy. 2nd ed. Baltimore, EE.UU.: Springer; 2005.
25. Afrin R, Ikai A. Subunit unbinding mechanics of dimeric wheat germ agglutinin (WGA) studied by atomic force microscopy. FEBS Lett 2014; 588 (23): 4472-7.

Recibido: 30 de junio de 2021

Actualizado: 9 de octubre de 2023

Aceptado: 12 de octubre de 2023