



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Efectos de la WGA en la O-GlcNAcilación durante la activación de neutrófilos  
bovinos**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Calzada Ruiz Montserrat

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Edgar Zenteno Galindo  
Facultad de Medicina

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dra. Blanca Haydee Ruíz Ordaz  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Dra. Clara Inés Espitia Pinzón  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad de México. Febrero, 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 6 de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dra. Concepción Agundis Mata y Dr. Mohamed Ali Pereyra Morales, con el financiamiento del programa UNAM-PAPIIT (IN214315, IN204315 y IN221314).

Agradezco el apoyo proporcionado por la beca CONACyT (308016) y proyecto (CB-0129932) fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS**

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, especialmente al Laboratorio 6 por haber aportado el material, el equipo y conocimientos necesarios para llevar a cabo el proyecto.

A la Dra. Concepción Agundis Mata por permitirme integrarme a su equipo de trabajo, por la paciencia y disposición con las que me guiaron en el crecimiento personal y académico.

Al Dr. Ali Pereyra por el apoyo técnico en el desarrollo de técnicas de análisis y procesamiento de proteínas.

Al Dr. Edgar Zenteno por la paciencia y el apoyo brindado para mi formación académica.

Al Dr. Yonathan Garfas Becerra, por el conocimiento compartido y la confianza depositada.

Al comité tutorial integrado por la Dra. Blanca Haydee Ruiz Ordáz y la Dra. Clara Espitia Rodríguez, por ser guías en mi formación.

Al Laboratorio de Biología del Citoesqueleto del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, particularmente a la Biol. Olivia Reynoso Ducoing por el apoyo técnico en el desarrollo de técnicas de proteómica y al Dr. Javier Ambrosio Hernández por poner a la disposición el equipo y el personal para llevar a cabo éstas técnicas.

Al Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria de la UNAM, particularmente al Dr. Francisco Suárez Güemes, Dra. Beatriz Arellano Reynoso, Dr. Jonathan de la Vega Olivas, Dr. Alejandro Benítez Guzmán, por apoyo recibido en la logística para la obtención de muestras de sangre de bovino; a los Médicos Veterinarios que apoyaron en el muestreo, Ángel García Barragán, Yahel Francisco López Reyes e Itzel Nalleli Jiménez Vázquez.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi amada familia, que es única, divertida y hermosa.

A mi mamá por ser el soporte y alentar las ganas de seguir mis sueños, por quererme incondicionalmente.

A mi papá por no dejar de confiar, por el apoyo incondicional las 24 horas del día.

A Nina y Nino que siempre han estado ahí, que me enseñan todos los días que las cosas hechas con amor siempre son mejores, por que sonriendo, escuchando, cubriendo, y aconsejando me ayudan a llevar a cabo todas mis locuras.

A Delhi por ser la mejor amiga, confidente, prima y cómplice, todo, en una sola persona y mas que nada por quererme tanto desde toda la vida.

A Emilio, por que la vida me muestra que el mundo tiene esperanza cada vez que te veo sonreír y me recuerda que la vida se pasa muy rápido y es mejor aprovecharla.

A las estrellas que nunca dejaron de iluminar el camino aunque no estén más físicamente, Uvi y Lipe, por que siguen a mi lado izquierdo, en el corazón.

A los amigos que hice en el laboratorio 6, a Joserra, José Luis y Tania que me brindaron la mas cálida bienvenida a este maravilloso lugar de trabajo que se convirtió en un nuevo hogar, por los momentos de discusión científica y más que nada por los divertidos momentos de esparcimiento compartidos.

A la familia que elegí desde hace muchos años, por que siempre hay grandes momentos con viejos amigos, Mabs, Wera, Jor, Jime, Flaqui, Tic, Nayo.

## INDICE

ABREVIATURAS	I
1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 Neutrófilos	2
2.2 Glicosilación	4
2.3 O-GlcNAcilación	5
2.4 Relación de la O-GlcNAcilación y la fosforilación	7
2.5 La $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT)	8
2.6 La O-N-acetilglucosaminasa (OGA)	9
2.7 La O-GlcNAcilación y el sistema inmune	9
2.8 Detección de O-GlcNAcilación	10
2.9 Las lectinas como herramientas para identificar carbohidratos en modelos celulares	10
2.10 Fiebre de embarque	12
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. HIPÓTESIS	15
5. OBJETIVO	15
6. OBJETIVOS PARTICULARES	15
7. MATERIAL Y MÉTODOS	16
7.1 Determinación de la actividad aglutinante de WGA	17
7.2 Obtención de suspensión enriquecida de neutrófilos bovinos	17
7.3 Activación de neutrófilos de sangre periférica con WGA	18
7.4 Obtención de proteínas de neutrófilos de bovino	18
7.5 Determinación de la concentración de proteínas	18
7.6 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida	18
7.7 Inmunoelectrotransferencia	19
7.8 Inmunodetección de proteínas en membrana	19
7.9 Inmunofluorescencia	20
7.10 Electroforesis en dos dimensiones	21

7.11 Identificación de proteínas por espectrometría de masas	21
8. RESULTADOS	23
9. DISCUSIÓN	34
10. CONCLUSIÓN	42
11. PERSPECTIVAS	42
12. BIBLIOGRAFÍA	43

## ABREVIATURAS

- ACD** Amortiguador de citratos, dextrosa
- Asn** Asparagina
- BCA** Del inglés, Bincichoninic Acid. Ácido bicinconínico
- BSA** Del inglés, Bovine Serum Albumin. Albúmina sérica bovina
- CID** Del inglés, Collision Induced Dissociation. Disociación inducida por colisión
- Con A** Concanavalina A
- CTD110.6** Anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgM, para detectar Ser-O-GlcNAc y Thr-O-GlcNAc
- CR3** Receptor de moléculas de complemento
- CXCR1** Receptor para IL-8
- CXCR2** Receptor para IL-8, beta
- DTT** Ditioneitol
- ESI** Del inglés, Electrospray Ionization. Fuente de ionización tipo nano-electrospray
- FPR** Del inglés, Formyl Peptide Receptor. Receptor de péptidos formilados
- GalNAc** N-acetilgalactosamina
- G-CSF** Del inglés, Granulocyte Colony Stimulating Factor. Factor estimulante de colonias de granulocitos
- GFAT** Glutamina fructuosa-6-fosfato aminotransferasa
- GlcNAc**  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina
- GM-CSF** Del inglés, Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor. Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos
- HCD** Del inglés, High Collision Dissociation. Disociación inducida por colisión de alta energía
- ICAM** Del inglés, Intracellular Cell Adhesion Molecules. Moléculas de adhesión de la superfamilia de la inmunoglobulinas



<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gama
<b>LC-MS</b>	Del inglés, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Cromatografía líquida con espectro de masas
<b>MhA</b>	Adhesina de <i>Mannheimia haemolytica</i>
<b>NeuAc</b>	Ácido siálico
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Del inglés Nuclear Factor- $\kappa$ B. factor nuclear $\kappa$ B
<b>OGT</b>	$\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasa
<b>OGA</b>	O-N-acetilglucosaminasa
<b>OmpA</b>	De inglés, Outer membrane protein A. Proteína de membrana externa A
<b>PBS</b>	Del inglés Phosphate Buffered Saline. Amortiguador fosfatosalino
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>PMSF</b>	Fluoruro de metil-fenil sulfonilo
<b>PMA</b>	Del inglés, Phorbol Myristate Acetate. Acetato de forbol miristato
<b>Pro</b>	Prolina
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>RL2</b>	Anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG, para detectar O-GlcNAc
<b>ROS</b>	Del inglés, Reactive Oxygen Species. Especies reactivas de oxígeno.
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>Ser</b>	Serina
<b>TBS</b>	Amortiguador Tris-salino
<b>Tbp1</b>	Proteína de unión a transferrina 1
<b>Tbp2</b>	Proteína de unión a transferrina 2

- TCR** Del inglés, T cell Receptor. Receptor de linfocitos T
- Thr** Treonina
- TNF- $\alpha$**  Del inglés, Tumor Necrosis Factor-alfa. Factor de necrosis tumoral alfa
- UDP-GlcNAc** Uridin bifosfato N-acetilglucosamina
- Val** Valina
- WGA** Del inglés, Wheat Germen Agglutinin. Lectina de germen de trigo
- WGA-FITC** Lectina de germen de trigo acoplada a isotiocianato de fluoresceína

## 1. RESUMEN

La presencia de carbohidratos asociados a lípidos o proteínas en la membrana celular es necesaria para la identificación de blancos específicos, las moléculas con contenidos de carbohidratos son susceptibles de sufrir modificaciones en procesos de activación, migración o diferenciación celular, lo que sugiere la movilización de receptores presentes en gránulos como respuesta a estímulos específicos. La estimulación de neutrófilos con lectinas específicas por N-acetilglucosamina (GlcNAc) como la heveína, la lectina de germen de trigo (WGA) o la adhesina de *Mannheimia haemolytica* (MhA) favorece la generación de especies reactivas de oxígeno lo que sugiere la participación de receptores que poseen GlcNAc. La O-GlcNAcilación de proteínas, es una modificación postraduccional dinámica en la que se agrega o elimina un sólo residuo GlcNAc a serinas y treoninas.

En este trabajo se evaluó el efecto de la activación con la lectina WGA en la O-GlcNAcilación de neutrófilos bovinos por ser las células blanco de interacciones lectina-receptor en infecciones bacterianas. Se activaron neutrófilos bovinos con 25 µg/mL de WGA como dosis óptima, se identificó por inmunoelectrotransferencia con anticuerpos específicos, la expresión de β-N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT) y O-N-acetilglucosaminasa (OGA). Los resultados demuestran que a los 15 y 25 min de activación hay un incremento significativo en la expresión de OGT, la OGA no mostró una tendencia clara en su detección. Por inmunofluorescencia se observó que la WGA-FITC reconoce más fuertemente a los neutrófilos a los 25 min de activación, se realizaron inmunofluorescencias con el anticuerpo RL2 (específico para O-GlcNAcilación) para confirmar si las proteínas reconocidas estaban O-GlcNAcizadas, a tiempos iguales en los que se observó incremento de la expresión de OGT. Se analizaron por electroforesis bidimensional los perfiles proteicos a 15 y 25 min para identificar modificaciones en los perfiles generados por la estimulación con WGA. Los resultados obtenidos sugerimos que la activación de neutrófilos bovinos genera, incremento en los niveles de proteínas O-GlcNAcizadas y en la expresión de la OGT.

## 2. MARCO TEORICO

Generalidades

### 2.1 Neutrófilos

El sistema inmune es un sistema de defensa muy versátil que ha evolucionado para proteger al organismo de agentes extraños; es capaz de generar una gran variedad de células y moléculas que reconocen específicamente y eliminan una cantidad ilimitada de invasores ya que actúan en conjunto en una red dinámica altamente compleja. Las funciones del sistema inmune pueden dividirse en reconocimiento, respuesta y eliminación de agentes extraños. Una vez que un patógeno extracelular ha sido reconocido, el sistema recluta gran variedad de células de acción inmediata entre los que destacan los neutrófilos por ser los primeros y en mayor cantidad reclutados al sitio de infección (Kindt *et al.*, 2007; Mantovani *et al.*, 2011).

Los neutrófilos son producidos en la médula ósea, donde pasan por diferentes etapas de maduración como respuesta a citocinas, como el G-CSF y el GM-CSF, posteriormente, migran a la circulación, donde constituyen el más abundante leucocito en sangre; morfológicamente se caracterizan por tener un núcleo multilobulado y una gran cantidad de gránulos en su citoplasma, mientras que funcionalmente poseen una gran capacidad fagocítica, la capacidad de desgranular enzimas preformadas y la producción de especies reactivas de oxígeno (Mantovani *et al.*, 2011; Jaillon *et al.*, 2013; Seely *et al.*, 2003).

Existen, al menos cuatro diferentes tipos de gránulos: los primarios, también llamados azurófilos, son los que almacenan mediadores tóxicos como la elastasa, la mieloperoxidasa, catepsinas y defensinas; los secundarios o específicos contienen principalmente lactoferrina. Los terciarios contienen gelatinasa B y por último las vesículas secretorias contienen principalmente albúmina sérica. El orden

de desgranulación es: vesículas secretorias, gránulos terciarios, gránulos secundarios y por último los gránulos primarios (Lacy, 2006).

La desgranulación está acoplada a mecanismos que involucran la interacción de un receptor con su ligando, se lleva a cabo en cuatro pasos que involucran el reclutamiento del gránulo del citoplasma a la membrana blanco seguido de la unión de la vesícula, que permite el contacto de las membranas para que se lleve a cabo una fusión correcta, la formación de un poro entre el gránulo y la membrana blanco, y finalmente la expansión de éste poro para liberar el contenido del gránulo (Lacy, 2006).

El reclutamiento de neutrófilos a sitios de infección está influenciado por moléculas quimiotácticas, como la IL-8, el IFN- $\gamma$  y la proteína de complemento C5a, por un proceso llamado extravasación (Figura 1); algunos mediadores de la inflamación como TNF- $\alpha$  y la IL-1 actúan sobre las células endoteliales de los vasos locales induciendo la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E y la selectina-P para favorecer el rodamiento de los neutrófilos a lo largo del endotelio, evitando que las células no sean barridas por el flujo sanguíneo. Mientras se lleva a cabo el rodamiento de los neutrófilos por el endotelio, la IL-8 se une a los receptores CXCR1 y el CXCR2, presentes en la membrana de los neutrófilos, provocando una activación que induce un cambio conformacional en las integrinas de la membrana del neutrófilo, incrementando la afinidad por las ICAMs presentes en el endotelio para estabilizar una adhesión más firme del neutrófilo al endotelio, necesaria para la diapédesis y la migración a través de las uniones intercelulares hacia el tejido. Una vez que los neutrófilos llegan al sitio de inflamación emplean diferentes estrategias para combatir a los microorganismos, como la fagocitosis, estallido respiratorio, la desgranulación de agentes microbicidas, la secreción de citocinas o la generación de redes extracelulares (Seely *et al.*, 2003; Pruchniak *et al.*, 2013; Croker *et al.*, 2012; Mantovani *et al.*, 2011; Jaillon *et al.*, 2013; Kienle y Lämmermann, 2016).

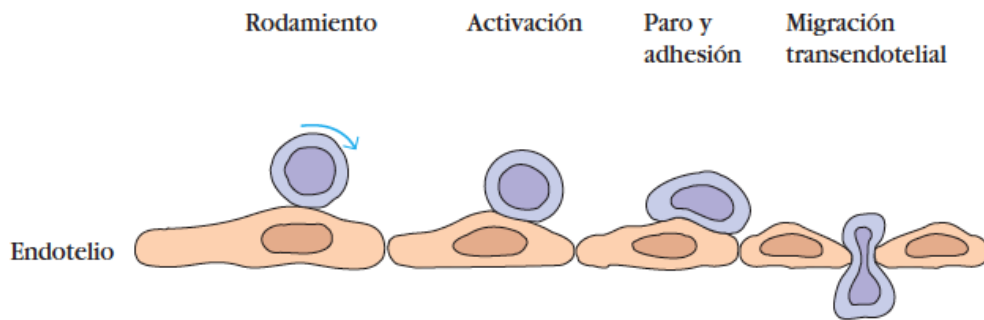


Figura 1: Proceso de extravasación celular. Modificada de Kindt *et al.* (2007).

## 2.2 Glicosilación

Los procesos de glicosilación en moléculas como proteínas y lípidos son importantes en el ensamble de órganos y organismos multicelulares que requieren la interacción entre células y la matriz que los rodea. Todas las células y gran cantidad de macromoléculas en la naturaleza tienen unido covalentemente un azúcar o una cadena de ellos. Éstos azúcares pueden estar presentes en la superficie celular, en las moléculas que se secretan o en moléculas con funciones al interior de la célula por lo que pueden mediar una gran variedad de eventos celulares involucrados en el desarrollo y función de un organismo multicelular. La adhesión es un proceso esencial en los eventos celulares en el que están involucrados los carbohidratos presentes en las células blanco que funcionan como ligandos específicos de proteínas llamadas lectinas. El proceso enzimático por el que se generan enlaces entre carbohidratos y proteínas o lípidos se denomina glicosilación. La glicosilación es una modificación post-traducciona con la que se incrementa la diversidad funcional del proteoma; además de la glicosilación existen otras modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, metilación, acetilación, ubiquitinación, nitración y adición de lípidos (Weber *et al.*, 2014; Varki *et al.*, 2009).

La adición de mono u oligosacáridos a proteínas está influenciada por la localización de éstas en la célula, su movimiento y su adecuado plegamiento.

Debido a la gran diversidad de organización que pueden presentar los carbohidratos son importantes acarreadores de información, además de estar involucrados en un amplio rango de procesos como la maduración y recambio de las proteínas, la adhesión celular, el tráfico intracelular, la señalización intracelular, la interacción huésped-patógeno o en la respuesta inmune debido a la unión y activación de receptores específicos (Marth y Grewal, 2008; Mariño *et al.*, 2010).

Existen diferentes tipos de glicosilación, las más abundantes son la N- y la O-glicosilación que se llevan a cabo en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Los sitios de N-glicosilación pueden predecirse debido a que existe una secuencia consenso Asn-Xaa-Ser/Thr, en la cual el aminoácido Xaa puede ser cualquiera, excepto prolina. Una vez que el péptido entra al retículo endoplásmico se le transfiere un bloque de azúcares al grupo amino del aminoácido Asn, que posteriormente será modificado. En la O-glicosilación se agregan azúcares al grupo OH- de Ser o Thr, los más comunes son GalNAc, GlcNAc, xilosa, manosa y fucosa posteriormente la cadena puede elongarse para formar estructuras complejas pero a diferencia de los N-glicanos éste proceso es secuencial y se agregan uno a uno monosacáridos a la cadena; para que se produzca la glicosilación es necesario que se expresen grupos enzimáticos como las glicosiltransferasas y las glicosidasas. La formación y ruptura de los glicanos está regulado a varios niveles celulares como por ejemplo la transcripción de genes que codifican las enzimas involucradas (Marth y Grewal, 2008).

### **2.3 O-GlcNAcilación**

La O-GlcNAcilación es la modificación post-traducciona dinámica que involucra la unión del monosacárido GlcNAc mediante un enlace  $\beta$ -glucosídico a la Ser o Thr de una cadena polipeptídica; se lleva a cabo principalmente en proteínas nucleares pero puede llevarse a cabo en citoplasmáticas y mitocondriales. Los niveles de esta modificación varían en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, estrés celular, estímulos extracelulares, la progresión del ciclo celular y durante el

desarrollo celular, por lo que funciona como sensor de nutrientes y condiciones en el medio (Golks y Guerini, 2008; Hart, 2014).

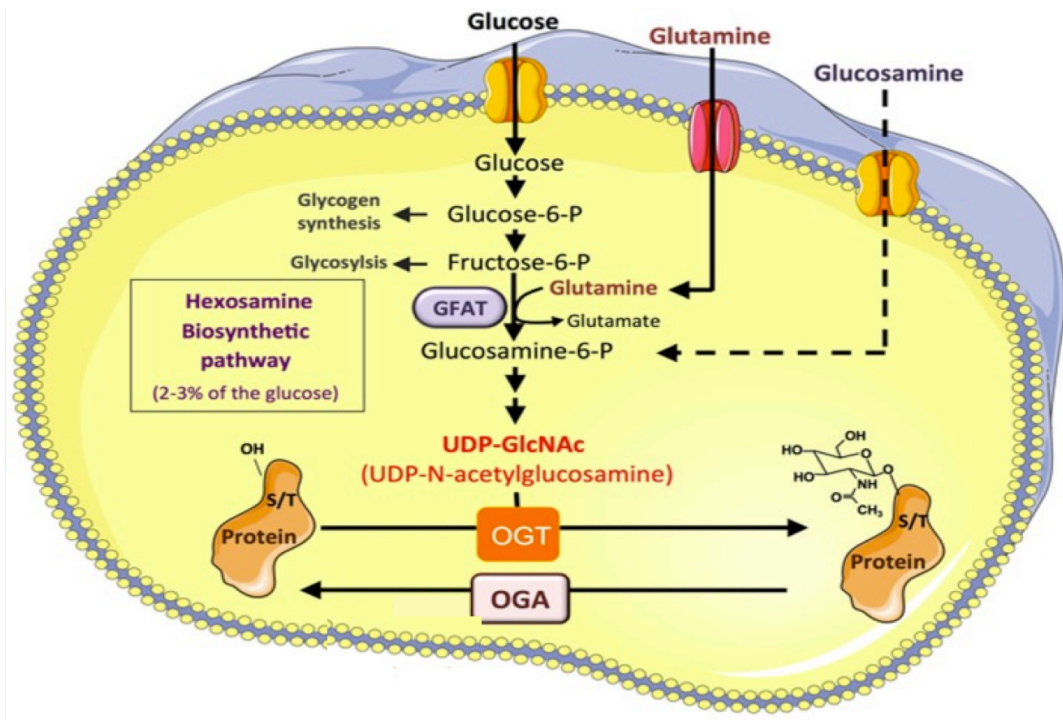


Figura 2. Vía de biosíntesis de las hexosaminas. Generación de UDP-GlcNAc a partir de glucosa y su participación en la O-GlcNAcilación. Modificada de Baudoin e Issad (2015).

Del 2 al 3% de la glucosa intracelular entra a la HBP que tiene como producto final el UDP-GlcNAc que es la molécula donadora del azúcar necesario para llevar a cabo esta modificación (Figura 2). Una vez que la glucosa ingresa a la célula es fosforilada por la hexocinasa convirtiéndola en glucosa-6-fosfato que es transformada por la fosfoglucoisomerasa a fructuosa-6-fosfato, que ingresa a la HBP y en conjunto con glutamina, son el sustrato de la enzima GFAT para generar, glucosamina 6-fosfato y posteriormente N-acetilglucosamina-6-fosfato por la enzima glucosamina-6-fosfato N-acetil transferasa y acetil-CoA. Posteriormente la fosfoacetil glucosamina mutasa teniendo como sustrato N-acetilglucosamina-6-fosfato, genera N-acetilglucosamina-1-fosfato que es transformado finalmente por la UDP N-acetilglucosamina pirofosforilasa a UDP-GlcNAc (Hart, 2014).



Una vez disponible, el UDP-GlcNAc es empleado como sustrato de la OGT para adicionar el azúcar al grupo hidroxilo del aminoácido, mientras que la enzima encargada de remover el azúcar es la OGA. En conjunto éstas enzimas hacen que esta modificación sea cíclica y modulan los niveles de O-GlcNAcilación en respuesta a vías de señalización, incluyendo el estado metabólico y el estrés externo (Comer *et al.*, 2001; Isono, 2011; Santoyo-Ramos, *et al.*, 2012; Janetzko y Walker, 2014).

La O-GlcNAcilación afecta proteínas involucradas en metabolismo, apoptosis, biogénesis de organelos, entre otras, influye en diversas funciones, como localización, estabilidad, interacción con otras proteínas y su actividad; aproximadamente el 25% de las proteínas que sufren esta modificación post-traducciona están involucradas en la regulación del proceso de transcripción así como en señalización y remodelación de cromatina. Debido a que GlcNAc, es un derivado directo de la glucosa, los niveles de ésta modificación están íntimamente relacionados con el flujo de glucosa, Acetil-CoA y UDP-GlcNAc sin embargo, recientemente se ha observado que la célula modifica rápidamente sus niveles de O-GlcNAcilación en respuesta a estímulos estresantes sugiriendo que esta modificación pos-traducciona juega un papel protector contra el estrés y la muerte celular (Yang y Suh, 2014; Hart, 2014; Bond y Hanover, 2015).

#### **2.4 Relación de la O-GlcNAcilación y la fosforilación**

La O-GlcNAcilación puede ser considerada como análoga a la fosforilación puesto que la modificación por GlcNAc tiene un papel clave en la regulación de la actividad de las proteínas, además se ha evidenciado que puede promover una transducción de señales mediadas por receptores que reciben estímulos extracelulares. La interacción de éstas dos modificaciones también se ha puesto en evidencia por la competencia de sitios de Ser/Thr, ya que algunas proteínas pueden estar modificadas por el azúcar o el fosfato bajo condiciones diferentes, en

otras proteínas se da la competencia por sitios próximos pero no por el mismo residuo, mientras que en otros casos ambas modificaciones pueden realizarse simultáneamente en la misma proteína pero en sitios alejados (Hart *et al.*, 2007; Golks y Guerini, 2008; Hart *et al.*, 2011; Brister *et al.*, 2014).

## **2.5 La $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT)**

El genoma de los mamíferos contiene un solo gen que codifica la proteína OGT, sin embargo, el RNA mensajero sufre procesamiento alternativo generando tres isoformas de esta proteína, la núcleo-citoplasmática con un peso molecular de 110 kDa, la mitocondrial de 103 kDa y la corta de 75 kDa (Kim *et al.*, 2014; Nagel y Ball, 2014).

La OGT es una proteína bifuncional que tiene un dominio catalítico en el extremo carboxilo terminal de glicosiltransferasa compartido en todas las isoformas y un dominio de interacción proteína-proteína en el amino terminal, involucrado en el reconocimiento del sustrato (Janetzko y Walker, 2014).

Su especificidad es sensible a la concentración del sustrato donador; además la OGT es sensible a la insulina, nutrientes y el estrés celular por lo que la O-GlcNAcilación funciona como modulador en la señalización y regulación de las vías de transcripción en respuesta a nutrientes y estrés. Aunque no se ha descrito una secuencia consenso, varios estudios han demostrado un enriquecimiento moderado de eventos de modificación de O-GlcNAcilación en secuencias Pro/Val-Pro/Val-Val-Ser/Thr-Ser/Thr, la presencia de Pro y aminoácidos ramificados promueve el contacto entre la enzima y la cadena polipeptídica (Hart *et al.*, 2011; Nagel y Ball, 2014).

## **2.6 La O-N-acetilglucosaminasa (OGA)**

La OGA es una hexosaminidasa monomérica con peso molecular aproximado de 130 kDa; esta enzima corta el enlace  $\beta$ -glicosídico que une la proteína de los residuos de GlcNAc, preferentemente a pH neutro lo que la distingue de otras hexosaminidasas que son funcionales a pH ácido y están presentes en lisosomas mientras que la OGA está distribuida en núcleo y citoplasma; es una enzima ubicua, sin embargo, es más abundante en ciertos tejidos como cerebro, páncreas y músculo esquelético. La OGA contiene en su extremo N-terminal un dominio de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa y en el carboxilo terminal una secuencia de aminoácidos que comparte homología con acetiltransferasas (Nagel y Ball, 2014; Alonso *et al.*, 2014).

## **2.7 La O-GlcNAcilación y el sistema inmune**

La estimulación de linfocitos con agentes mitógenicos como PMA y ConA provoca un incremento en la O-GlcNAcilación principalmente de las proteínas nucleares; posteriormente en éstas mismas células se describió que factores como NF- $\kappa$ B sufren esta modificación que es necesaria para lograr una correcta activación celular; más adelante se sugirió que la O-GlcNAcilación del factor NFAT en células T es controlado por una cascada de señalización específica posterior a la estimulación del TCR, lo que implica que las variaciones en los niveles de la glicosilación están relacionados con los niveles de glucosa y UDP-GlcNAc así como con vías de señalización desencadenadas por estímulo de receptores en la membrana celular (Kearse y Hart, 1991; Golks y Guerini, 2008; Marth y Grewal, 2008; Hart y Akimoto, 2009; Lozano *et al.*, 2014).

En modelos con neutrófilos humanos, se observó que la estimulación de receptores que favorecen la quimiotaxis, con péptidos formilados, incrementa la O-GlcNAcilación de proteínas evento que se correlaciona con un incremento en la

movilidad de los neutrófilos (Kneass y Marchase, 2004, 2005; Golks y Guerini, 2008).

## **2.8 Detección de O-GlcNAcilación**

La detección de esta modificación post-traducciona es limitada ya que es difícil observarla por métodos convencionales como electroforesis, cromatografía líquida o métodos espectrométricos, aunado a esto, la modificación es rápidamente hidrolizada por hexosaminidasas celulares, cuando se detecta un daño a la célula o durante el aislamiento de proteínas. Algunas de las herramientas que se emplean para identificarla son anticuerpos específicos o la WGA, ya que se une a proteínas con residuos GlcNAc, sin embargo, uno de los inconvenientes que tiene esta lectina es su afinidad por NeuAc. Entre los anticuerpos que existen para la detección de la modificación, se encuentra el anticuerpo monoclonal RL2, de clase IgG1, inicialmente generado para la detección de proteínas de poro nuclear, pero dado que estas proteínas presentaban ésta glicosilación y el principal epítipo reconocido es GlcNAc, se utilizaron para la detección de la glicosilación. Por lo que respecta al anticuerpo monoclonal de clase IgM, CTD110.6, este reconoce específicamente la unión  $\beta$ -glicosídica del azúcar GlcNAc a Ser o Thr (Snow *et al.*, 1987; Hart *et al.*, 2011; Comer *et al.*, 2001).

## **2.9 Las lectinas como herramientas para identificar carbohidratos en modelos celulares**

Las lectinas son proteínas que reconocen de manera específica ciertos carbohidratos en la superficie celular, tienen al menos un sitio de reconocimiento, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden presentar actividades biológicas diversas como activación celular, aglutinación, estimulación mitogénica, favorecer la fagocitosis, inhibición de la migración celular así como permitir la identificación de células blanco por agentes patógenos (Hernández-Cruz *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2014).

Las lectinas han sido ampliamente utilizadas para el reconocimiento de glicoproteínas y/o como estímulo celular en la membrana plasmática para evaluar la respuesta en diferentes tipos celulares, por ejemplo la PHA y Con A inducen la proliferación de linfocitos por estimulación del receptor de células T; otras lectinas como heveína, WGA y MhA, son potentes activadores del estallido respiratorio en neutrófilos (Jaramillo *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2001; Hernández-Cruz *et al.*, 2005; De la Mora *et al.*, 2006; Solórzano *et al.*, 2006).

Existen lectinas, con especificidad por residuos GlcNAc, involucradas en procesos patológicos; entre las que se encuentran las lectinas presentes en el extremo de las fimbrias de bacterias como *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotóxica que favorecen la unión y colonización de las microvellosidades del epitelio intestinal. La heveína, uno de los principales alérgenos del látex, es reconocida por los anticuerpos de clase IgE presentes en suero de individuos alérgicos, además que la lectina tiene un especial reconocimiento por neutrófilos y monocitos. La bacteria *Mannheimia haemolytica*, el principal agente causal de la fiebre de embarque, posee una adhesina que reconoce neutrófilos bovinos, lo que desencadena estallido respiratorio; además, se relaciona con la colonización del tracto respiratorio superior (Jaramillo *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2001; Buts *et al.*, 2003; De la Mora *et al.*, 2006; Matson *et al.*, 2007).

La WGA es una proteína dimérica de 38 kDa que se encuentra en grandes cantidades en la semilla del trigo, contiene cuatro dominios heveína con una especificidad por residuos GlcNAc y en menor grado por NeuAc que le permiten aglutinar células. Ésta lectina tiene la capacidad de reconocer receptores glicosilados como el receptor de péptidos formilados, el receptor de complemento (CR3), el receptor del GM-CSF y el receptor de la IL-8 (CXCR1) presentes en la membrana de neutrófilos. Estudios previos han evidenciado los efectos de la lectina en dichas células entre los que se encuentran: inducción del estallido respiratorio con incremento en el consumo de oxígeno, generación de especies reactivas de oxígeno, movilización y secreción de gránulos así como la inhibición

de movimientos quimiotácticos (Malech *et al.*, 1985; Christiansen *et al.*, 1988; Grob *et al.*, 1990; Karlsson, 1999; Solórzano *et al.*, 2006).

## **2.10 Fiebre de embarque**

*Mannheimia haemolytica* es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, no formadora de esporas, de forma cocobacilar, mesofílica, aeróbica y anaeróbica facultativa, que puede fermentar glucosa y otros carbohidratos, produciendo ácido pero no gas; es el principal agente causal de enfermedades respiratorias en bovinos y ovinos como la manheimiosis neumónica o fiebre de embarque que afecta principalmente al ganado de engorda joven (Boyce *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2008)

Existen diversos factores que contribuyen a la virulencia de *M. haemolytica* entre los cuales se incluye el lipopolisacárido, que induce la respuesta inflamatoria así como el reclutamiento y estimulación de células polimorfonucleares para promover la producción de mayor cantidad de citocinas pro-inflamatorias, activación de complemento y lisis celular, que contribuyen a la formación de lesiones pulmonares. Las proteínas de membrana externa, que actúan como agentes quimiotácticos para neutrófilos facilitando la unión específica a receptores presentes en el tracto respiratorio superior como la OmpA. Otras proteínas como las Tbp1 y Tbp2, que participan en la adquisición de hierro para permitir la proliferación bacteriana. Cuenta además con enzimas, por ejemplo, la neuraminidasa, que al modificar la superficie de la mucosa epitelial del hospedero, por remoción de residuos de NeuAc, puede mejorar la adhesión bacteriana. Se ha identificado una leucotoxina con actividad específica sobre macrófagos alveolares y leucocitos de rumiantes; los efectos son dosis dependientes y pueden tener varias respuestas; desde inducir apoptosis, liberación de citocinas proinflamatorias, radicales libres de oxígeno y proteasas, hasta promover lisis celular por la formación de poros en la membrana plasmática provocando necrosis entre otras. La presencia de adhesinas, permite la colonización inicial así como

resistencia a la eliminación física por el flujo de aire (Boyce *et al.*, 2004; du Preez *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2008; Confer, 2009; Singh *et al.*, 2011; Stellari *et al.*, 2014).

La familia *Pasteurellaceae* cuenta con varias especies bacterianas que son comensales de mucosas en mamíferos, sin embargo, algunos de éstos bajo ciertas condiciones pueden convertirse en patógenos oportunistas y ocasionar enfermedades, entre los miembros de esta familia se han descrito gran variedad de interacciones adhesina-receptor, en algunas de ellas hay participación de organelos específicos o de proteínas de membrana externa, lo que sugiere la participación de la glicosilación en etapas de activación o diferenciación celular en las que participa el reconocimiento específico a carbohidratos de la membrana de las células del hospedero (Srikumaran *et al.*, 2007; Jaramillo-Arango *et al.*, 2009; Kisiela y Czuprynski, 2009).

En *M. haemolytica* se ha descrito una adhesina de 68 kDa, que está involucrada en la colonización de mucosas, Jaramillo *et al.* (2000), demostraron que la bacteria tiene la capacidad de adherirse a células epiteliales de la tráquea de bovinos sanos y que esta interacción puede ser inhibida por GlcNAc y NeuAc, así como por la adhesina pura, mientras que la interacción de ésta adhesina con neutrófilos, esta mediada por el reconocimiento específico de receptores glicosilados en la superficie celular que contienen residuos GlcNAc. De la Mora *et al.*, (2006) demostraron que MhA reconoce a monocitos en un 5% y a neutrófilos en un 90%; en éstos últimos es capaz de inducir estallido respiratorio, que *in vivo* provoca procesos pro-inflamatorios que conducen a un desequilibrio de la respuesta inmune; en el cuadro clínico de la enfermedad se observa una gran infiltración de neutrófilos, alcanzando a las 4 h posterior a la inoculación una relación 10:1 con respecto a macrófagos generando un ambiente inflamatorio que concluye en necrosis del epitelio pulmonar y la subsecuente muerte del organismo infectado (Walker *et al.*, 1985, Jaramillo *et al.*, 2000; De la Mora *et al.*, 2006; De la Mora *et al.*, 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La O-GlcNAcilación es la modificación post-traducciona que agrega un residuo de GlcNAc en Ser/Thr de la cadena peptídica de proteínas en la mayoría de los organismos incluyendo virus, bacterias, plantas y animales. La O-GlcNAcilación es considerada una forma de regulación de la función de proteínas, debido a que es dinámica y se modifica por la acción de morfógenos y estímulos estresantes. En reportes previos de neutrófilos humanos, se ha descrito un aumento en los niveles de proteínas O-GlcNAcizadas tras la estimulación de receptores membranales. Existen lectinas por ejemplo, la adhesina de la bacteria *Mannheimia haemolytica* y lectinas vegetales como la lectina de germen de trigo que interactúan con neutrófilos bovinos y neutrófilos humanos. La interacción se da entre la lectina y residuos de GlcNAc en receptores glicosilados en la membrana celular activando el estallido respiratorio. Los neutrófilos son las primeras células en reclutarse a sitios de inflamación y su activación exacerbada puede generar daño al tejido en procesos infecciosos como la fiebre de embarque. En la literatura hay pocos reportes de la regulación que ejerce la O-GlcNAcilación en las vías de señalización involucradas en la activación de neutrófilos, por ello se consideró relevante llevar a cabo un análisis de esta glicosilación en neutrófilos bovinos.



#### **4. HIPÓTESIS**

La activación de receptores glicosilados en la membrana de neutrófilos bovinos con WGA específica para N-acetilglucosamina desencadena modificaciones en la O-GlcNAcilación.

#### **5. OBJETIVO**

Identificar la participación de la O-GlcNAcilación en la activación de los neutrófilos bovinos.

#### **6. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la expresión de las proteínas,  $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasa y O-N-acetilglucosaminasa posterior al estímulo con WGA.
- Identificar modificaciones en la O-GlcNAcilación en neutrófilos bovinos posterior al estímulo con WGA
- Identificar modificaciones en los perfiles proteicos de los neutrófilos bovinos estimulados con WGA en electroforesis bidimensional.

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

La sangre fue obtenida de bovinos adultos sanos de raza Holstein, del Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), Topilejo, Ciudad de México, donada por el Dr. Francisco Suárez Güemes, del Laboratorio de Brucelosis y Tuberculosis, del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Nacional Autónoma México.

Reactivos: J. T. Baker, PA, USA: NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>3</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>, dextrosa, metanol. Bio-Rad Laboratories Inc., Cal, USA: TRIS-HCl, TRIS base, SDS, urea, tiourea, CHAPS, Precision Plus Protein Dual Color (estándares de peso molecular), agarosa, DTT. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA: glicina, iodoacetamida, aceite mineral, glicerol, azul de bromofenol, Megacell RPMI-1640, GlcNAc, WGA, PMSF, azul Coomassie R-250, Tritón X-100, BSA, rojo de Ponceau, Tween 20, poli-L-lisina, colorante de Wright. Thermo Scientific, Rockford, USA: BCA, placas fotográficas CL-Xposure™ Film. GE Healthcare Bio-Sciences, Little Chalfont, UK: IPG buffer (pH 3-10), tiras para isoelectroenfoque con un rango de pH lineal de 3 a 10, suero fetal bovino (Hyclone). Invitrogen, Carlsbad, CA, USA: geles de poliacrilamida NuPAGE Novex 4–12 % Bis-Tris, 1.0 mm, IPG well y de 12 pozos, NuPAGE MES SDS. Millipore, Billerica, MA, USA: Immobilon Western, Zip Tip C18, PVDF Immobilon-P Membrane; tripsina (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin; Madison, WI, USA), Percoll (Amersham Biosciences, Sweden), Inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania), medio de montaje con DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Cal, USA). Anticuerpos: Santa Cruz Biotechnology, TX, USA: β-Actin (N-21), O-GlcNAc transferase, NCOAT; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA: Policlonal, IgG de conejo, Peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Mouse IgG H+L, Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG H+L. RL2 (abcam, Cambridge, UK), anti-ratón IgG específico para Fab acoplado a biotina (Sigma Immuno Chemical, St. Louis, USA), Alexa fluor 594

(Life Tech, Cal, USA). Equipos. Thermo-Fisher Co., San José, CA, USA: LTQ-Orbitrap Velos, EASY-nLC II, Sorvall ST 8R. Bio-Rad Laboratories Inc., Cal, USA: Mini Protean 3, Trans-Blot SD, Transfer cell, cámara Protean IEF Cell. Espectrofotómetro (Labsystems, Multiskan MS, Finlandia), bandeja de rehidratación (Amersham, Biosciences, Sweden), XCell SureLock™ Mini-Cell Device (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

### **7.1 Determinación de la actividad aglutinante de WGA**

La determinación de la actividad aglutinante de la WGA se realizó por el método de doble dilución seriada empleando eritrocitos de conejo al 2% en PBS pH 7.3 (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM). El título de hemaglutinación se reportó como el inverso de la última dilución con actividad aglutinante. La actividad específica se obtuvo al dividir el título de hemaglutinación entre la concentración de proteínas (en mg/mL). En los experimentos se usaron 25 µg/mL de WGA.

### **7.2 Obtención de suspensión enriquecida de neutrófilos bovinos**

Los neutrófilos de bovino se obtuvieron de sangre venosa de animales clínicamente sanos, se utilizó como anticoagulante ACD, pH 5.0 (Na<sub>3</sub>C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O(COO)<sub>3</sub> 74.8 mM, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 41.6 mM, dextrosa 136 mM). La sangre se homogenizó y se centrifugó 1000xg por 20 minutos a 4 °C. Después el plasma y la mitad superior de la fracción roja se eliminaron. El botón con el resto de los polimorfonucleares se resuspendió en PBS, pH 7.3. Cuando el botón celular estuvo completamente homogenizado se agregó agua milli Q con agitación continua por un minuto para eliminar los eritrocitos por choque osmótico. Posteriormente, se recuperó la isotonicidad de la solución con PBS (NaCl 411 mM, KCl 8.1 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O 30 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6 mM). La suspensión celular se centrifugó a 200xg por 10 min a 4 °C; se descartó el sobrenadante y el botón se suspendió en PBS con 20% de suero fetal bovino. La suspensión celular se colocó sobre una solución de Percoll de densidad 1.084 g/mL. El Percoll (δ=1.131 g/mL), se diluyó con NaCl 1.5 M, para tener isotonicidad-salina (δ=1.123 g/mL) y

posteriormente con NaCl 0.15 M para tener una densidad de 1.084 g/mL. Se realizó el gradiente de la suspensión celular por centrifugación a 440xg, por 40 min a 22°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y las células se suspendieron en medio Megacell RPMI-1640. Las células se contaron en un hemocitómetro y su viabilidad se revisó por exclusión de colorante azul tripán al 0.2%.

### **7.3 Activación de neutrófilos de sangre periférica con WGA**

$3 \times 10^6$  neutrófilos se incubaron en las siguientes condiciones: WGA (25  $\mu\text{g/mL}$ ), WGA (25  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibida con GlcNAc (200 mM) o LPS (5  $\mu\text{g/mL}$ ) a 37 °C, por diferentes tiempos, de 5 hasta 45 min. Al término de la estimulación, únicamente a las células que se estimularon con WGA, se añadió GlcNAc 200 mM, por 5 min para inhibir la actividad del exceso de WGA; en seguida se lavaron dos veces con PBS.

### **7.4 Obtención de proteínas de neutrófilos de bovino**

Los neutrófilos se incubaron en amortiguador de lisis (Inhibidores de proteasas 100  $\mu\text{l/ml}$ , PMSF 4 mM, Tritón X-100 al 1% en PBS) durante 30 min a 4°C en agitación constante. La suspensión resultante se centrifugó a 300xg por 30 min para eliminar los residuos celulares. El sobrenadante se recuperó y se conservó a -20°C hasta su uso.

### **7.5 Determinación de la concentración de proteínas.**

La concentración de proteínas se determinó con un kit comercial de BCA con BSA como estándar. Las muestras se leyeron a 562 nm en un espectrofotómetro.

### **7.6 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida**

Se realizó una electroforesis de las muestras de neutrófilos bovinos en geles de poliacrilamida con gradiente del 4 al 12%. Las muestras se corrieron en una cámara Mini Protean 3 por 40 min, voltaje constante de 200 V y 4 °C en amortiguador de corrida (TRIS-HCl 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS al 0.1%). Cada carril contenía 30  $\mu\text{g}$  de proteína, diluidos 1:2 en amortiguador de carga (TRIS-HCl

75 mM, glicerol al 10%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.001%); se emplearon estándares de peso molecular conocido Precision Plus Protein Dual Color. Una vez que la migración electroforética llegó a su término, se tiñó el gel con azul brillante de Coomassie. El exceso de colorante, se eliminó con solución de metanol al 40% y ácido acético glacial al 10%.

### **7.7 Inmunoelectrotransferencia**

La transferencia de proteínas a membranas de PVDF, se realizó por el método de transferencia semi-seca. El gel y la membrana se incubaron en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 70%, pH 8.3) 1 h a temperatura ambiente; para realizar la corrida se empleo el sistema Trans-Blot SD, Transfer cell a 25 V y 100 mA durante una hora. La eficiencia de la transferencia se corroboró tiñendo las membranas con el colorante rojo de Ponceau, se destiñeron en TBS, pH 7.5 (Tris base 20 mM, NaCl 500 mM), se dejaron secar y se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.

### **7.8 Inmunodetección de proteínas en membrana**

Posterior a la transferencia, la membrana se bloqueo con solución de bloqueo (TBS, BSA 0.25%, Tween 20 al 0.1%) 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. La incubación con los anticuerpos primarios (vease Tabla 1) se llevó a cabo a 4 °C en solución de bloqueo, toda la noche en agitación constante; posteriormente se llevaron a cabo 3 lavados de 15 minutos cada uno con agitación a temperatura ambiente en solución de lavado (TBS, Tween 20 al 0.1%). Al término de los los lavados, se incubó la membrana 1 h a temperatura ambiente en solución de bloqueo con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa en agitación (véase Tabla 1). Al término de la incubación, las membranas se lavaron con solución de lavado 4 veces 15 min cada uno a temperatura ambiente con agitación constante: se reveló con sustrato quimioluminiscente para peroxidasa, Immobilon Western. La quimioluminiscencia emitida se captó en placas fotográficas CL-Xposure™ Film.

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas con sus conjugados correspondientes.

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
RL2, monoclonal, IgG1 de ratón [1 µg/mL]	Acoplado a peroxidasa, AffiniPure conejo Anti-Ratón IgG (H+L), [0.16 µg/mL];
β-Actin (N-21), policlonal, IgG de conejo [0.1 µg/mL]	Acoplado a peroxidasa, AffiniPure cabra Anti-Conejo IgG (H+L), [0.16 µg/mL]
OGT (O-GlcNAc transferasa), policlonal, IgG de conejo [0.2 µg/mL]	
OGA (NCOAT, G-12), policlonal, IgG de conejo [0.2 µg/mL]	

## 7.9 Inmunofluorescencia

Se colocaron 100,000 células por cada condición y se permitió su adhesión a los cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina en cámara húmeda a temperatura ambiente, por 30 min. Las células se estimularon a 37 °C con WGA (25 µg/mL) a diferentes tiempos, en seguida se agregó GlcNAc 200 mM para inhibir la actividad del exceso de WGA. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 6 min y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% por 10 minutos. Los sitios inespecíficos se bloquearon con BSA al 5%. Las laminillas se trataron con WGA acoplada a isotiocianato de fluoresceína (WGA-FITC) [0.7 µg/mL] por 90 min a temperatura ambiente, en oscuridad. En la detección de proteínas O-GlcNAcizadas, las laminillas se incubaron con el anticuerpo de ratón, RL2 (10 µg/mL) 1 h a temperatura ambiente, en seguida con

el anticuerpo anti-ratón IgG específico para Fab acoplado a biotina (20 µg/mL) se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se reveló con streptavidina acoplada a Alexa fluor 594 (1 µg/mL) por incubación de 1 h a temperatura ambiente en cámara oscura. Finalmente se agregó medio de montaje con DAPI.

### **7.10 Electroforesis en dos dimensiones**

Se colocaron 120 µg de proteínas totales de neutrófilos bovinos, en solución de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 50 mM, IPG buffer 0.5%, pH 3-10, azul de bromofenol 0.002%), cbp un volumen total de 125 µL. Las muestras se vertieron en los carriles de la bandeja de rehidratación y a cada una se le colocó una tira de poliacrilamida de 7 cm de longitud, con un rango de pH lineal de 3 a 10; las tiras, se cubrieron con 1 mL de aceite mineral y se hidrataron 16 h a temperatura ambiente. El isoelectroenfoco se realizó en la cámara Protean IEF Cell bajo las siguientes condiciones: paso 1, 250 V, 20 min, con incremento del voltaje lineal; paso 2, 4,000 V, 2 h con voltaje lineal; paso 3, 4,000 V, 10,000 Vh, con incremento de voltaje rápido, con límite de 50 µA por tira. Para la segunda dimensión, las tiras se incubaron por 15 min con 5 mL de solución de equilibrio (Tris-base 50 mM pH 8.8; 6 M urea, glicerol al 30%, SDS al 2%, azul de bromofenol al 0.002%), adicionada con DTT 64.8 mM; posteriormente las tiras se incubaron en solución de equilibrio adicionada con yodoacetamida (135 mM). Cada tira se depositó en el carril correspondiente del gel pre-hecho (NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm, IPG well) y se cubrió con agarosa al 0.5%. La migración electroforética se llevó a cabo a 4 °C con un voltaje constante de 200V por 50 minutos en la cámara XCell SureLock™ Mini-Cell, utilizando NuPAGE MES SDS como amortiguador de corrida y estándares de peso molecular conocido Precision Plus Protein Dual Color.

### **7.11 Identificación de proteínas por espectrometría de masas**

Después de la separación por electroforesis, las fracciones de proteína de interés, se retiraron del gel con bisturí y se sometieron a un proceso de reducción con DTT, alquiladas con iodoacetamida) y digestión con tripsina. En el procesamiento

de la muestra con tripsina se utilizó una solución de reacción de  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ , 50 mM (pH 8.2) e incubó por 18 h a 37 °C.

Los péptidos producidos por el corte enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 y aplicados en un sistema LC-MS compuesto de una bomba de nanoflujo EASY-nLC II acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos con ESI.

La calibración del espectrómetro se realizó con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala y Ultramark 1621) para ajustar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas por transformadas de Fourier en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se incluye para extender la calibración de masas a menores valores de m/z. Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con exactitudes menores a 5 ppm.

En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 10-80% de solvente B (agua/acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico) en 120 min con una columna capilar (ID 0.75  $\mu\text{m}$  y 10 cm largo RP-C18). El flujo del sistema LC fue de 300 nl/min.

La fragmentación de los péptidos se realizó aplicando los métodos de CID y HCD. Todos los espectros se adquirieron en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación se realizó de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas pre-determinadas con un ancho de aislamiento de 3.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 10 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por micro-escaneo. Durante la captura automática de los datos fue utilizado la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 400 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 seg y (iii) tiempo de exclusión de 300 seg.



## 8. RESULTADOS

### Actividad aglutinante

Para verificar la actividad de la lectina WGA se determinó la capacidad aglutinante, una solución de 25 µg/mL tiene una UHA de 12800, que se inhibió con GlcNAc, 200 mM.

### Enriquecimiento de la suspensión de neutrófilos bovinos

El enriquecimiento de la suspensión de neutrófilos bovinos se corroboró llevando a cabo un conteo diferencial de las células teñidas con colorante de Wright (Figura 3). Se obtuvo un 97% de polimorfonucleares totales de los cuales el 95.9% eran neutrófilos (Tabla 2).

Tipo celular	Porcentaje
Neutrófilos	95.9 ± 1.6
Eosinófilos	0.77 ± 1.3
Basófilos	0.3 ± 0.5
Mononucleares	3 ± 0.9

Tabla 2. Conteo diferencial de células, obtenido a partir de la lectura de 100 células de la suspensión obtenida en 7 ensayos independientes.

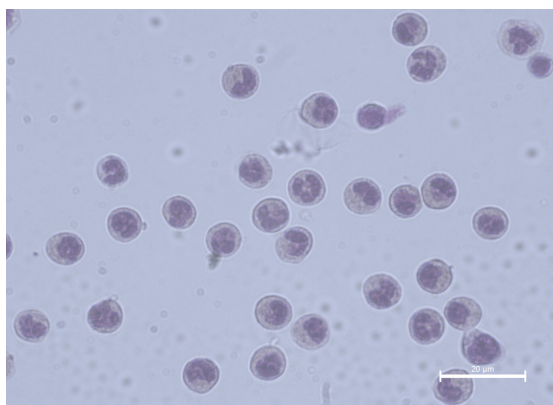


Figura 3. Neutrófilos bovinos obtenidos de sangre periférica, tinción de Wright, 63x. Imagen representativa de 5 tinciones independientes.

### Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó al inicio y al final de la estimulación, al inicio la viabilidad era del 95.5% y a tiempos mayores de 88.2%, se perdió el 7.3% del número inicial de células (Figura 4).

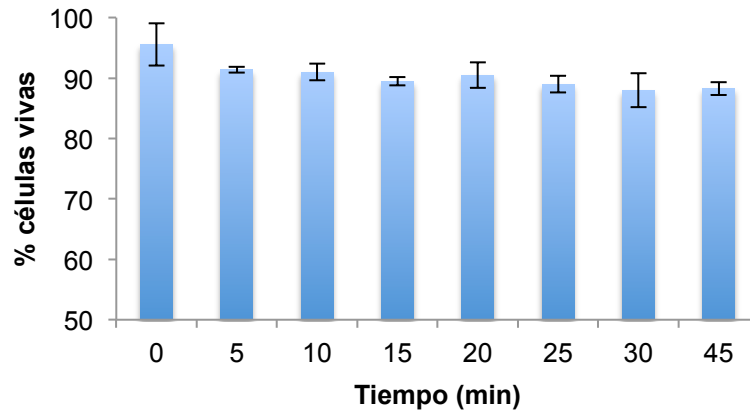


Figura 4. Viabilidad celular de neutrófilos después del estímulo con WGA. Viabilidad determinada con azul tripán de 5 ensayos independientes.

### Análisis electroforético en geles de poliacrilamida

La separación de proteínas totales del extracto de neutrófilos bovinos estimulados, se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes. La migración electroforética en una dimensión (Figura 5), muestra una cantidad homogénea de proteína en todos los carriles y un patrón de bandas similar en los lisados estimulados con WGA, sin importar si estuviera inhibida o no (Figura 5a y b). En los neutrófilos estimulados con LPS se observa variación en las bandas de peso molecular entre 37 y 25 kDa (Figura 5c).

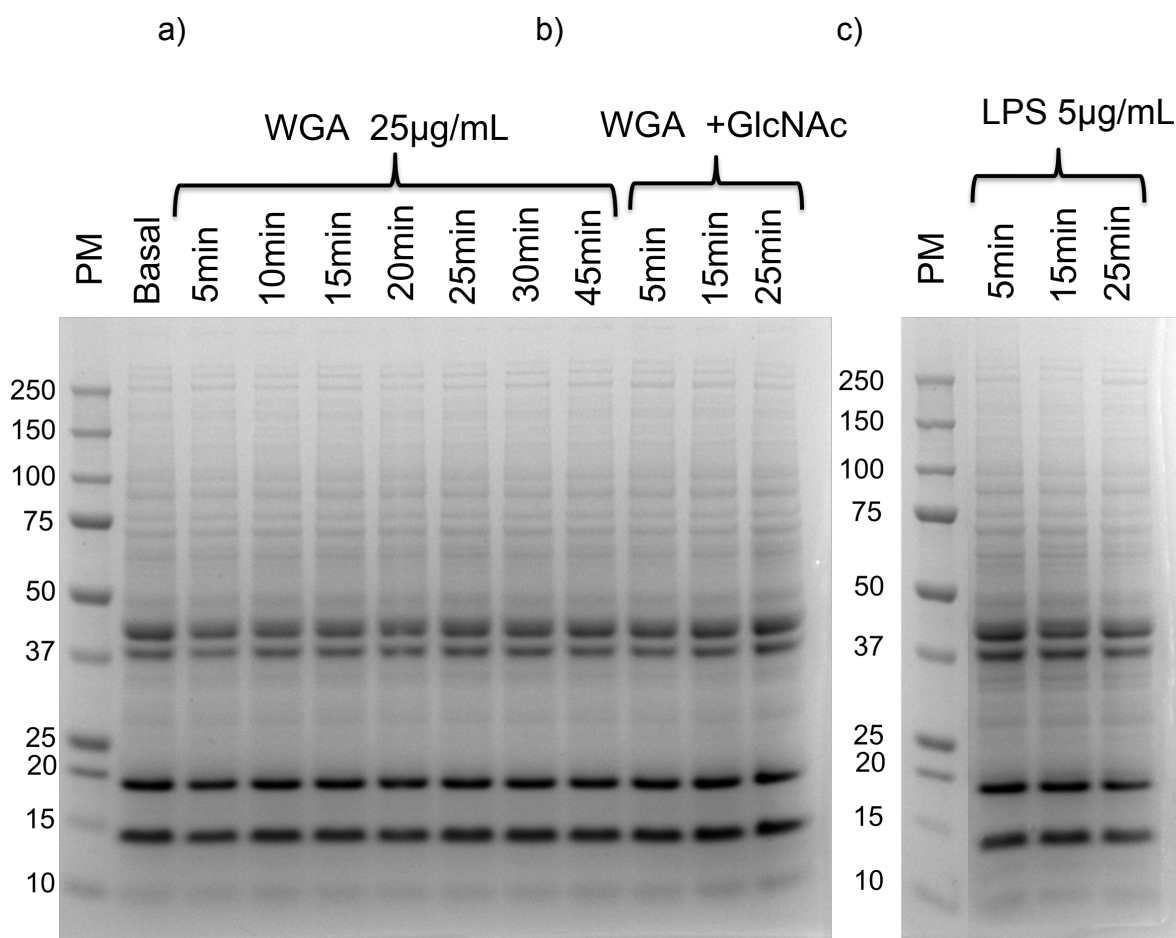


Figura 5. SDS-PAGE de neutrófilos bovinos estimulados con (a) WGA (25 µg/mL); (b) WGA (25 µg/mL) inhibida con GlcNAc (200 mM); (c) LPS (5 µg/mL). Imagen representativa de 7 muestras independientes.

## Inmunodetección de enzimas involucradas en la O-GlcNAcilación.

- Detección de OGT

La detección de la enzima responsable de la adición del azúcar GlcNAc a Ser/Thr en el polipéptido (OGT) se efectuó por medio del reconocimiento del anticuerpo específico en las muestras de neutrófilos bovinos en condiciones basales y estimuladas, los anticuerpos reconocieron una proteína de peso molecular cercano a los 130 kDa (Figura 6a). Los datos de la densitometría obtenidos se normalizaron con los obtenidos de la detección con el anticuerpo anti-actina (Figura 6b), que fue utilizada como control de carga. Los niveles de expresión de OGT aumentan con respecto al tiempo (Figura 6c) observándose un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al basal a los 15 y 25 min de activación.

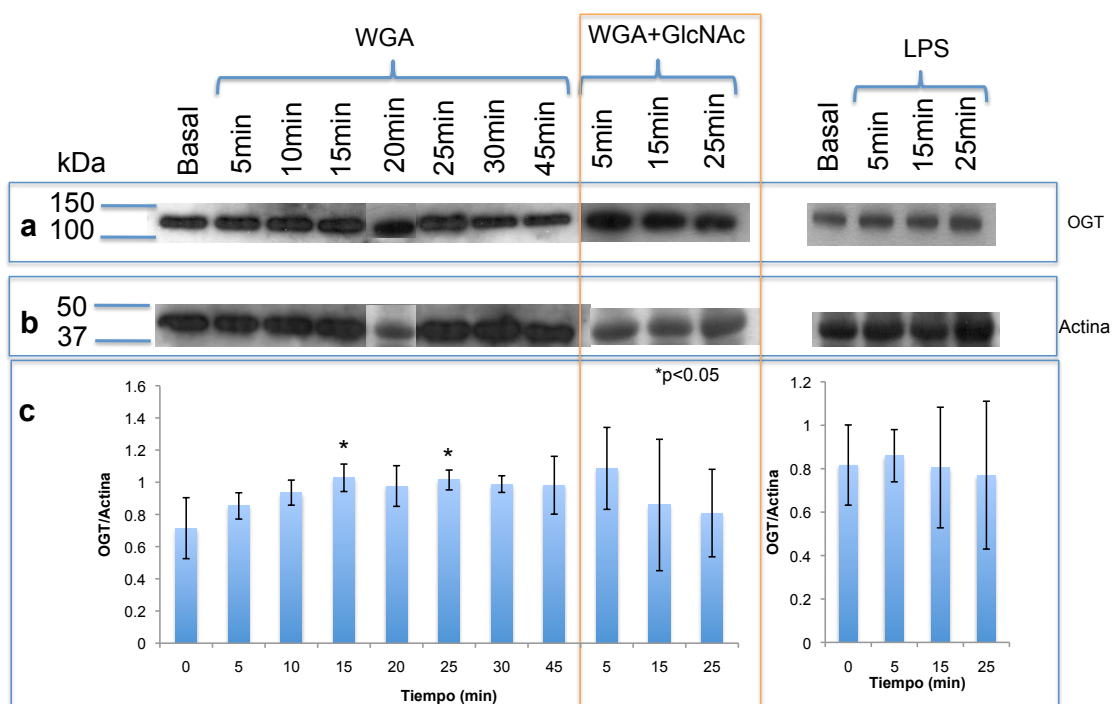


Figura 6. Identificación de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminiltransferasa (OGT) en neutrófilos bovinos. (a). Detección de OGT. (b). Detección de actina como control de carga. (c). La gráfica de densitometría fue llevada a cabo con datos de la inmunodetección de OGT de un triplicado de muestras independientes y normalizados contra actina correspondiente a cada tiempo. El valor de p es resultado de una prueba t de student a dos colas.

- Detección de OGA

La detección de la enzima OGA, que retira GlcNAc, se llevó a cabo por medio del anticuerpo específico para ésta en los lisados de neutrófilos bovinos en condiciones basales y estimuladas. El anticuerpo identificó una banda de 100 kDa (Figura 7a); los datos de la densitometría obtenidos se normalizaron con los obtenidos de la detección con el anticuerpo anti-actina (Figura 7b), que fue utilizada como control de carga. Las densitometrías realizadas tienen una desviación estándar muy amplia, lo que no permitió observar un comportamiento definido en los niveles de expresión de la enzima (Figura 7c).

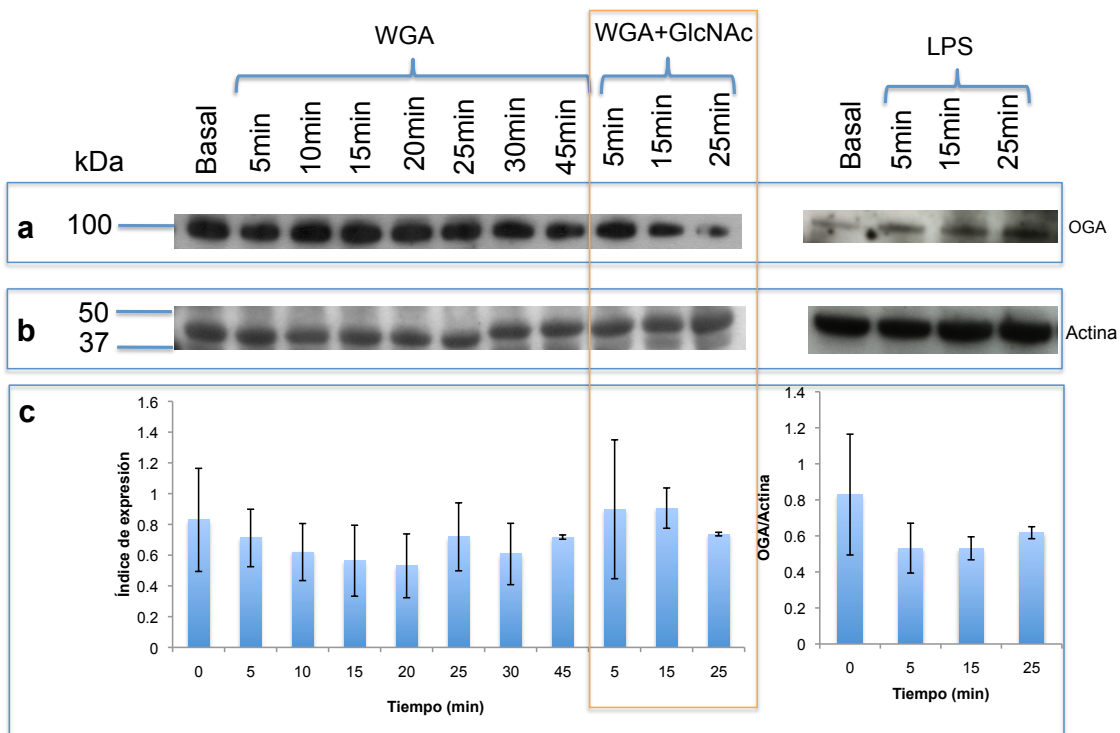


Figura 7. Identificación de la O-N-acetilglucosaminasa (OGA) en neutrófilos bovinos. (a). Detección de OGA. (b). Detección de actina como control de carga. (c). La gráfica de densitometría fue llevada a cabo con datos de la inmunodetección de OGA por triplicado de muestras independientes y normalizados contra la actina correspondiente a cada tiempo.

## Inmunofluorescencia

- Identificación de proteínas con residuos GlcNAc con lectina.

El ensayo se llevó a cabo empleando la WGA-FITC, los controles del ensayo (Figura 8) muestran que no se detectó proteínas con residuos GlcNAc en la membrana de los neutrófilos (Figura 8a), mientras que al interior de las células (Figura 8b), se observa reconocimiento por la WGA-FITC y éste reconocimiento disminuye cuando la WGA-FITC se inhibe con GlcNAc (Figura 8c).

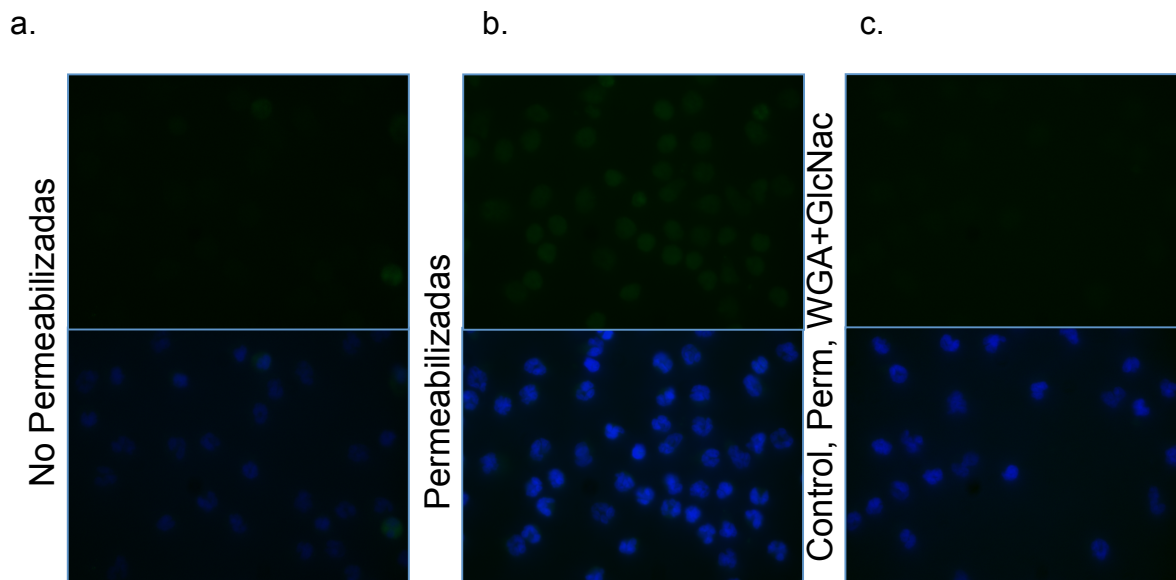


Figura 8. Activación de neutrófilos bovinos marcados con WGA-FITC. Controles. (a). Marcaje de neutrófilos bovinos no permeabilizados en condiciones basales. (b). Marcaje de neutrófilos bovinos permeabilizados en condiciones basales. (c). Marcaje de neutrófilos bovinos con WGA-FITC inhibida con GlcNAc.

Los neutrófilos bovinos se estimularon con WGA a diferentes tiempos y se observó una mayor intensidad en la fluorescencia de las células identificadas por la lectina a los 25 min de estímulo de los neutrófilos (Figura 9).

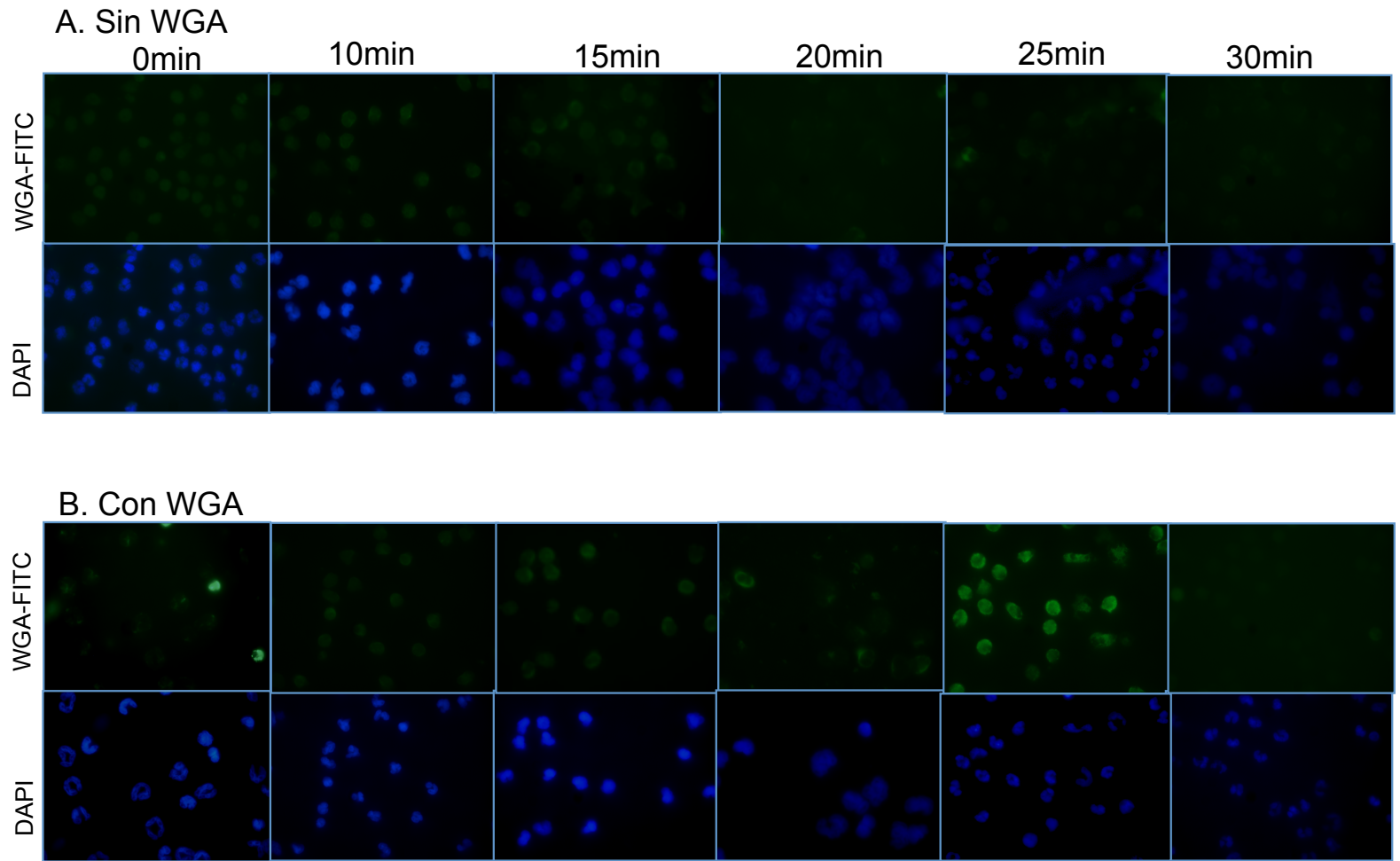


Figura 9. Activación de neutrófilos bovinos marcados con WGA-FITC. A) Marcaje de neutrófilos en condiciones basales, 63x. B) Marcaje de neutrófilos estimulados con WGA (25 µg/mL), 63x. Imágenes representativas de tres ensayos independientes.

- Identificación de proteínas O-GlcNAcizadas

El reconocimiento de proteínas O-GlcNAcizadas se llevó a cabo por medio del anticuerpo monoclonal, RL2 revelado con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (señal observada en rojo); se comparó a los tiempos de 15 y 25 min por ser los tiempos en que se observó diferencia significativa en la detección de la OGT con respecto a la condición basal, así como mayor fluorescencia (25 min) en la detección de proteínas con WGA-FITC. Los resultados obtenidos (Figura 10) muestran que la señal de RL2 se incrementa con respecto al tiempo de estímulo con la WGA siendo a 25 min en el que se tiene mayor señal fluorescente, que indica un incremento en la O-GlcNAcización .

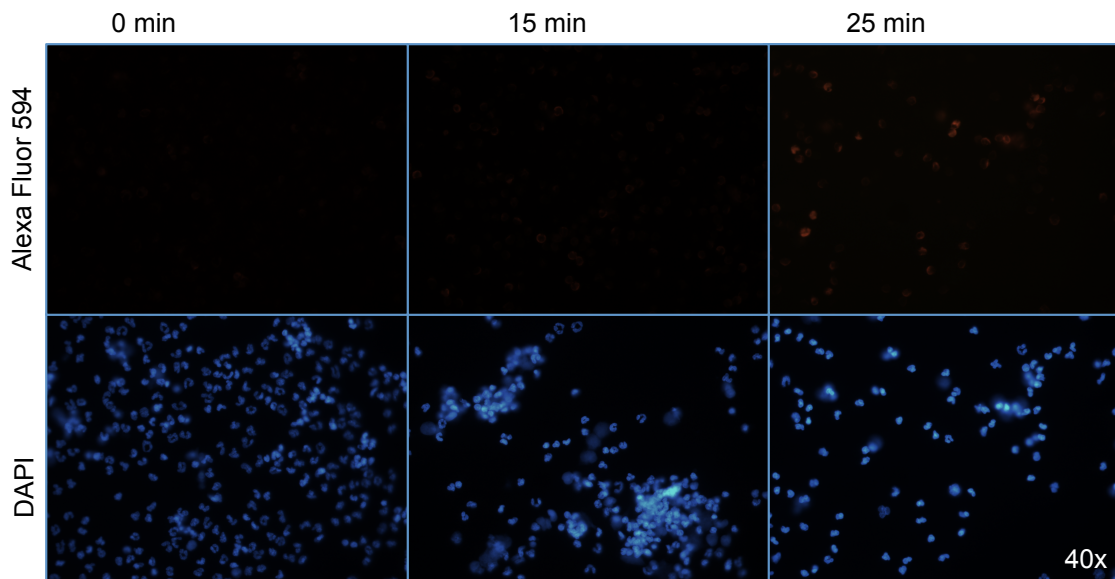


Figura 10. Identificación de proteínas O-GlcNAcizadas de neutrófilos por anticuerpo RL2. Los neutrófilos se estimularon con WGA y se revelaron con el fluorocromo Alexa Fluor 594 (señal en rojo), 40x. Imagen representativa de dos ensayos independientes.



## Electroforesis en una y dos dimensiones de neutrófilos activados.

Se llevó a cabo el análisis en una y dos dimensiones de los lisados celulares de los neutrófilos activados con WGA a los mismos tiempos elegidos para la identificación con RL2 y se compararon con el basal (sin estímulos de WGA). En la separación de proteínas en una dimensión (Figura 11) no se observan modificaciones en el patrón de bandas.

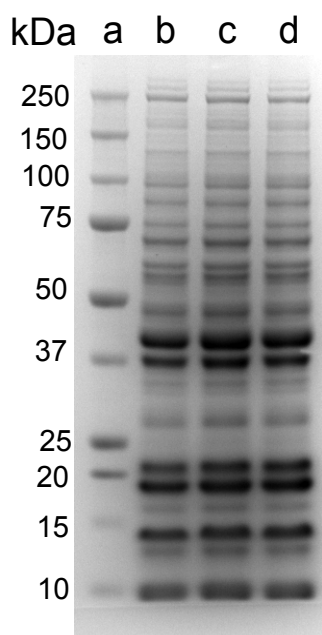


Figura 11. SDS-PAGE de neutrófilos bovinos separados en condiciones desnaturalizantes. Carril a. Estándares de peso molecular Dual Color Standards, Bio-Rad (kDa). Carril b. Condiciones basales. c. Estimulados con WGA durante 15 min. Carril d. Estimulados con WGA durante 25 min. Imagen representativa de tres ensayos de muestras independientes teñidas con azul Coomassie.

En la electroforesis en dos dimensiones (Figura 12) se observó que el lisado en condiciones basales tiene una proteína de 50 kDa (Figura 12a i) mientras que a 15 min de activación, ésta proteína de 50 kDa presenta mayor número de isoformas de pI aproximado de 8.5 (Figura 12b ii); dos proteínas de peso molecular aproximado de 30 kDa (pI, 8.9) y 27 kDa (pI, 8.7) respectivamente (Figura 12a, b iii y iv), están presentes en la muestra a 0 y 15 min pero ausentes en los lisados celulares que estuvieron estimulados con WGA más tiempo (Figura 12c iii y iv). Las tres muestras analizadas muestran una proteína de 20 kDa y pI aproximado, 8.3 respectivamente, presente en condiciones basales (Figura 12a v) mientras que a los 15 min pierde nitidez (Figura 12b v) pero se incrementa en concentración y nitidez a los 25 min (Figura 12c v).

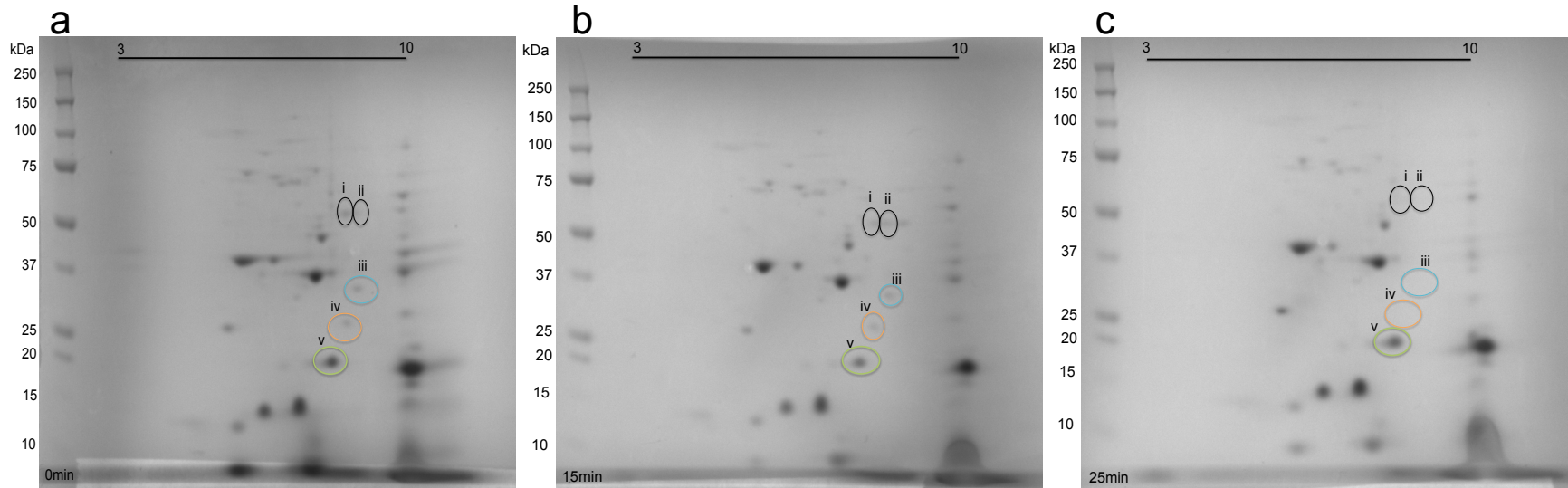


Figura 12. Electroforesis en dos dimensiones de neutrófilos bovinos. a. Condiciones basales. b. Estimulados con WGA durante 15 min. c. Estimulados con WGA durante 25 minutos. Imagen representativa de dos ensayos independientes de muestras con triplicado teñidas con azul Coomassie.

## Secuenciación de proteínas

Las proteínas señaladas de la Figura 12, se secuenciaron arrojando los resultados que se presentan en la siguiente tabla (Tabla 3) donde se muestran los nombres, números de acceso y peso molecular teórico de las proteínas identificadas; así como el peso molecular y punto isoeléctrico estimado obtenido de los mapas proteicos en las electroforesis bidimensionales. El porcentaje de homología que tienen los péptidos de la muestra experimental con la secuencia de aminoácidos reportada en la base de datos de uniprot.org.

Tabla 3. Proteínas secuenciadas a partir del lisado de neutrófilos bovinos separados por electroforesis en dos dimensiones.

Punto	Proteína identificada	Número de acceso	PM teórico (kDa)	PM estimado (kDa)	pl estimado	% de homología
i	Inhibidor de la elastasa de leucocitos	Q1JPB0	42.24	50	8.2	32
ii	Inhibidor de la elastasa de leucocitos	Q1JPB0	42.24	50	8.5	19
iii	L-serina deshidratasa/L-treonina desaminasa	Q0VCW4	34.44	30	8.9	65
iv	Triosa Fosfato Isomerasa	Q5E956	26.69	28	8.7	56
v	S100A9	P28783	17.11	20	8.3	40

**PM: Peso Molecular**

**pl: punto isoeléctrico**

## 9. DISCUSIÓN

Los neutrófilos son el principal componente celular en la respuesta inmune innata contra microorganismos extracelulares de los mamíferos. En ocasiones los patógenos promueven una fuerte respuesta pro-inflamatoria que provoca un desequilibrio en la respuesta que ocasiona daño tisular aún más agresivo. Esta característica se ha descrito en la fiebre de embarque al que varios autores incluidos Confer (2009) relacionan a *Mannheimia haemolytica* como el principal patógeno bacteriano asociado a ésta enfermedad. Singh *et al.*, (2011), describieron que esta bacteria tiene entre sus principales factores de virulencia el lipopolisacárido que favorece el reclutamiento y activación de células de la respuesta inmune innata como los neutrófilos, algunas enzimas que favorecen la colonización del epitelio, como la glicosilasa y neuraminidasa; una leucotoxina que tiene como células blanco los leucocitos. Jaramillo y colaboradores (2000), describieron una adhesina específica a GlcNAc que reconoce principalmente neutrófilos. Cuando se presenta una infección activa en el epitelio pulmonar, la relación neutrófilo-macrófago se modifica de 1:10 hasta 10:1. Por esta razón se consideró relevante considerar que en un modelo *in vitro* de neutrófilos bovinos de sangre periférica, sería posible llevar a cabo un análisis de las modificaciones en los perfiles de O-GlcNAcilación una vez que las células fueron estimuladas con la lectina de germen de trigo que presenta la misma especificidad al azúcar GlcNAc que la adhesina aislada por Jaramillo *et al.*, (2000) de cultivos de *M. haemolytica* y que más tarde De la Mora *et al.*, (2006) reportaron que desencadena estallido respiratorio en neutrófilos bovinos al igual que la WGA en neutrófilos humanos (Solórzano *et al.*, 2006).

El proceso de O-GlcNAcilación es modulado por dos enzimas codificadas cada una por un único gen que al sufrir procesamiento alternativo del RNA mensajero genera varias isoformas; la OGT presenta tres isoformas de diferentes tamaños en humanos, la sOGT de 75 kDa, la mitocondrial de 103 kDa y la núcleo-citoplasmática de 110 kDa (Nagel y Ball, 2014); particularmente en bovinos, la

base de datos de uniprot.org reporta un peso estimado para ésta proteína de 115.75 kDa. En su detección en este trabajo se observó una única banda con peso aproximado de 130 kDa; no obstante que la banda observada es de mayor peso a lo reportado, cae dentro de la variación de 20% usado por la mayoría de los motores de búsqueda según lo reportado por Barret *et al.*, 2005. La OGA presenta dos isoformas de 130 kDa y 75 kDa (Rexach *et al.*, 2008); en la inmunodetección con anticuerpo específico se observó una banda de peso molecular aproximado de 100 kDa. Los cambios en los niveles de OGT detectados correlacionan al incremento de la O-GlcNAcilación observada en la inmunofluorescencia; sin embargo debido a que los datos de la densitometría llevada a cabo para la OGA tienen una desviación estándar amplia no fue posible determinar si había diferencia significativa con respecto al basal, sin embargo se observó una tendencia al incremento de la proteína en los tiempos mas largos que coincide con la disminución en la señal de fluorescencia observada con WGA-FITC con respecto al tiempo.

No obstante que la O-GlcNAcilación ocurre de manera muy importante en núcleo y citoplasma, no puede detectarse por métodos de separación de proteínas en una o dos dimensiones ya que la migración de péptidos así como el punto isoeléctrico de la proteína no se ve afectado por la adición de un solo azúcar por lo que es necesario llevar a cabo la detección de esta modificación post-traducciona con métodos sensibles a la presencia o ausencia del azúcar específico. La WGA es una herramienta para que nos permite sondear modificaciones en la O-GlcNAcilación debido a su afinidad por residuos GlcNAc que están cerca del polipéptido (Hart *et al.*, 2011). Otros métodos empleados para la detección son los anticuerpos, entre los que se encuentra el RL2, un anticuerpo monoclonal de ratón de clase IgG1 (Holt *et al.*, 1987) que reconocen residuos de GlcNAc ligados al oxígeno de Ser o Thr de un polipéptido y el anticuerpo CTD110.6 (Comer *et al.*, 2001) un anticuerpo monoclonal de clase IgM que reconoce el residuo GlcNAc unido por un enlace  $\beta$ -glucosídico en Ser y Thr.

Los ensayos de identificación de proteínas O-GlcNAcizadas presentes en los lisados celulares separados en condiciones desnaturalizantes y reductoras por SDS-Page, no pudimos obtener un patrón de bandeo constante en las muestras analizadas, probablemente debido a la variabilidad biológica, a pesar de que el grupo muestreado era de bovinos clínicamente sanos, las muestras fueron tomadas en días diferentes. Otra de las razones puede ser la poca reactividad contra las muestras de estudio, no obstante que esta modificación post-traducciona ha sido objeto de estudio en diversas líneas celulares (Zachara *et al.*, 2004) y neutrófilos humanos (Kneass y Marchase, 2004) no encontramos registro de la evaluación esta glicosilación en muestras de bovino; por otro lado, existe la posibilidad de que la cantidad de proteínas O-GlcNAcizadas en las muestras analizadas pudieran estar en bajas concentraciones a pesar de que para su detección se utilizó un sistema de quimioluminiscencia de alta sensibilidad para la detección de proteínas en concentración de microgramos.

La identificación de proteínas con residuos GlcNAc en neutrófilos bovinos activados con WGA se llevó a cabo en células permeabilizadas y no permeabilizadas. Los resultados que se muestran en las figuras son sólo células permeabilizadas, las células no permeabilizadas no presentaron cambios en el reconocimiento de la WGA-FITC, probablemente por que la WGA con la que se estimularon las células sigue adherida a los sitios de reconocimiento. Los cambios que se observan al interior de la célula fueron más evidentes y son dependientes del tiempo de estímulo, el cambio es transitorio y la concentración más alta de proteínas con residuos GlcNAc se presenta a los 25 min. Por lo anterior, podemos sugerir que las células se están activando y llevando a cabo una transducción de señales relacionada con la sobrevivencia celular ya que la estimulación de receptores en la superficie genera una respuesta intracelular que promueve cambios en la célula sin embargo, como el efecto observado es transitorio podemos decir que la célula regresa a un estado basal. La especificidad de la WGA-FITC por GlcNAc se determinó inhibiendo la actividad de la lectina con su azúcar específico, GlcNAc previo a llevar a cabo el marcaje en los portaobjetos en

el que estaban las células, con lo cual demostramos que la lectina acoplada a FITC está reconociendo los residuos GlcNAc disponibles y no que las proteínas o macromoléculas celulares estén reconociendo a la lectina.

Existen diversas funciones de los neutrófilos que involucran la interacción de lectinas y sus carbohidratos específicos por ejemplo la adhesión al endotelio (Seely *et al.*, 2003), el reconocimiento y fagocitosis de ciertos patógenos (Pruchniak *et al.*, 2013); sin embargo también se ha descrito que existen lectinas de origen vegetal con efectos sobre células de mamíferos (Hernández-Cruz *et al.*, 2005) y pueden ayudarnos a montar modelos de diversos procesos biológicos, por ejemplo la Con A tiene efectos mitógenos en células de origen linfóide (Kearse y Hart, 1991). En 1999, Karlsson reportó que los neutrófilos humanos circulantes no respondían al estímulo de la WGA en tiempos menores a 15 min, concluyendo que es necesario un estímulo previo como el fMLP que promueva la movilización de gránulos y vesículas que contienen glicoproteínas de unión a WGA para que puedan estar presentes en la membrana y favorecer un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa; posteriormente, en 2006 Solórzano y colaboradores describieron que la estimulación de neutrófilos humanos circulantes con WGA promueve la actividad de la NADPH oxidasa y la generación de especies reactivas de oxígeno después de una hora de estímulo, en el presente trabajo, la activación con WGA en neutrófilos circulantes de bovinos incremento los niveles de O-GlcNAcificación teniendo el nivel máximo de estimulación a los 25 min; toda esta información nos indica que los neutrófilos circulantes requieren un tiempo mayor a 15 minutos para responder al estímulo de la WGA, sin embargo el incremento de la OGT a los 15 min nos indica que la célula está siendo activada, lo que tendría como consecuencia el incremento de los niveles de O-GlcNAcificación de proteínas a los 25 min como un efecto transitorio ya que la célula disminuye los niveles de la modificación post-traducciona en menos de 45 min. Esta observación es consistente a lo sugerido por Karlsson (1999) acerca de que existen receptores para WGA presentes en los gránulos de éste tipo celular por lo que es necesaria la

movilización de moléculas y receptores a la superficie para llevar a cabo sus funciones adecuadamente.

La O-GlcNAcilación de proteínas es una modificación post-traducciona que está ganando importancia, se ha descrito que regula la función de diversas proteínas involucradas en diversas vías de señalización por lo que se ha comparado con la regulación que ejerce la fosforilación sobre las cascadas de señalización y también con la característica de modular eventos de señalización mediados por receptores en la membrana celular. Kneass y Marchase en 2004, demostraron que la estimulación de neutrófilos humanos con péptidos formilados induce un incremento de O-GlcNAcilación como consecuencia de la estimulación del receptor de éstos presente en la membrana que llevó a sugerir a ésta modificación como una señal regulatoria río abajo que produce un incremento en la respuesta quimiotáctica como la respuesta funcional de la célula. La WGA incrementa la expresión de la OGT con incremento en los niveles de proteínas O-GlcNAcizadas de manera transitoria que pueden favorecer a la sobrevivencia de la célula debido a que ésta modificación post-traducciona como sugirieron Zachara y colaboradores en 2004 y favorecer la activación de las vías de señalización relacionadas al estrés celular.

Nuestros resultados a diferencia de lo concluido por Kneass y Marchase (2004) quienes identificaron que la O-GlcNAcilación es una señal inducida rápidamente como resultado de la activación, jugando así un papel importante en la señalización dinámica; nosotros proponemos que en respuesta a la estimulación, requiere un tiempo mayor a 15 min para responder al estímulo de la WGA que podría deberse a que los neutrófilos bovinos circulantes necesitan movilizar moléculas desde los gránulos hacia la superficie celular provocando así un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación.

Los tiempos en que esta modificación fue inducida pudieron relacionarse tanto en los ensayos de microscopía de fluorescencia como en los ensayos de



inmunotransferencia en los que se detectó un incremento significativo con respecto al basal de la expresión de OGT que provoca un incremento en las proteínas O-GlcNAcizadas evidenciado por la WGA-FITC y posteriormente corroborado por la inmunoreactividad del anticuerpo RL2 a los 25 min, que muestra un marcaje en el citoplasma de la célula.

El análisis electroforético en dos dimensiones de los lisados de neutrófilos muestran modificaciones en los perfiles proteicos, se observan cambios de ausencia y presencia de proteínas e isoformas de algunas de éstas; particularmente en la proteína de peso molecular aproximado de 20 kDa podemos observar que tiene tendencia a aumentar con respecto al tiempo.

La determinación de la secuencia de las proteínas nos proporcionó información sobre la identidad de las probables proteínas en las que se observan cambios en los perfiles proteicos, dos de éstas proteínas la iii y la iv, corresponden a L-serina dihidratasa/L-treonina deaminasa y a la triosa fosfato isomerasa respectivamente, dos enzimas involucradas en el metabolismo que disminuyen al aumentar el tiempo de estímulo. Las proteínas i y ii, tienen homología con el inhibidor de la elastasa de leucocitos, una proteína presente en el citoplasma y en gránulos que tiene como función regular a actividad de las serin proteasas (elastasa, catepsina G y proteinasa 3) que son liberadas cuando la célula detecta estímulos estresantes, la aparición de isoformas a los 15 mins sugiere la activación de esta enzima y la disminución de los puntos correspondientes a los 25 min podría indicar que la WGA provoca la movilización de gránulos y la liberación de enzimas al medio extracelular para llevar a cabo su función e inhibir la actividad de sus proteasas blanco provocando una disminución de la cantidad de esta enzima a los 25 minutos por lo que su detección ya no es posible a éste tiempo con la tinción llevada a cabo (Majchrzak-Gorecka *et al.*, 2016). La proteína de 20 kDa identificada presentó homología con S100A9, una proteína de unión a calcio que tiene participación en procesos inflamatorios, se expresa en gran cantidad en neutrófilos activados y promueve las funciones antimicrobianas de éstas células

induciendo la generación de especies reactivas de oxígeno por la NADPH oxidasa al favorecer la activación de cinasas como ERK1, Syk y AKT (Kerhoff *et al.*, 1998; Simard *et al.*, 2011).

La presencia de glicoproteínas en la membrana de los neutrófilos es muy variada, la estimulación de éstas proteínas puede desencadenar cascadas de señalización que permitan que la célula funcione adecuadamente, debido a que la WGA tiene reconocimiento específico por residuos GlcNAc y existen estudios que indican que la lectina puede reconocer ciertos receptores como FPR1, CR3 y CXCR1 (Malech *et al.*, 1985; Perez *et al.*, 1986; Grob *et al.*, 1990) que al recibir un estímulo extracelular promueve la señalización al interior que pueden inducir la activación de los neutrófilos. Los resultados obtenidos en éste trabajo nos permiten sugerir que la estimulación de receptores glicosilados en la membrana celular del neutrófilo provocan la activación de vías que requieren un incremento en el metabolismo celular; el estallido respiratorio que implica un aumento en el consumo de oxígeno y glucosa por parte de la célula (Verbeke *et al.*, 2015), sin embargo en el desarrollo de las vías metabólicas para la degradación de carbohidratos también puede ocurrir la vía de las hexosaminas que producirá mayor disponibilidad de UDP-GlcNAc para tener un incremento en la O-GlcNacilación de proteínas que observamos a los 25 mins de activación celular.

Procesos como la activación de neutrófilos fomentan un incremento en el metabolismo que involucra el consumo de glucosa, con lo que se generan los intermediarios necesarios para que pueda realizar sus funciones adecuadamente como son la eliminación de agentes patógenos fagocitados, lo que requiere aumentar la actividad de la glucólisis que puede conllevar un incremento en la generación del UDP-GlcNAc, como producto final de la HBP. Tomando en cuenta que la OGT es sensible a la disponibilidad de éste sustrato podemos sugerir que la activación de neutrófilos con WGA, puede llevar a la mayor disponibilidad de UDP-GlcNAc que vemos reflejada en un incremento de la actividad de OGT, así como de las proteínas O-GlcNAcizadas a los 25 min de estímulo, que puede relacionarse

con la señalización generada por la estimulación de moléculas en la superficie celular, considerando que en neutrófilos humanos la estimulación con WGA favorece la generación de ROS (Solórzano *et al.*, 2006); el receptor N-glicosilado, CXCR1 que según lo reportado es reconocido por WGA (Karlsson, 1999), cuando es estimulado por IL-8 en un modelo de neutrófilos bovinos favorece la generación de ROS (Verbeke *et al.*, 2015), en nuestro caso podemos sugerir que una de las moléculas en la superficie del neutrófilo que está siendo reconocida por la WGA es el receptor para péptidos fomicilados, ésta interacción desencadena vías de señalización que favorece la expresión como el incremento en la actividad de la OGT debido a que la señalización desencadenada por el estímulo en la superficie ocasiona un incremento en el consumo de glucosa favoreciendo a su vez que UDP-GlcNAc aumente generando un incremento de proteínas O-GlcNAcizadas.

## **10. CONCLUSIÓN**

La estimulación de neutrófilos bovinos con WGA genera un incremento en los niveles de O-GlcNAcilación y es dependiente del tiempo.

## **11. PERSPECTIVAS**

- Enriquecimiento de proteínas con residuos GlcNAc por medio de cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación.
- Identificación de las proteínas O-GlcNAcizadas por el efecto de la activación
- Promover O-GlcNAcilación con adición de GlcNAc en el medio de cultivo de neutrófilos.
- Inhibición de OGA con reactivos como Thiamet-G y PUGNAc

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso J, Schimpl M, van Aalten DM. 2014. O-GlcNAcase: promiscuous hexosaminidase or key regulator of O-GlcNAc signaling? J Biol Chem. 289:34433-9.
- Barrett J, Brophy PM, Hamilton JV. 2005. Analysing proteomic data. Int J Parasitol. 35:543-53.
- Baudoin L, Issad T. 2015. O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. Front Endocrinol (Lausanne). 5:235.
- Brister MA, Pandey AK, Bielska AA, Zondlo NJ. 2014. OGlcNAcylation and phosphorylation have opposing structural effects in tau: phosphothreonine induces particular conformational order. J Am Chem Soc. 136:3803-16.
- Buts L, Bouckaert J, De Genst E, Loris R, Oscarson S, Lahmann M, Messens J, Brosens E, Wyns L, De Greve H. 2003. The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic Escherichia coli has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N-acetylglucosamine. Mol Microbiol. 49:705-15.
- Bond MR, Hanover JA. 2015. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. J Cell Biol. 208:869-80.
- Boyce JD, Lo RYD, Wilkie I, Adler B. 2004. *Pasteurella* and *Mannheimia*. Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, Third Edition. Ed. Wiley. Capítulo 20.
- Christiansen NP, Skubitz KM. 1988. Identification of the major lectin-binding surface proteins of human neutrophils and alveolar macrophages. Blood. 71:1624-32.

- Comer FI, Vosseller K, Wells L, Accavitti MA, Hart GW. 2001. Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked N-acetylglucosamine. *Anal Biochem.* 293:169-77.
- Confer AW. 2009. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim Health Res Rev.* 10:145-8.
- Croker BA, Roberts AW, Nicola NA. Towards a Four-Dimensional View of Neutrophils. En: Ashman RB. *Leucocytes. Methods and Protocols.* Humana Press. New York, USA. 2012. pp: 86-96.
- De la Mora A, Trigo F, Jaramillo L, Garfias Y, Solórzano C, Agundis C, Pereyra A, Lascurain R, Zenteno E, Suárez-Güemes F. 2006. The N-acetyl-D-glucosamine specific adhesin from *Mannheimia haemolytica* activates bovine neutrophils oxidative burst. *Vet Immunol Immunopathol.* 15;113(1-2):148-56.
- De la Mora A, Suárez-Güemes F, Trigo F, Gorocica P, Solórzano C, Slomianny MC, Agundis C, Pereyra MA, Zenteno E. 2007. Purification of the receptor for the N-acetyl-D-glucosamine specific adhesin of *Mannheimia haemolytica* from bovine neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 1770:1483-9.
- Du Preez JC, van Rensburg E, Kilian SG. 2008. Kinetics of growth and leukotoxin production by *Mannheimia haemolytica* in continuous culture. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:611-8.
- Golks A, Guerini D. 2008. The O-linked N-acetylglucosamine modification in cellular signalling and the immune system. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* 9:748-53.

- Grob PM, David E, Warren TC, DeLeon RP, Farina PR, Homon CA. 1990. Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. *J Biol Chem.* 265:8311-6.
- Hart GW, Housley MP, Slawson C. 2007. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 446:1017-22.
- Hart GW, Akimoto Y. 2009. The O-GlcNAc Modification. *Essentials of Glycobiology.* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Capítulo 18.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. 2011. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* 80:825-58.
- Hart GW. 2014. Three Decades of Research on O-GlcNAcylation - A Major Nutrient Sensor That Regulates Signaling, Transcription and Cellular Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne).* 27:183.
- Hart GW. 2014. Minireview series on the thirtieth anniversary of research on O-GlcNAcylation of nuclear and cytoplasmic proteins: Nutrient regulation of cellular metabolism and physiology by O-GlcNAcylation. *J Biol Chem.* 289:34422-3.
- Hernandez-Cruz P, Perez- Campos E, Martínez-Martinez L, Ortiz B, Martinez G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB.* 24: 21-27.
- Holt GD, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. 1987. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol.* 104:1157-64.

- Isono T. 2011. O-GlcNAc-specific antibody CTD110.6 cross-reacts with N-GlcNAc2-modified proteins induced under glucose deprivation. *PLoS One*. 6:e18959.
- Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, Cassatella MA, Garlanda C, Mantovani A. 2013. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol*. 35:377-94.
- Janetzko J, Walker S. 2014. The making of a sweet modification: structure and function of O-GlcNAc transferase. *J Biol Chem*. 289:34424-32.
- Jaramillo L, Díaz F, Hernández P, Debray H, Trigo F, Mendoza G, Zenteno E. 2000. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology*. 10:31-7.
- Jaramillo–Arango Carlos Julio, Trigo Tavera Francisco J., Suárez–Güemes Francisco. 2009. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet. Méx* v.40 n.3.
- Karlsson A. 1999. Wheat germ agglutinin induces NADPH-oxidase activity in human neutrophils by interaction with mobilizable receptors. *Infect Immun*. 67:3461-8.
- Kearse KP, Hart GW. 1991. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:1701-5.
- Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. 1998. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochim Biophys Acta*. 1448:200-11.



- Kisiela DI, Czuprynski CJ. 2009. Identification of *Mannheimia haemolytica* adhesins involved in binding to bovine bronchial epithelial cells. *Infect Immun.* 77:446-55.
- Kim EJ, Bond MR, Love DC, Hanover JA. 2014. Chemical tools to explore nutrient-driven O-GlcNAc cycling. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 49:327-42.
- Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. 2007. *Inmunología de Kuby*. México. Mc Graw Hill Interamericana. 6ta edición. Pp:65-69, 332-346.
- Kienle K, Lämmermann T. 2016. Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response. *Immunol Rev.* 273:76-93.
- Kneass ZT, Marchase RB. 2004. Neutrophils exhibit rapid agonist-induced increases in protein-associated O-GlcNAc. *J Biol Chem.* 279:45759-65.
- Kneass ZT, Marchase RB. 2005. Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *J Biol Chem.* 280:14579-85.
- Lacy P. 2006. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2:98-108.
- Lozano L, Lara-Lemus R, Zenteno E, Alvarado-Vásquez N. 2014. The mitochondrial O-linked N-acetylglucosamine transferase (mOGT) in the diabetic patient could be the initial trigger to develop Alzheimer disease. *Exp Gerontol.* 58:198-202.

- Malech HL, Gardner JP, Heiman DF, Rosenzweig SA. 1985. Asparagine-linked oligosaccharides on formyl peptide chemotactic receptors of human phagocytic cells. *J Biol Chem.* 260:2509-14.
- Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 25:519-31.
- Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. 2010. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nat Chem Biol.* 6:713-23.
- Marth JD, Grewal PK. 2008. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol.* 8:874-87.
- Matson JS, Withey JH, DiRita VJ. 2007. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect Immun.* 75(12):5542-9.
- Nagel AK, Ball LE. 2014. O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids.* 46:2305-16.
- Perez HD, Elfman F, Lobo E, Sklar L, Chenoweth D, Hooper C. 1986. A derivative of wheat germ agglutinin specifically inhibits formyl-peptide-induced polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by blocking re-expression (or recycling) of receptors. *J Immunol.* 136:1803-12.
- Pruchniak MP, Arazna M, Demkow U. 2013. Life of neutrophil: from stem cell to neutrophil extracellular trap. *Respir Physiol Neurobiol.* 187(1):68-73.

- Rexach JE, Clark PM, Hsieh-Wilson LC. 2008. Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nat Chem Biol.* 4:97-106.
- Rojas E, Llinas P, Rodríguez-Romero A, Hernández C, Linares M, Zenteno E, Lascurain R. 2001. Hevein, an allergenic lectin from rubber latex, activates human neutrophils' oxidative burst. *Glycoconj J.* 18:339-45.
- Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. 2008. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* 8:117-28.
- Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlan MC, Robles-Flores M. 2012. The Role of O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Modification in Cell Signaling. Glycosylation. InTech, Chapters. Cap. 13.
- Seely AJ, Pascual JL, Christou NV. 2003. Science review: Cell membrane expression (connectivity) regulates neutrophil delivery, function and clearance. *Crit Care.* 7:291-307.
- Simard JC, Simon MM, Tessier PA, Girard D. 2011. Damage-associated molecular pattern S100A9 increases bactericidal activity of human neutrophils by enhancing phagocytosis. *J Immunol.* 186:3622-31.
- Singh K, Ritchey JW, Confer AW. 2011. *Mannheimia haemolytica*: bacterial-host interactions in bovine pneumonia. *Vet Pathol.* 48:338-48.
- Solórzano C, Bouquelet S, Pereyra MA, Blanco-Favela F, Slomianny MC, Chavez R, Lascurain R, Zenteno E, Agundis C. 2006. Isolation and characterization of the potential receptor for wheat germ agglutinin from human neutrophils. *Glycoconj J.* 23:591-8.

- Srikumaran S, Kelling CL, Ambagala A. 2007. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. *Anim Health Res Rev.* 8:215-29.
- Stellari FF, Lavrentiadou S, Ruscitti F, Jacca S, Franceschi V, Civelli M, Carnini C, Villetti G, Donofrio G<sup>1</sup>. 2014. Enlightened *Mannhemia haemolytica* lung inflammation in bovinized mice. *Vet Res.* 45:8.
- Snow CM, Senior A, Gerace L. 1987. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol.* 104:1143-56.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME. 2009. *Essentials of Glycobiology.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2<sup>a</sup> edición.
- Verbeke J, Boulougouris X, Rogiers C, Burvenich C, Peelman L, De Spiegeleer B, De Vliegher S. 2015. Reactive oxygen species generation by bovine blood neutrophils with different CXCR1 (IL8RA) genotype following Interleukin-8 incubation. *BMC Vet Res.* 11:104.
- Walker RD, Hopkins FM, Schultz TW, McCracken MD, Moore RN. 1985. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. *Am J Vet Res.* 46:2429-33.
- Weber T, Chandrasekaran V, Stamer I, Thygesen MB, Terfort A, Lindhorst TK. 2014. Switching of bacterial adhesion to a glycosylated surface by reversible reorientation of the carbohydrate ligand. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53:14583-6.

- Yang YR, Suh PG. 2014. O-GlcNAcylation in cellular functions and human diseases. *Adv Biol Regul.* 54:68-73.
- Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. 2004. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem.* 279:30133-42.