

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**“CARACTERIZACIÓN DE LA GLICOSILACIÓN TERMINAL DE
LA IgM SÉRICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS
TIPO 2”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

CHRISTIAN ISRAEL LUJÁN CAMARILLO

HERMOSILLO, SONORA.

MARZO DEL 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Christian Israel Luján Camarillo, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Dra. Maria del Carmen Candia Plata.
Director Académico

Dr. Luis Fernando López Soto.
Secretario

Dr. Enrique Bolado Martínez.
Vocal

M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña.
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por facilitarme los medios para poder realizar y obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Quiero agradecer a mi director de tesis la Dra. Maria del Carmen Candía Plata, por su ayuda no sólo en el sentido académico, sino humano y amigable. Aprovecho para reiterar mi agradecimiento, por la gran oportunidad que me brindó al trabajar en un área tan importante y complicada como es la Glicobiología.

Con gran aprecio quiero reconocer la ayuda y guía del Dr. Enrique Bolado Martínez, Dr. Luis Fernando López Soto y M.C. Lucía Guadalupe Castellón Campaña.

También agradezco a mis compañeros de maestría, en especial a todos aquellos que formaron parte de la generación 2008-2010, pero en especial a mis compañeras Marlenne Rendón Alvarez y mi novia Dámaris Pineda Orozco, porque gracias a todos ellos, fue más fácil sobrellevar y superar las adversidades.

Sin restar importancia, doy gracias a Dios. A mis padres y hermanos, mi familia; lo mas importante en mi vida, el motor que impulsa día con día las ganas de superación, los responsables de mi formación y entereza.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vii
OBJETIVOS	viii
Objetivo General	viii
Objetivos Específicos.....	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Glicosilación Proteica, Biosíntesis de Oligosacáridos y Función de la Glicosilación en las Proteínas.....	4
Biosíntesis de N-glicanos Para la Formación de Glicoproteínas Séricas.....	9
Estructura, Función y Glicosilación Normal de la IgM Sérica Humana.....	12
Disfunción Inmunológica en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2	19
Alteración Funcional de Inmunoglobulinas a Consecuencia de Cambios en la Glicosilación	21
MATERIALES Y METODOS	24
Tipo de Investigación.....	24
Muestras de Estudio.....	24
Reactivos y Materiales.....	25
Cuantificación de Proteínas Séricas Totales de las Muestras Seleccionadas.....	25
Aislamiento de IgM por Medio de Cuatro Etapas Cromatográficas	26
Primera Etapa.....	26
Segunda Etapa.....	27
Tercera Etapa	27
Cuarta Etapa.....	28
Estimación de la Pureza por SDS-PAGE e Inmunodetección	29
Caracterización de la Glicosilación Terminal de la IgM por ELLA	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Cuantificación de Proteínas Séricas Totales	32

Purificación de la IgM Sérica por Cromatografía	32
Estimación de la Masa Molecular y de la Pureza de la IgM	38
Comparación y Comprobación de la Pureza de la IgM	40
Electroforesis de las Fracciones de Lavado y Elución de Cada Etapa Cromatográfica.....	43
Estimación de la Glicosilación Terminal de la IgM.....	46
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFÍA	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Representación del enlace N-glucosídico.	5
2. Representación del enlace O-glucosídico.	6
3. Representación de las estructuras oligosacáridas encontradas en N-oligosacáridos. ...	8
4. Transferencia del oligosacárido iniciador desde el dodicol hasta el polipéptido en crecimiento.....	10
5. Procesamiento y biosíntesis de oligosacáridos en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi.....	11
6. Sitios de N-glicosilación en la IgM humana.....	14
7. Estructuras mono-sialiladas encontradas en los sitios de glicosilación Asn-171, Asn-332 y Asn-395 de la IgM sérica humana..	15
8. Estructuras di-sialiladas encontradas en los sitios de glicosilación Asn-171, Asn-332 y Asn-395 de la IgM sérica humana.	16
9. Estructuras asialiladas encontradas en los sitios de glicosilación Asn-171, Asn-332 y Asn-395 de la IgM sérica humana.	17
10. Glicoformas con alto contenido en manosa, identificadas en los sitios de glicosilación Asn- 402 y Asn-563 de la IgM sérica humana.	18
11. Cromatograma del aislamiento de inmunoglobulinas séricas en Sefarosa-6B altamente acetilada.....	33
12. Cromatograma del aislamiento de IgA total en agarosa-antiIgA.....	35
13. Cromatograma del aislamiento de la IgG sérica en Sefarosa CL-6B-proteína A.	37
14. Aislamiento de IgM sérica, utilizando agarosa-anti IgM humana.	39
15. Curva generada entre el Log de la masa molecular de los estándares y la movilidad relativa.	41
16. SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección de la IgM.	42

17. Comprobación del grado de pureza de la IgM sérica.....	44
18. Electroforesis de las fracciones de lavado y elución de cada etapa cromatográfica	45
19. Interacción entre la lectina SNA y la IgM de pacientes y controles.	48
20. Interacción entre la lectina MAA y la IgM de pacientes y controles.....	50
21. Interacción entre la lectina PNA y la IgM de pacientes y controles.	51
22. Interacción entre la lectina RCA I y la IgM de pacientes y controles.....	52
23. Interacción entre la lectina ECA y la IgM de pacientes y controles.	53
24. Interacción entre la lectina WGA y la IgM de pacientes y controles.....	55
25. Interacción entre la lectina LCA y la IgM de pacientes y controles..	56
26. Interacción entre la lectina Con A y la IgM de pacientes y controles.....	57
27. Relación SNA/MAA entre pacientes y controles.....	59
28. Relación ECA/SNA entre pacientes y controles.	61
29. Relación RCAI/SNA entre pacientes y controles.	62
30. Relación WGA/RCAI entre pacientes y controles.....	63
31. Relación WGA/ECA entre pacientes y controles.	64
32. Relación WGA/SNA entre pacientes y controles.	66

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Densidad óptica media obtenida por la interacción entre las lectinas y la IgM.....	47
II. Relación de densidad óptica entre pares de lectinas afines hacia estructuras oligosacáridas de la IgM.	60

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar la glicosilación terminal de la IgM sérica de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 para identificar los potenciales cambios con relación a la glicosilación terminal de la IgM de personas euglicémicas aparentemente sanas

Objetivos Específicos

1. Seleccionar, por conveniencia, un grupo de muestras séricas de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, del banco de sueros del Laboratorio de Bioquímica Clínica del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud.
2. Integrar un grupo control de número semipareado, de sujetos euglicémicos aparentemente sanos.
3. Definir un esquema cromatográfico para aislar a la IgM sérica.
4. Purificar y determinar el grado de pureza de la IgM sérica de pacientes y controles, con el fin de tener a la proteína pura para realizar el análisis de glicosilación terminal.
5. Determinar la afinidad de la IgM de los pacientes y controles hacia un grupo de lectinas vegetales con el fin de estimar la glicosilación terminal de la inmunoglobulina.
6. Comparar estadísticamente la afinidad de la IgM sérica de pacientes y controles por las lectinas vegetales para estimar las diferencias en la glicosilación terminal.

RESUMEN

La diabetes mellitus, es un síndrome plurimetabólico caracterizado por hiperglucemia crónica. Hoy en día, la diabetes mellitus se ha convertido en el mayor problema de salud pública a nivel mundial, debido a las altas tasas de mortalidad, morbilidad y los costos que genera su tratamiento.

Se desconocen los mecanismos responsables de la alta susceptibilidad a las infecciones de los pacientes con DM2, pero se cree que podría ser el resultado del deterioro del sistema inmune. La inmunoglobulina M, responsable de la respuesta humoral primaria ante un proceso infeccioso, es una proteína glicosilada cuya función óptima depende de su integridad estructural. Se ha demostrado que la alteración en los oligosacáridos de la inmunoglobulina podría afectar sus funciones efectoras, pero se desconoce si existen modificaciones en la estructura oligosacárida de la IgM de los pacientes con DM2. Por esta razón, el presente trabajo se enfocó en buscar diferencias en la glicosilación terminal de la IgM en pacientes con DM2 con respecto a la IgM de sujetos euglicémicos pareados por sexo y edad.

Se realizó un muestreo no probabilístico, por conveniencia, para conformar un grupo de nueve pacientes con DM2 y un grupo control de siete sujetos euglicémicos aparentemente sanos. El aislamiento de la IgM sérica del grupo de pacientes con DM2 y sujetos control, se realizó mediante cuatro etapas cromatográficas en tándem. En la primera etapa, utilizando cromatografía de hidrofobicidad Sefarosa-6B altamente acetilada, se aislaron las inmunoglobulinas totales del resto de las proteínas séricas. En la segunda etapa, usando agarosa-anti IgA humana, se removió la IgA total del resto de las inmunoglobulinas. En la tercera etapa, la fracción de lavado de agarosa-anti-IgA humana se cargó a una columna de Sefarosa CL-6B-proteína A, para remover la IgG. En la etapa final, se empleó agarosa-anti IgM humana, para aislar a la IgM de las proteínas séricas remanentes. El alto grado de pureza de la IgM, se comprobó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras e inmunodetección.

La IgM del grupo de pacientes y controles, fue analizada utilizando ocho lectinas vegetales con afinidad específica hacia uno o un grupo de carbohidratos determinados. Las lectinas utilizadas fueron: *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin I (RCAI), *Lens culinaris* agglutinin, *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) y *Triticum vulgare* agglutinin (WGA), que mediante inmunolectinoensayos permitieron estimar las diferencias de glicosilación terminal entre la IgM del grupo de pacientes y la del grupo de controles.

El análisis individual con la lectina Con A, que reconoce residuos de α -manosa (oligomanosas), no mostró diferencias significativas entre el grupo de pacientes y controles. Esto sugiere que, los oligosacáridos de los sitios de glicosilación Asn-402 y Asn-563 de la IgM del grupo de pacientes (sitios que contienen oligosacáridos con alto contenido en manosa), no presentan cambios con respecto al grupo de los controles. La lectina LCA, que presenta afinidad por β -GlcNAc o α -manosas de oligosacáridos cortos que presentan un residuo de α -fucosa unido al centro quitobiosa, no mostró diferencias significativas. Esta información sugiere, que los cambios en los perfiles de glicosilación observados en la IgM del grupo de pacientes con DM2 con relación a la IgM del grupo de sujetos euglicémicos, aparentemente sanos, se presentan a expensas de los carbohidratos terminales, y no de estructuras internas fucosiladas, como el centro quitobiosa.

Los resultados obtenidos con las lectinas SNA, MAA, RCAI, ECA y WGA, así como sus relaciones (SNA/MAA, ECA/SNA, RCAI/SNA, RCAI/ECA, WGA/RCAI, WGA/ECA y WGA/SNA), sugieren que los N-oligosacáridos de la IgM sérica están hiposialilados e hipogalactosilados en el grupo de pacientes con DM2, en comparación con el grupo de sujetos controles. La disminución de galactosa (incluyendo ácido siálico) deja expuesto el carbohidrato siguiente de la cadena oligosacárida (GlcNAc).

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la diabetes mellitus se ha convertido en el mayor problema de salud pública a nivel mundial, debido a las altas tasas de mortalidad, morbilidad y costos que genera su tratamiento (Álvarez-Félix y col., 2006; Bosch, 2002). La diabetes mellitus, se define como un síndrome plurimetabólico crónico en el que la hiperglicemia crónica (Walter y col., 2001) es el principal factor de riesgo asociado al desarrollo de complicaciones micro y macro-vasculares.

Otra de las complicaciones que se presenta en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, es el desarrollo de infecciones recurrentes (Abrass, 1991; Bessman y Sapico, 1992; Papanas y col., 2010) de difícil control, especialmente cuando tienen un pobre control glicémico (Geerlings y Hoepelman, 1999). Algunas de las enfermedades infecciosas más comunes a las que se enfrentan los diabéticos, incluyen a la micosis, tuberculosis pulmonar, bacteriemias, infecciones en el tracto urinario, hueso, piel y extremidades inferiores (Papanas y col., 2010). La frecuencia de infecciones, se ha asociado con alteraciones en el sistema inmunológico, como las inmunoglobulinas que juegan un papel muy importante en la defensa del organismo contra agentes infecciosos (Hammes y col., 1990; Huseynova y col., 2010; Kennedy y col., 1994). La inmunoglobulina M, es la primera en producirse como respuesta humoral primaria ante un proceso infeccioso (Arnold y col., 2007). Esta es una glicoproteína altamente glicosilada en la cadena pesada μ , con cinco sitios conservados de N-glicosilación en cada subunidad (Arnold y col., 2005). Los sitios Asn-171, Asn-332, y Asn-395, se encuentran ocupados con estructuras oligosacáridas complejas, que representan el 76.6% del total de estructuras oligosacáridas en la molécula; de ellas, el 70.9% son estructuras mono-sialiladas, el 9.7% son di-sialiladas y el resto son estructuras con terminación en galactosa. Los sitios Asn-402 y Asn-563, contienen estructuras con $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{5-9}$, las cuales constituyen el 23.4% del total de oligosacáridos de la IgM (Arnold y col., 2005).

Los oligosacáridos de los sitios de glicosilación antes mencionados, son fundamentales para la IgM, ya que cualquier variación en su estructura, influye potencialmente en la función efectora de la molécula (Jiménez y col., 2002). Se ha reportado que los cambios en la estructura oligosacárida de las inmunoglobulinas, afectan la capacidad de unión al antígeno, su conformación, solubilidad, tasa de aclaramiento y capacidad para activar la vía clásica del complemento (Arnold y col., 2006; Arnold y col., 2007). En pacientes con DM2, se han observado cambios en la glicosilación de proteínas de fase aguda, asociados con el estado inflamatorio crónico por el que cursan estos pacientes (Chavan y col., 2005; Havenaar y col., 1998; Higai y col., 2003) además de alteraciones en los perfiles de glicosilación en otras proteínas séricas (Havenaar y col., 1998; Vázquez-Moreno y col., 2001; Higai y col., 2003; Itoh y col., 2007). En ratones de experimentación con inflamación inducida, también se han observado cambios en los perfiles de glicosilación de proteínas séricas que afectan principalmente el contenido relativo de ácido siálico terminal.

Los cambios en la glicosilación terminal de proteínas séricas como la inmunoglobulina A1 (Vázquez-Moreno y col., 2001) y las proteínas de fase aguda (Chavan y col., 2005; Havenaar y col., 1998; Higai y col., 2003) han sido relacionados con alteraciones metabólicas propias de la diabetes como la hiperglicemia crónica (Yarema y Bertozzi, 2001) y parecen ser el resultado de la alteración secundaria de las enzimas involucradas en los procesos de glicosilación (Havennar y col., 1998). A su vez, la alteración en la glicosilación de las proteínas séricas podría explicar parcialmente fenómenos como la elevación de ácido siálico sérico (Gavella y col., 1990) o la participación de inmunoglobulinas como la IgA1 en complicaciones como la nefropatía diabética (Vázquez-Moreno y col., 2001).

Sin embargo, aún es necesaria la caracterización de otras inmunoglobulinas para poder explicar fenómenos como la elevada susceptibilidad a las infecciones y su escaso control en los pacientes diabéticos. Por esta razón, el presente trabajo se enfocó en la

caracterización de los potenciales cambios en la glicosilación terminal de la IgM de un grupo de pacientes con DM2.

Con esta investigación, además de obtener información básica sobre la estructura de la IgM sérica en los pacientes con DM2, se pretende sentar las bases para continuar con futuras investigaciones que permitan esclarecer las causas de la elevada susceptibilidad y frecuencia con la que los pacientes con diabetes mellitus desarrollan infecciones más frecuentemente que las personas euglicémicas.

ANTECEDENTES

Glicosilación Proteica, Biosíntesis de Oligosacáridos y Función de la Glicosilación en las Proteínas

La adición de oligosacáridos a las proteínas, trae consigo la formación de glicoproteínas; este es un proceso conocido como glicosilación proteica y es mediado por enzimas (Voet y col., 2006). Los oligosacáridos le confieren estabilidad a las glicoproteínas, incrementan su solubilidad, afectan su tasa de aclaramiento, participan modificando la carga neta de la proteína, su resistencia a la proteólisis, y su afinidad en los procesos de bioreconocimiento celular, tales como la, adhesión, señalización, bloqueo e internalización (Leibiger y col., 1998; Sitia y col., 1984; Yarema y Bertozzi, 2001).

Los oligosacáridos se unen covalentemente a las proteínas, por enlaces de tipo N- y de tipo O-. La formación de los enlaces de tipo N- se origina por la unión covalente entre la N-acetil-D-glucosamina perteneciente al oligosacárido y el grupo amida de la cadena lateral del aminoácido asparagina de la proteína (Figura1). La formación de las O- glicoproteínas es un proceso en el que el monosacárido involucrado en la unión con el esqueleto proteico es la N-acetil-D-galactosamina que se une covalentemente a los grupos OH- laterales de los aminoácidos serina o treonina (Figura 2), (Murray y col., 2002; Schacter, 2000; Voet y col., 2006).

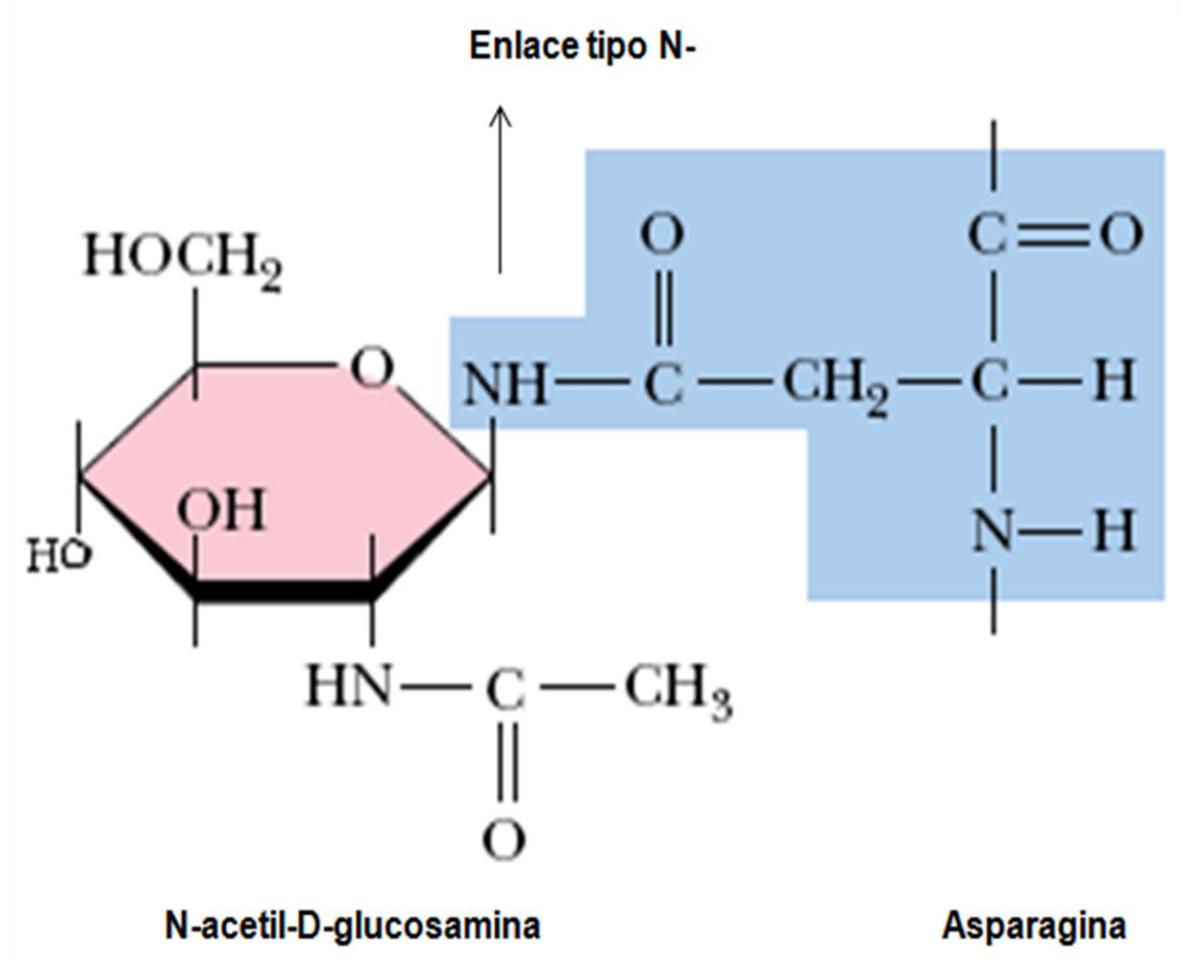


Figura 1. Representación del enlace N-glucosídico.

La unión ocurre entre la *N*-acetilglucosamina y el grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina o glutamina de la proteína.

Fuente: Modificado de Roskoski, 2002.

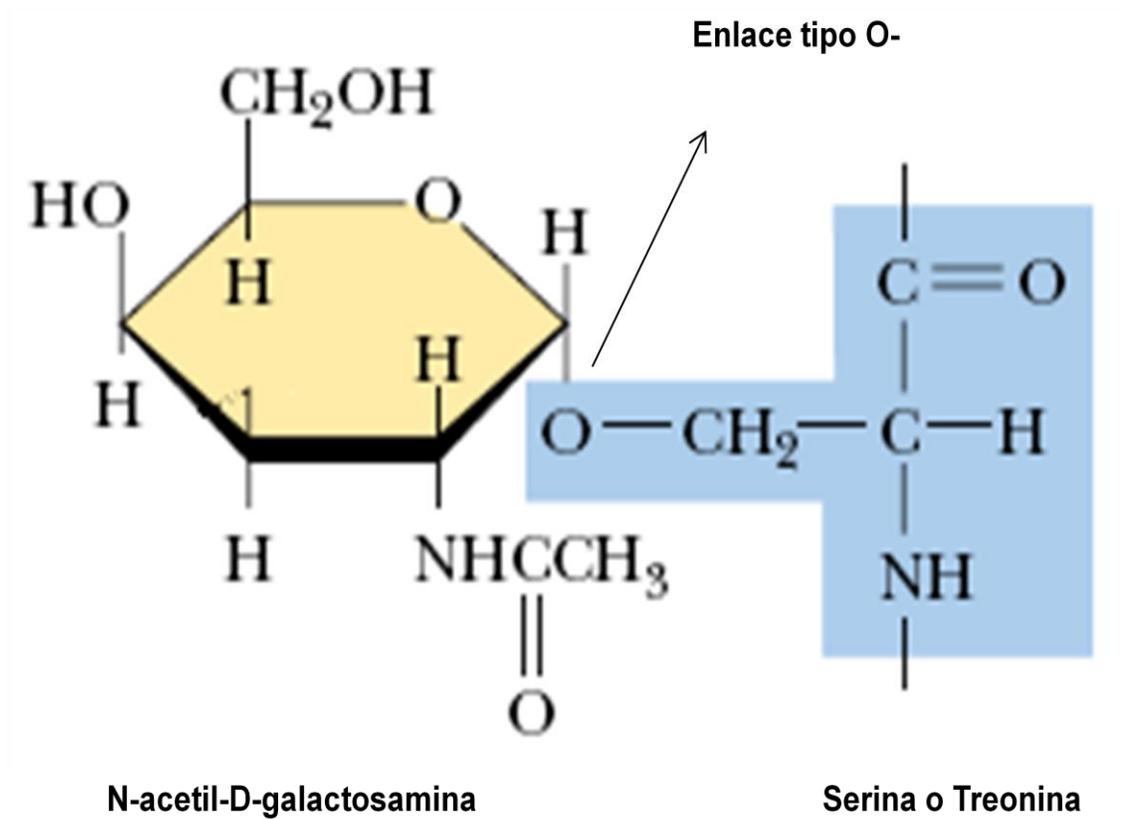


Figura 2. Representación del enlace O-glucosídico.

Este tipo de enlace se da entre la N- acetilgalactosamina y el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina o treonina de la proteína.

Fuente: Modificado de Roskoski, 2002.

Todas las N-glicoproteínas comparten una estructura nuclear común constituida por el pentasacárido $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta\text{-Asp}$ (Figura 3), al que se le adicionan una cantidad variable de monosacáridos para extender el pentasacárido original, generando así una amplia y compleja diversidad de estructuras oligosacáridas, las cuales actualmente están clasificadas en tres grupos: 1) High-man o con alto contenido de manosa; se caracterizan porque sólo contienen residuos de D-manosa unidos al núcleo común (Figura 3). 2) las tipo complejo; son estructuras que poseen brazos o antenas unidas al núcleo, estas antenas son elongadas con diversos monosacáridos como D-galactosa, D-manosa, N-acetil-D-glucosamina, L-fucosa y ácido siálico, entre otros. El número de antenas que poseen va desde dos (biantenarío) a cuatro (tetraantenarío) y en algunas ocasiones cinco antenas (Figura 3). 3) las estructuras de tipo híbrido, tienen en un brazo sólo residuos de manosa y en el otro diversos monosacáridos; son una fusión entre la estructura high-man y la compleja (Leibiger y col., 1998; Murray y col., 2002; Schacter, 2000). Por la diversidad de monosacáridos que constituyen los oligosacáridos y por la susceptibilidad de los eventos de glicosilación terminal a los que están sometidos, es de esperar un alto grado de microheterogeneidad estructural especialmente en condiciones patológicas.

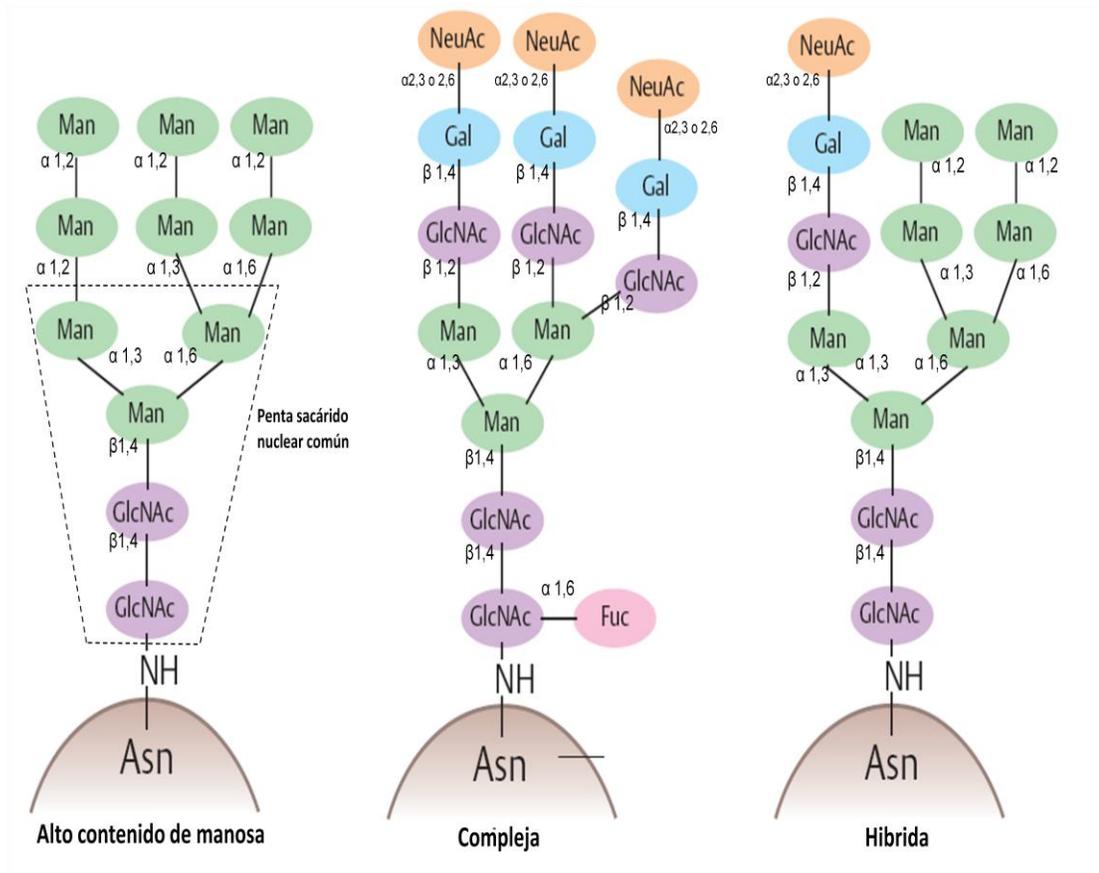


Figura 3. Representación de las estructuras oligosacáridas encontradas en N-oligosacáridos.

El pentasacárido nuclear, forma parte de la estructura oligosacárida de todas las proteínas con N-oligosacáridos. El centro quitobiosa está constituido por dos residuos de GluNAc y tres residuos de manosa.

Fuente: Modificado de Koolman, 2005.

Biosíntesis de N-glicanos Para la Formación de Glicoproteínas Séricas

Las vías metabólicas responsables de la formación de oligosacáridos están divididas en dos etapas: la vía temprana y la vía tardía (Yarema y Bertozzi, 2001). La vía temprana se encarga de la conversión de los azúcares exógenos “provenientes de la dieta” o endógenos “adquiridos por el reciclaje de proteínas”, a nucleótidos de azúcar por medio de una gran variedad de enzimas que se encuentran en el citoplasma. En la vía tardía los nucleótidos de azúcar (azúcares activados) obtenidos de la primera vía, se adicionan a la estructura del oligosacárido de la proteína en fase de síntesis (en el retículo endoplásmico) o de maduración (en el aparato de Golgi) (Murray y col., 2002; Yarema y Bertozzi, 2001).

Todos los N-oligosacáridos son inicialmente ensamblados en el retículo endoplásmico y transferidos a un acarreador lipídico llamado dodicol-fosfato, para formar un donador de azúcar; $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-dodicol}$, este gran oligosacárido es transferido del dodicol-fosfato a un residuo de asparagina en el polipéptido. Es un proceso cotraduccional, en donde a medida que se sintetiza la proteína en los ribosomas del retículo endoplásmico, se adicionan los carbohidratos (Figura 4), (Chantret y Moore, 2008; Elbein, 1991 ; Murray y col., 2002). El sitio al que se adicionan los carbohidratos debe contener una secuencia aminoacídica Asn-X-Ser-Thr, conocida como triplete o “sequon” en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Helenius, 1994; Murray y col., 2002; Sethuraman y Stadheim, 2006). La adición del oligosacárido a la proteína detona la activación de glucosidasas, que se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico y se encargan de remover tres unidades de glucosa (Figura 5). En el caso de la formación de una estructura con alto contenido en manosa, el proceso puede terminar aquí, o bien, seguir en el aparato de Golgi hasta la remoción de cuatro residuos de manosa $\alpha 1-2$ y la adición de una GlcNAc al extremo $\text{Man}\alpha 1-3$ por medio de la GlcNAc transferasa (Elbein, 1991; Murray y col., 2002), la acción de esta enzima

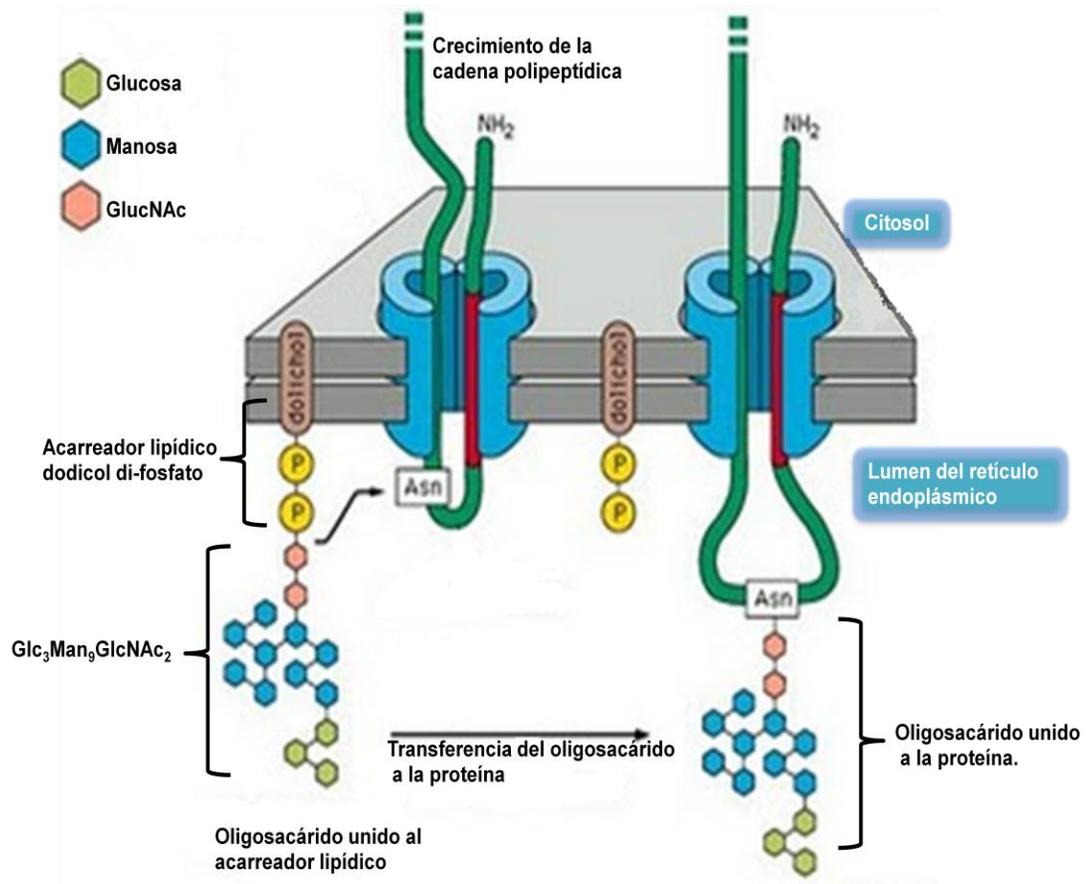


Figura 4. Transferencia del oligosacárido iniciador desde el dodicol hasta el polipéptido en crecimiento.

Fuente: http://sindromeceg.blogspot.com/2009_02_01_archive.html

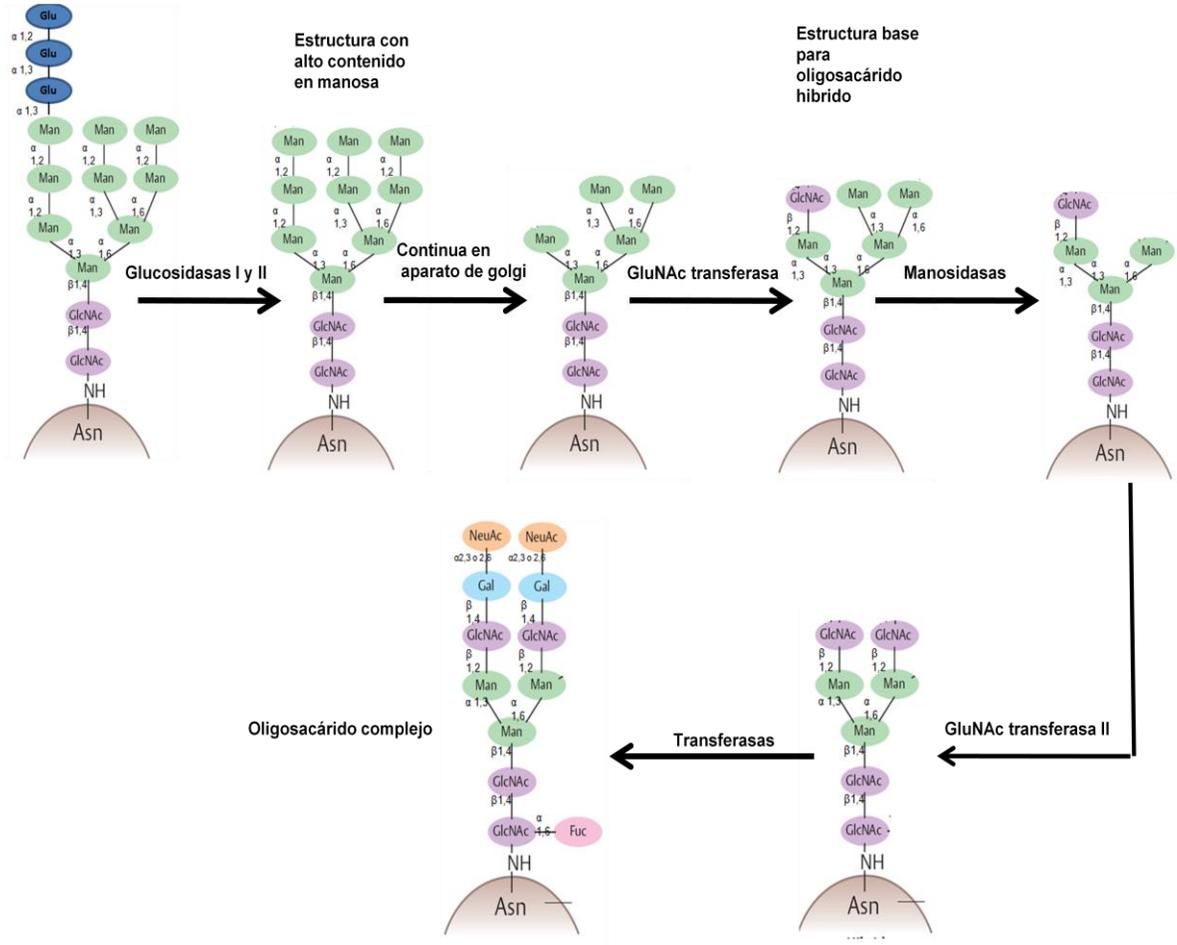


Figura 5. Procesamiento y biosíntesis de oligosacáridos en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi.

Fuente: Modificado de Koolman, 2005.

permite la remoción de las Man α 1-3 y Man α 1-6 del brazo biantenarico, dejando la estructura central con cinco unidades, el pentasacárido nuclear común y la GlcNAc en el extremo Man α 1-3.

Para la formación del oligosacárido complejo se requiere la adición de otra GlcNAc en el extremo Man α 1-6 por medio de la GlcNAc transferasa II. Una serie de reacciones secuenciales catalizadas por fucosil, galactosil, y sialil transferasas, que permiten la adición de fucosa, galactosa, NeuAc, respectivamente a la estructura del oligosacárido (Elbein, 1991 ; Murray y col., 2002). La complejidad de las estructuras oligosacáridas dependerá del tipo de proteína que se vaya a sintetizar y el conjunto de glicosiltransferasas en la célula (Voet y col., 2006).

Estructura, Función y Glicosilación Normal de la IgM Sérica Humana

La IgM es el primer anticuerpo que se produce durante el desarrollo y durante la respuesta inmune primaria (Wormald y col., 1991). Se puede encontrar en el torrente sanguíneo como proteína secretada o formando parte de la superficie de las células B en forma de receptor antigénico (Arnold y col., 2005). En circulación se encuentra como pentámero y hexámero; su concentración en plasma es de 2.5 mg/ml y se eleva de 5-10 días después de una infección (Arnold y col., 2006).

La IgM al igual que la mayoría de las proteínas séricas, se encuentra glicosilada, con oligosacáridos de diversa complejidad unidos covalentemente por enlaces N-glucosídicos. La IgM pentamérica, está constituida por 5 subunidades de 190 kDa, cada subunidad posee dos cadenas polipeptídicas pesadas μ de 50-77 kDa y dos cadenas ligeras de 25 kDa, unidas por puentes disulfuro (Arnold y col., 2006; Wormald y col., 1991). La IgM posee una cadena J de 20 kDa, que está ausente en la forma hexamérica y presenta un sitio de glicosilación en la Asn-48 (Arnold y col., 2005).

La cadena pesada μ de la IgM, contiene cinco sitios conservados de N-glicosilación (Figura 5) (Arnold y col., 2005; Leibiger y col., 1998). Los sitios Asn-171, Asn-332, y Asn-395, contienen estructuras complejas que corresponden al 76.6% del total de estructuras oligosacáridas en la molécula, de las cuales el 70.9% son estructuras mono-sialiladas (Figura 6), el 9.7% son di-sialiladas (Figura 7) y el resto está constituido por estructuras con terminación en galactosa, asialiladas (Figura 8). Del total de estructuras encontradas, el 52.5% son estructuras bisectadas y el 84.5% contienen fucosa unida al centro quitobiosa. Los oligosacáridos en estos sitios de glicosilación son fundamentales para la IgM, por lo que cualquier variación en su estructura influye potencialmente en la función efectora de la IgM (Arnold y col., 2006). Los sitios Asn-402 y Asn-563 contienen isoformas $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_{5-9}$ con dos estructuras predominantes de oligomanosas, $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_6$ y $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_8$, constituyendo el 23.4% del total de oligosacáridos en la molécula (Figura 9) (Arnold y col., 2005).

Por otro lado, se ha observado que los oligosacáridos de la IgM con uno o dos residuos de galactosa terminal, tienen afinidad potencial por las asialoglicoproteínas receptoras involucradas en el aclaramiento de las glicoproteínas, pero una vez que la IgM pentamérica se ha unido al antígeno, por la ruta de los glicanos, estos se encuentran inaccesibles para interactuar con los receptores de aclaramiento, lo que baja la velocidad de remoción de la IgM por esta vía y promueve una mayor unión al antígeno para la activación de la vía del complemento (Arnold y col., 2005).

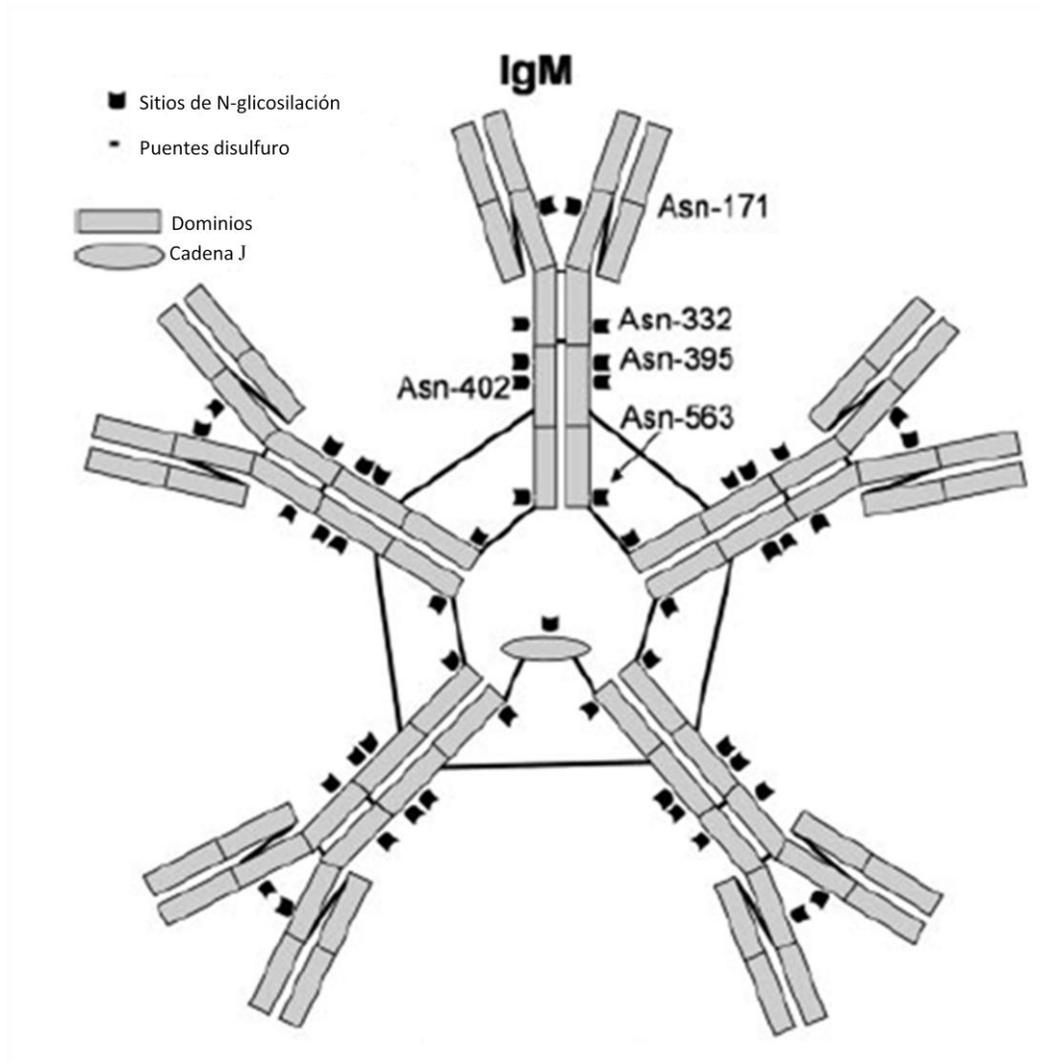


Figura 6. Sitios de N-glicosilación en la IgM humana.

Cada cadena pesada μ de la IgM contiene cinco sitios conservados de N-glicosilación, por lo que en forma pentamérica posee 25 sitios y uno más en la cadena J.

Fuente: Modificado de Arnold y col., 2005.

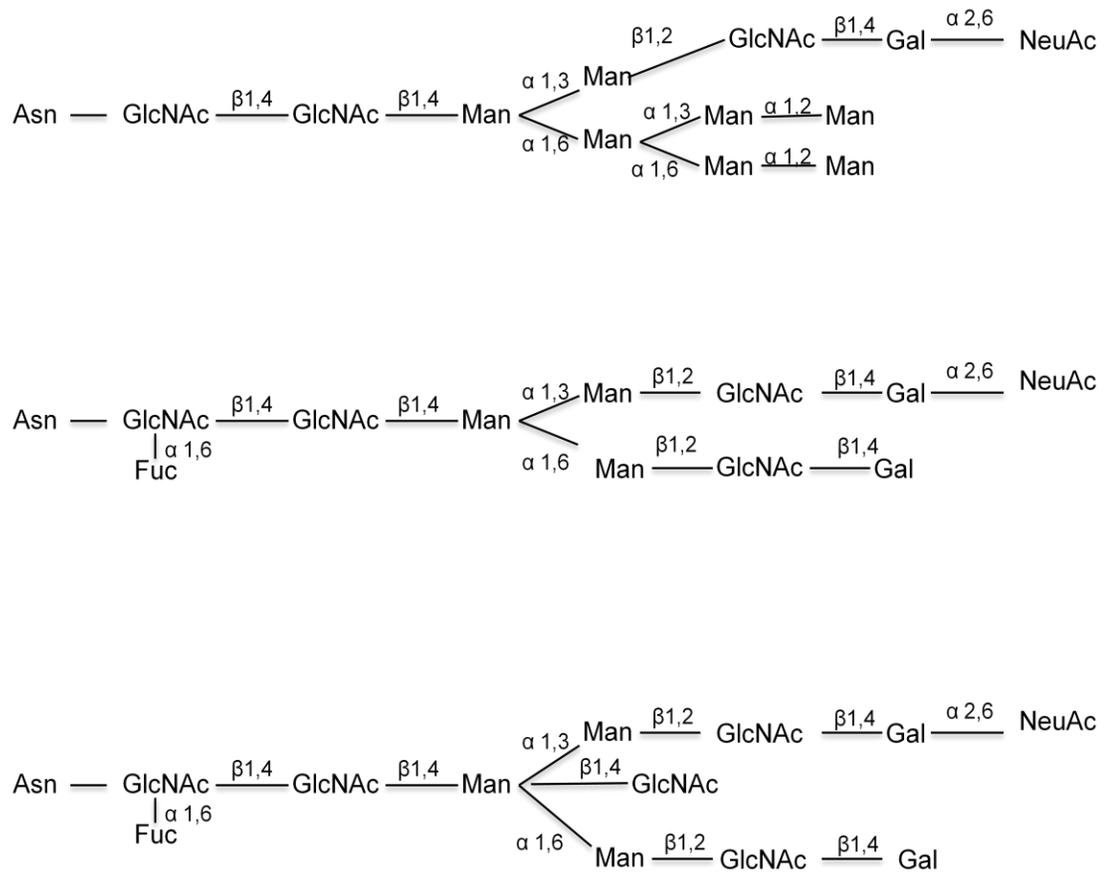


Figura 7. Estructuras mono-sialiladas encontradas en los sitios de glicosilación Asn-171, Asn-332 y Asn-395 de la IgM sérica humana.

Estas estructuras conforman el 70.9% del total de las estructuras oligosacáridas en la IgM. La última estructura es la isoforma predominante.

Fuente: Elaborado a partir de Arnold y col., 2005.

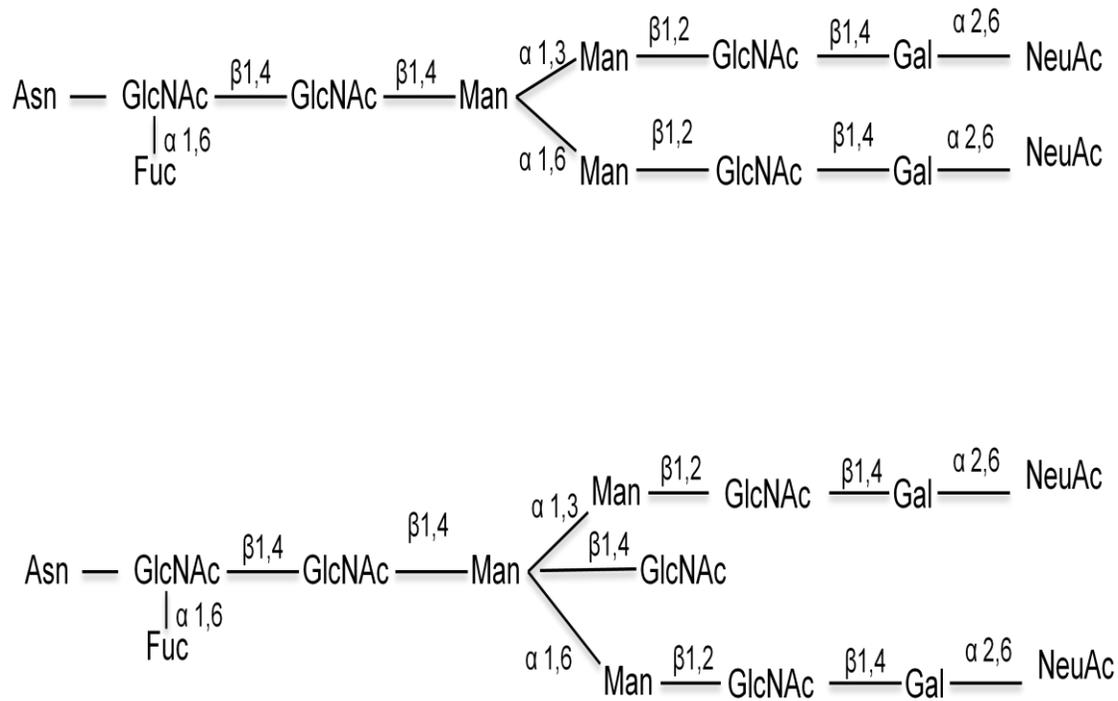


Figura 8. Estructuras di-sialiladas encontradas en los sitios de glicosilación Asn-171, Asn-332 y Asn-395 de la IgM sérica humana.

Fuente: Elaborado a partir de Arnold y col., 2005.

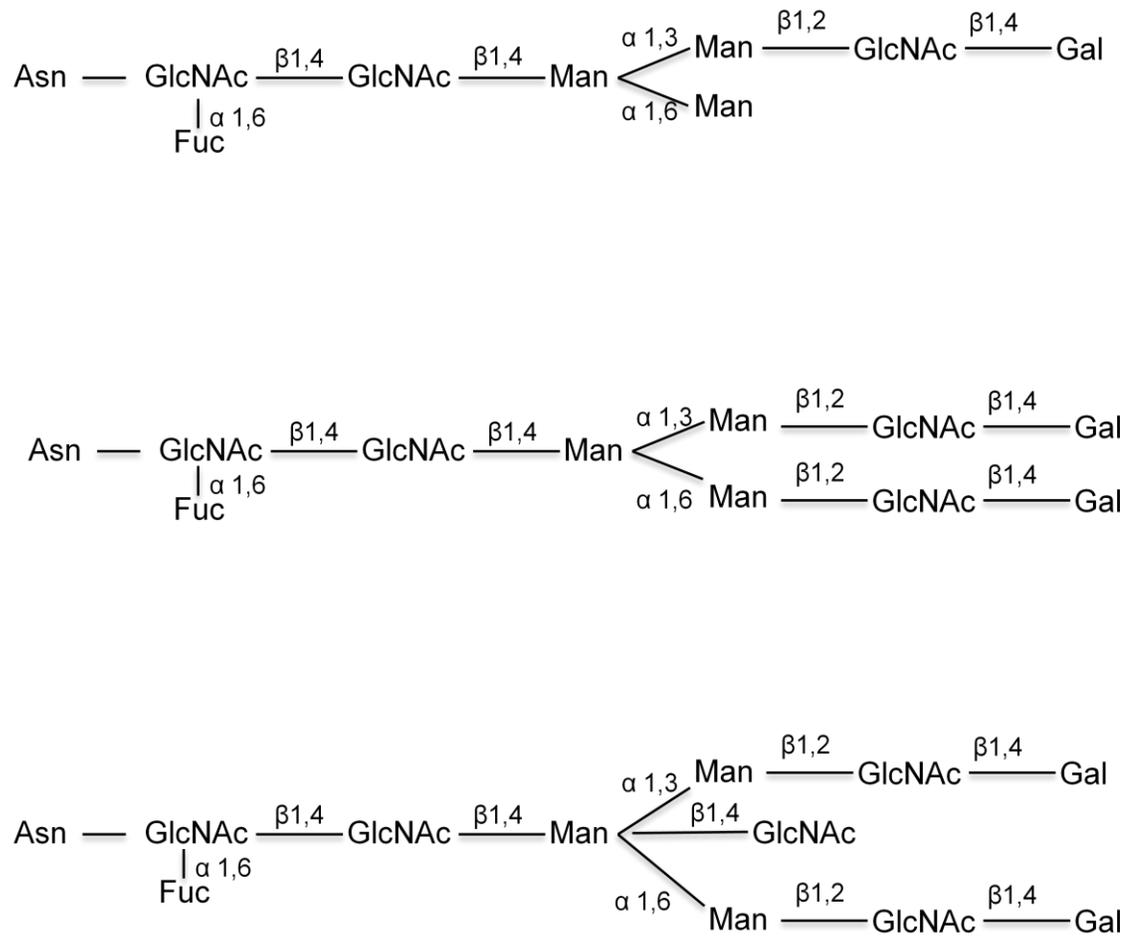


Figura 9. Estructuras asialiladas encontradas en los sitios de glicosilación Asn-171, Asn-332 y Asn-395 de la IgM sérica humana.

Fuente: Elaborado a partir de Arnold y col., 2005

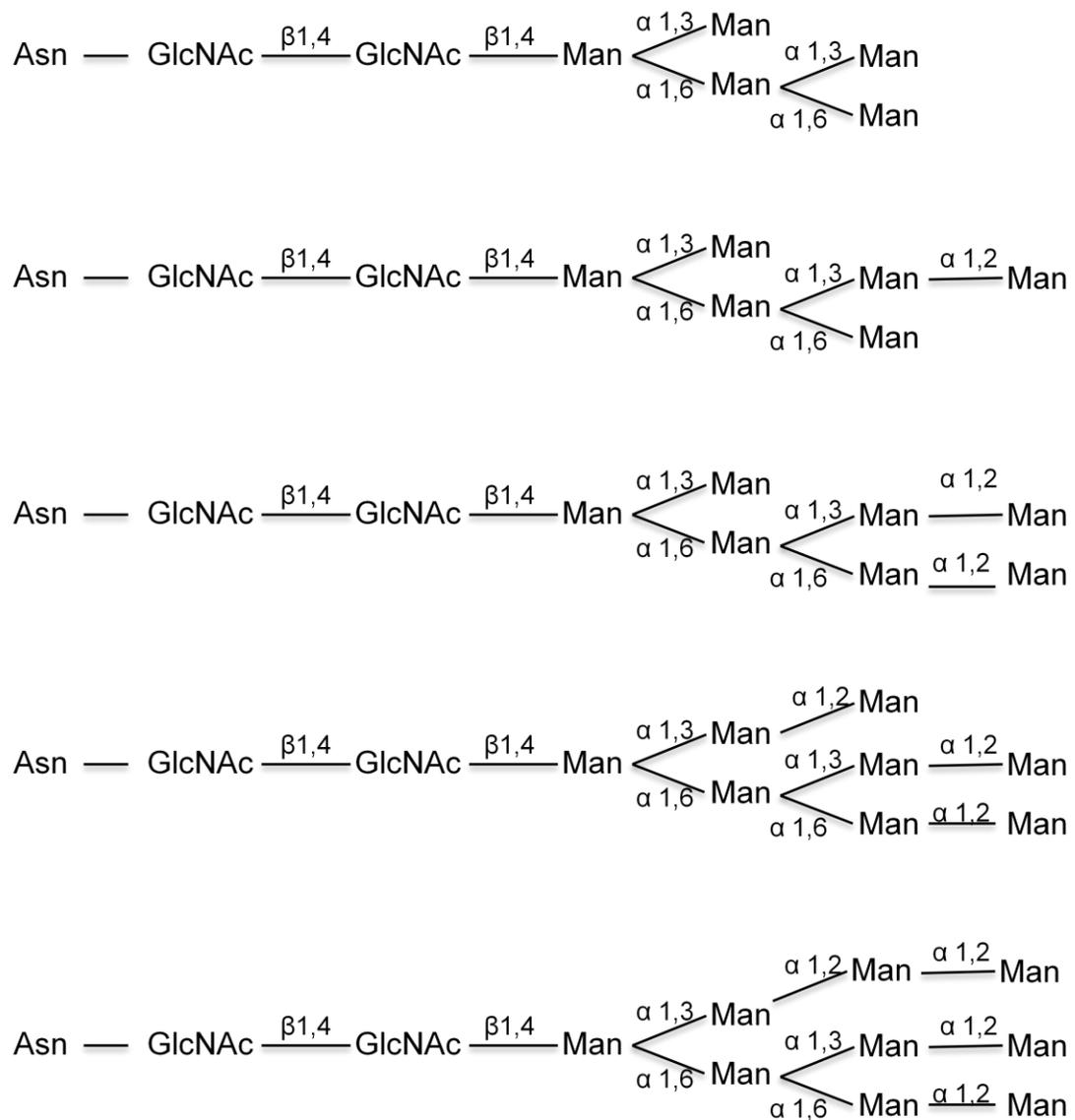


Figura 10. Glicoformas con alto contenido en manosa, identificadas en los sitios de glicosilación Asn- 402 y Asn-563 de la IgM sérica humana.

Fuente: Elaborado a partir de Arnold y col., 2005.

Disfunción Inmunológica en Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2

Los pacientes con DM2, presentan infecciones más frecuentemente que las personas sanas. Las infecciones son de difícil control y recurrentes, en especial, cuando los pacientes presentan un pobre control glicémico (Abrass, 1991; Bessman y Sapico, 1992; Geerlings y Hoepelman, 1999; Papanas y col., 2010). Las enfermedades más comunes a las que se enfrentan los pacientes con DM2, incluyen: las enfermedades producidas por hongos, tuberculosis pulmonar, bacteriemias, infecciones en el tracto urinario, hueso, piel y extremidades inferiores, que conllevan a la amputación (Papanas y col., 2010). Se estima, que del 50 al 70% de todos los pacientes que sufren amputaciones no traumáticas de miembros inferiores, la gran mayoría son a causa de infecciones y necrosis en tejidos blandos o hueso (Bessman y Sapico, 1992). Existe una amplia variedad de información contradictoria acerca de los cambios producidos en la inmunidad celular y humoral asociados con la diabetes (Abrass, 1991; Bessma, 1992; Delamaire y col., 1997; Geerlings y Hoepelman, 1999; Huseynova y col., 2010; Sukumaran, 2006), sin embargo, los estudios se enfocan en resolver la misma incógnita: la susceptibilidad del paciente diabético al desarrollo de infecciones (Geerlings y Hoepelman, 1999; Huseynova y col., 2010; Papanas y col., 2010).

Entre los cambios de la inmunidad humoral, que han sido relacionados con la severidad y progresión de los procesos infecciosos (Abrass, 1991; Bessman y Sapico, 1992; Delamaire y col., 1997; Geerlings y Hoepelman, 1999; Huseynova y col., 2010; Liberatore y Barbosa, 2005). en los pacientes con diabetes, están la producción reducida del factor 4 del complemento, la disminución en la respuesta de citocinas y la alteración en los niveles y estructura funcional de las inmunoglobulinas, que favorecen la formación de inmunocomplejos. Estudios en pacientes con DM en distintos estados de progresión, revelan que hay una producción de anticuerpos de la clase IgG con anomalías en su conformación y baja actividad funcional. Los anticuerpos, participan en la formación de pequeños y solubles inmunocomplejos que permanecen en circulación

por largos períodos de tiempo, incapaces de activar la vía clásica del complemento y realizar su función antigénica (Huseynova y col., 2010). Kennedy y col., 1994, estudiaron el efecto de la glicación sobre la cinética y afinidad de la IgG para unirse a un antígeno, y así poder explicar, la relación que existe entre la diabetes mellitus y el incremento en la susceptibilidad al desarrollo de infecciones. Ellos sugieren que los anticuerpos sufren cambios conformacionales a consecuencia de la unión covalente de residuos de glucosa, incrementándose así la repulsión entre el anticuerpo y el antígeno unido. La glicación afecta tanto a la región Fc como a la Fab, y puede ocurrir en un mismo anticuerpo, contribuyendo a la discapacidad funcional del anticuerpo. Esta discapacidad en la función de los anticuerpos, en combinación con otras alteraciones inmunitarias, juega un papel muy importante en el desarrollo de la susceptibilidad a infecciones en pacientes con diabetes mellitus. Hammes y col., en 1990, publicaron los resultados de estudios similares en los que determinaron un incremento significativo de IgA, IgM e IgG glicadas en pacientes con diabetes mellitus, en comparación con sujetos sanos; concluyeron que la discapacidad funcional de la IgM puede ser causada por la glicación no enzimática producida en la diabetes mellitus.

Con base en las evidencias planteadas, sabemos que los pacientes con DM son propensos al desarrollo de alteraciones inmunitarias innatas y adquiridas. Sin embargo, la información es contradictoria y por lo tanto no es determinante para resolver y esclarecer la gran incógnita de la susceptibilidad y la frecuencia, por la que los pacientes con DM2 desarrollan infecciones. Por esta razón, se han propuesto enfoques alternativos tales como los que van dirigidos a los cambios de glicosilación terminal que pudieran desarrollarse en las moléculas proteicas involucradas en la respuesta humoral, como las inmunoglobulinas, que sufren alteraciones en su conformación, funcionalidad y afinidad, tanto a antígenos como a proteínas del sistema del complemento, cuando se altera su estructura oligosacárida (Arnold y col., 2006; Arnold y col., 2005; Arnold y col., 2007; Hansen y col., 2004).

Alteración Funcional de Inmunoglobulinas a Consecuencia de Cambios en la Glicosilación

Existen estudios en los que se reporta la caracterización de la glicosilación de la IgM sérica humana, y el papel de los oligosacáridos en la activación del complemento (Arnold, 2005; Opdenakker, 1993). A pesar de que la información es muy útil, es insuficiente para cimentar la disfunción inmunológica en pacientes con DM2 a consecuencia de alteraciones en la glicosilación terminal de la IgM. Por ello, en este trabajo se describen algunas patologías en las que las inmunoglobulinas (IgG e IgA) y sus cambios de glicosilación están implicados en la patogénesis de la enfermedad. Además, los procesos de glicosilación son altamente sensibles a los cambios metabólicos crónicos (Gornik y col., 2009) y hay evidencias de cambios en la glicosilación de otras inmunoglobulinas en pacientes con DM2 (Vázquez-Moreno y col., 2001), por lo que es probable que en los pacientes diabéticos se presenten también alteraciones de glicosilación terminal en la IgM.

Malhotra y col., en 1995 demostraron que la alteración en la glicosilación de la IgG se asocia con artritis reumatoide (AR), enfermedad relacionada con el incremento de estructuras oligosacáridas con ausencia de galactosa terminal “glicofoma G0”, en la que el extremo terminal es la GlcNAc. Esto genera un modelo alternativo para la interacción de la IgG con el complemento a través de la unión a la lectina con afinidad a manosa (MBL, por sus siglas en inglés). Normalmente, la unión de la fracción C1q del complemento a la molécula de IgG es seguida del reconocimiento antigénico, pero cuando la inmunoglobulina se une a la MBL se activa el complemento sin que se requiera la fracción C1q. Además, en ausencia de galactosa, la MBL interactúa con la GlcNAc terminal de los oligosacáridos de la IgG, generando inmunocomplejos que se depositan en las articulaciones causando daño e inflamación.

Por otra parte, la nefropatía por IgA se caracteriza por la presencia de inmunocomplejos compuestos de IgA1 deficiente en galactosa y anticuerpos IgG

específicos contra los glicanos de la IgA1. Estos inmunocomplejos se depositan en el mesangio glomerular e inducen la glomerulonefritis (Suzuki y col., 2009). En contraste, con los hallazgos mencionados anteriormente, Vázquez-Moreno, 2001, al estudiar la IgA1 de un grupo de pacientes con DM2, encontraron concentraciones elevadas de IgA1 polimérica con alto contenido en ácido siálico. Sin embargo, se desconoce si los altos niveles de IgA1 son el resultado del incremento en su producción o de un deficiente mecanismo de aclaramiento, ya que los receptores implicados en el reconocimiento de la IgA son sensibles a los cambios de la estructura del oligosacárido, particularmente a la presencia de ácido siálico (Vázquez-Moreno y col., 2001). Al igual que en la IgG e IgA, también se han encontrado cambios en la glicosilación de la IgM. Sun y col., 1991, observaron, que la sustitución de Asn por Ser en la posición 406 de la cadena pesada μ de la IgM de ratón provoca una glicosilación aberrante en la Asn-402. Al estudiar el oligosacárido de la IgM modificada, encontraron una estructura de tipo híbrida que no contiene ácido siálico terminal en posición α 2-6 y α 2-3. En contraste con el oligosacárido mutante, el oligosacárido de la Asn-402 es complejo y contiene ácido siálico terminal, unido en α 2-6 a galactosa. Esta anomalía en la glicosilación, trae como resultado una IgM con deficiencias para activar la vía del complemento (Sun y col., 1991).

Los cambios de glicosilación asociados con procesos patológicos, no sólo se limitan a las inmunoglobulinas, también pueden extenderse a otras proteínas séricas, como lo demuestran Yasukawa, 2005, quienes observaron que al inducir inflamación a ratones con aceite de turpentina, se generaban cambios en la glicosilación de proteínas séricas, específicamente en el ácido siálico en uniones α 2-3, α 2-6 y α 2-8. Por otro lado, Poland, en el 2001 estudió los cambios en la glicosilación de las AGP (α -acid glycoproteins) en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, ya que este tipo de pacientes desarrollan disfunción endotelial acompañada de un ligero grado de inflamación. Los resultados arrojaron un incremento en la α 3- fucosilación de las AGP.

Los estudios presentados, sugieren que las modificaciones de glicosilación en cualquier proteína, desencadenan en mayor o menor proporción alteraciones en su funcionalidad. La importancia de la glicosilación en las inmunoglobulinas es fundamental, ya que los oligosacáridos proveen epitopes de reconocimiento, mantienen la estructura y estabilidad de las inmunoglobulinas. Además, los azúcares terminales específicos interactúan con las diversas lectinas del sistema inmune innato, proporcionando mecanismos de comunicación cruzada entre la inmunidad innata y la adaptativa (Arnold y col., 2007). De esta forma, cualquier alteración potencial en la glicosilación de la IgM producida a consecuencia de la diabetes mellitus, afectaría la funcionalidad de la molécula. Por todo esto, el objetivo del presente trabajo fue el de caracterizar los cambios potenciales de glicosilación terminal de la IgM sérica en pacientes con DM2.

MATERIALES Y METODOS

Tipo de Investigación

Se trata de un estudio transversal, observacional y analítico, en el que se comparó la glicosilación terminal de la inmunoglobulina M de un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, con relación a la de la IgM de un grupo de personas euglicémicas aparentemente sanas, pareado por sexo y edad con el grupo de pacientes. El análisis estadístico de los resultados cuantitativos se realizó con el programa NCSS 2001. El significado de las diferencias de las medias entre el grupo de pacientes y el grupo de controles fue estimado por la prueba T de Student.

Muestras de Estudio

Se purificó la IgM sérica en cuatro etapas cromatográficas, a partir de las muestras séricas de nueve pacientes con DM2 y de siete personas aparentemente sanas. Las muestras fueron seleccionadas de la base de datos del proyecto “Cuantificación Simultánea de la Inmunoglobulina A1, Proteína C Reactiva, y Homocisteína Plasmática, para Evaluar el Riesgo de Complicaciones Vasculares en Pacientes con DM2”, por lo que el muestreo fue de tipo no probabilístico, por conveniencia. El grupo de pacientes incluyó sujetos de ambos sexos, independientemente del tiempo de diagnóstico y del tratamiento. Los pacientes no presentaron artritis reumatoide, osteoartritis, neoplasias, trastornos autoinmunes y/o trastornos hepáticos no vinculados a la diabetes, ni infecciones en el momento de la toma de muestra sanguínea ni en las dos semanas previas a la toma de muestra.

Reactivos y Materiales

La anti IgM humana marcada con peroxidasa (específica para la cadena μ) producida en cabra, fue adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). La Sefarosa 6B utilizada para la síntesis de la Sefarosa altamente acetilada (Vázquez-Moreno y col., 1992) fue adquirida de Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) y la Sefarosa CL-6B-proteína-A de *Staphylococcus aureus*, la agarosa-anti IgA y la agarosa-anti IgM fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Las lectinas biotinizadas, *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin I (RCAI), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) y *Triticum vulgare* agglutinin (WGA), fueron obtenidas de Oxford GlycoSystems (NY, USA). Todos los demás reactivos de grado analítico fueron de Sigma-Aldrich. Todos los procesos cromatográficos fueron realizadas con el equipo de baja presión Econo Chromatographic System, de Bio-Rad (USA).

Cuantificación de Proteínas Séricas Totales de las Muestras Seleccionadas

Los sueros de los pacientes diabéticos y los controles fueron filtrados utilizando filtros de nylon de 0.45 μm (Corning corp., NY, USA) para posteriormente cuantificar la concentración proteica por el método de UV a 280 nm (Espectrofotómetro AquaMate, Thermo Corp., USA) (Aitken y Learmonth, 1996; Stoscheck, 1990).

Aislamiento de IgM por Medio de Cuatro Etapas Cromatográficas

El aislamiento de la IgM sérica, se realizó utilizando cuatro matrices cromatográficas en tándem. La primera etapa, consistió en aislar a las inmunoglobulinas totales del resto de las proteínas séricas, utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica en Sefarosa 6B altamente acetilada (AA). La fracción de elución conteniendo las inmunoglobulinas, se cargó a una matriz agarosa-anti IgA para separar la IgA total de la IgG y otras inmunoglobulinas. La fracción de lavado obtenida en agarosa-anti IgA fue cargada a una columna de Sefarosa CL-6B-Proteína A (modificado de Hage, 2006), para remover la IgG, y por último, se aisló la IgM con agarosa-anti IgM humana (Sigma-Aldrich).

Primera Etapa

El primer paso para la purificación de IgM, fue separar a las inmunoglobulinas del suero utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica. Para ello se utilizó una matriz de Sefarosa 6B altamente acetilada (Vázquez-Moreno y col., 1992). El gel hidrofóbico, con un volumen de cama de 12 cm³, fue equilibrado con 5 volúmenes de cama de Na₂SO₄ 0.5 M / PB (amortiguador de fosfatos) 20 mM, pH 7.2, a una velocidad de flujo de 1 mL/min. Posteriormente se aplicó a la fase estacionaria 1 mL de suero (de paciente con DM2 o control), previamente ajustado con 1 mL de Na₂SO₄ 1.0 M/ PB 20 mM, pH 7.2, a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. Las proteínas no adsorbidas a la matriz, fueron removidas con Na₂SO₄ 0.5 M / PB 20 mM, pH 7.2, hasta una lectura a 280 nm de 0.01 unidades de absorbancia. Las proteínas unidas específicamente a la matriz, fueron eluidas con PB 20 mM, pH 7.2. Por último la columna fue regenerada con guanidina-HCl 6 M, pH 7.0 y PB 20 mM, pH 7.2. El aislamiento de las inmunoglobulinas del suero humano, fue monitoreado espectrofotométricamente a 280 nm. El porcentaje de recuperación cromatográfica fue estimado mediante la

cuantificación proteica de las fracciones de lavado, elución y recuperación, y su comparación con la cantidad de proteína cargada.

Segunda Etapa

Una vez aisladas las inmunoglobulinas en la primera etapa, se prosiguió al aislamiento de la IgA total, para ello se utilizó una matriz cromatográfica de agarosa-anti IgA humana con un volumen de cama de 7.91cm^3 . La matriz fue equilibrada con 5 volúmenes cama de PB 20 mM, pH 7.2 a una velocidad de flujo de 0.5mL/min. Posteriormente se aplicó la fracción de elución de la etapa 1 (aproximadamente 5.5 mg de inmunoglobulinas en 24 ml de PB), a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. Las inmunoglobulinas no afines a la matriz, fueron removidas con PB 20 mM, pH 7.2 y la fracción de lavado se conservó para su utilización en la tercera etapa. Las IgA unidas específicamente a la matriz, fueron eluidas con una solución de glicina-HCl 0.05 M, pH 2.6 y colectadas en fracciones de 1 mL, que fueron neutralizadas inmediatamente con una gota de Trizma base 100 mM, pH 8.0. La IgA total aislada, se concentró y dializó contra PB 20 mM, pH 7.2, en centricones plus-10 (Millipore, USA) para ser almacenada para futuros estudios. La columna agarosa-anti IgA se regeneró con 10 volúmenes de PB 20 mM, pH 7.2 / azida de sodio 0.02%. Cada una de las fracciones fue monitoreada espectrofotométricamente a 280 nm y su concentración proteica así como el porcentaje de recuperación cromatográfica fueron estimados también a 280 nm (Vázquez-Moreno y col., 2001).

Tercera Etapa

Para el aislamiento de la IgG, se utilizó una matriz de Sefarosa CL-6B- Proteína-A (Sigma-Aldrich., USA), con un volumen de cama de 3.14 cm^3 . Primeramente, se equilibró el gel con 5 volúmenes de cama de PB 20 mM, pH 7.2, a una velocidad de

flujo de 0.5 mL/min. Posteriormente, se aplicó la fracción de lavado (aproximadamente 4.8 mg/31 mL) proveniente de la cromatografía de afinidad con agarosa-anti IgA (Etapa 2), a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. Las inmunoglobulinas no afines fueron removidas con PB 20 mM, pH 7.2 y las IgG unidas específicamente a la matriz fueron eluidas con una solución de glicina-HCl 0.05 M, pH 2.6 y colectadas en fracciones de 1 mL, que fueron neutralizadas inmediatamente con una gota de Trizma base 100 mM, pH 8.0. La IgG aislada, se concentró y dializó contra PB 20 mM, pH 7.2, en centricones plus-10 (Millipore, USA). La columna se regeneró con 10 volúmenes de PB 20 mM, pH 7.2/azida de sodio 0.02%. Cada una de las fracciones fue monitoreada espectrofotométricamente a 280 nm y su concentración proteica así como el porcentaje de recuperación cromatográfica fueron estimados también a 280 nm (modificado de Hage, 2006).

Cuarta Etapa

Para el aislamiento de la IgM, se utilizó una matriz de agarosa-anti IgM humana (Sigma-Aldrich., USA), con un volumen de cama de 2.0 cm³. Primeramente, se equilibró el gel con 5 volúmenes de cama de PB 20 mM, pH 7.2, a una velocidad de flujo de 0.5mL/min. Posteriormente, se aplicó la fracción de lavado (1.19 mg/300µL) proveniente de la cromatografía de afinidad con Sefarosa CL-6B-Proteína-A (Tercera etapa), a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. Las inmunoglobulinas no afines fueron removidas con PB 20 mM, pH 7.2 y las IgM unidas específicamente a la matriz fueron eluidas con una solución de glicina-HCl, 0.05 M, pH 2.6 y colectadas en fracciones de 1 mL, que fueron neutralizadas inmediatamente con una gota de Trizma base 100 mM, pH 8.0. La IgM aislada, se concentró y dializó contra PB 20 mM, pH 7.2, en centricones plus-10 (Millipore, USA). La columna se regeneró con 10 volúmenes de PB 20 mM pH 7.2 /azida de sodio 0.02%. Cada una de las fracciones fue monitoreada espectrofotométricamente a 280 nm y su concentración proteica así como el porcentaje

de recuperación cromatográfica fueron estimados también a 280 nm (modificado de Hage, 2006).

Estimación de la Pureza por SDS-PAGE e Inmunodetección

El grado de pureza se determinó en condiciones desnaturalizantes (con dodecil sulfato de sodio) y reductoras (con beta mercaptoetanol) en geles de poliacrilamida al 12% en cámara vertical Mini-PROTEAN (Bio-Rad Laboratories Inc., USA), a 90 volts constantes (modificado de Garfin, 2003). Para ello se prepararon dos geles de poliacrilamida al 12%; uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie R-250 y el otro se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (Bio-Rad Laboratories Inc., USA), utilizando una cámara semi-húmeda, a 120 mA constantes, por 40 minutos. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con solución de fosfatos salina 20 mM (PBS) con leche al 5% y Tween 20 al 0.02%, por 4 h a TA en agitación constante. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con PBS 20 mM, pH 7.2 -Tween 20 al 0.05% por 5 minutos en agitación constante. Para la inmunodetección de la IgM, la membrana de nitrocelulosa se incubó con antisuero monoclonal anti-IgM marcado con peroxidasa, en dilución 1:1,000 por 30 minutos a TA. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS 20 mM, pH 7.2 / Tween 20 al 0.05% por 5 minutos en agitación constante. La reacción fue revelada con diaminobencidina (*FAST* 3,3'-Diaminobenzidine, de Sigma-Aldrich., USA) (modificado de Burnette, 1981).

Caracterización de la Glicosilación Terminal de la IgM por ELLA

El lectinoensayo (ELLA, del inglés Enzyme-Linked Lectin Assay) es un método muy útil para monitorear los cambios en estructuras oligosacáridas de diferentes muestras, en una misma glicoproteína (Goodarzi y col., 2002). No obstante lo anterior, siempre es necesario estandarizar las condiciones analíticas utilizadas por otros investigadores, a las condiciones de trabajo particulares de cada laboratorio. En este trabajo, la precisión inter-ensayo del método (C.V. = 3.1%) se obtuvo mediante la medición de la misma muestra en varias ocasiones diferentes, y la precisión intra-ensayo se obtuvo mediante la medición de la misma muestra varias veces en la misma ocasión (C.V. = 2.8%).

Para realizar los ELLAs, se realizaron diluciones de cada una de las muestras de IgM previamente aislada, para obtener una concentración final de 10 µg / mL en amortiguador de carbonatos, pH 9.6 (Na₂CO₃ 15mM y NaHCO₃ 35 mM). Posteriormente, los pozos de ocho placas de poliestireno, Immuno 96 MicroWell (NUNC, Thermo Corp., USA) fueron recubiertos con 1 µg / 100 µl de las muestras previamente diluidas de pacientes y controles e incubadas por 12 h, a 4°C, con el fin de inmovilizar a la proteína. Después, se realizaron cuatro lavados consecutivos, con una solución Tris-HCl 0.05 mol/L, NaCl 0.15mol/L, Tween 20 al 0.05% (TBST). Posteriormente, los sitios disponibles en los pozos fueron bloqueados con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en TBST, por 2 h, a 37°C (Goodarzi y Turner, 1997). Las placas fueron lavadas dos veces con TBST y dos veces más con 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.5, conteniendo 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 150 mM NaCl y 0.1% Tween 20. Posteriormente, la IgM adsorbida se incubó con 100 µl de cada una de las lectinas biotiniladas: *Sambucus nigra* agglutinin (SNA), *Maackia amurensis* agglutinin (MAA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA), *Ricinus communis* agglutinin I (RCAI), *Lens culinaris* agglutinin (LCA.), *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) y *Triticum vulgare* agglutinin (WGA), con una concentración de 1 µg/mL en

TBS, pH 7.5, por 1h, a 37°C. Después de realizar cuatro lavados con TBST, pH 7.5, las placas se incubaron con estreptavidina-peroxidasa (Sigma-aldrich., USA), en dilución 1:1,000 en TBS, pH 7.5, por 1 h, a TA. Por último, se realizaron cuatro lavados con TBS pH 7.5 y se utilizaron tabletas de O- fenilendiamina (Sigma-aldrich., USA) para revelar la interacción de las lectinas con los oligosacáridos de la proteína. La lectura se realizó después de transcurridos 30 minutos a 415 nm en lector de Microplacas Benchmark (Bio-Rad., JAPÓN) (modificado de Goodarzi y col., 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de Proteínas Séricas Totales

La edad media de los pacientes, que fue de 67 años (± 8.8 años) no fue significativamente diferente ($p = 0.5$) con relación a la edad media de los controles que fue de 64 años (± 9.7). La cantidad promedio de proteínas totales en las muestras séricas de los pacientes, estimada espectrofotométricamente a 280 nm, fue de 68.04 ± 8.5 mg/mL, mientras que la de los controles fue de 61.44 ± 5.62 mg/mL. Las diferencias de concentración proteica influyeron en la cantidad de inmunoglobulina M purificada, siendo ésta mayor en el caso de los pacientes.

Purificación de la IgM Sérica por Cromatografía

La purificación de la IgM sérica se realizó en cuatro etapas cromatográficas en secuencia. El objetivo de la primera etapa, fue separar a las inmunoglobulinas del suero, utilizando cromatografía de interacción hidrofóbica. Gracias al carácter hidrofóbico de las inmunoglobulinas fue posible removerlas del resto de las proteínas séricas; su separación se basó en las interacciones hidrofóbicas entre las regiones no-polares de las proteínas y los grupos hidrofóbicos inmovilizados en la fase estacionaria (Ramos-Clamont y col., 2006). Para ello se utilizó una matriz de Sefarosa 6B altamente acetilada (Vázquez-Moreno y col., 1992), con un volumen de cama de 12 cm^3 , a la cual se aplicó 1 mL de suero (de paciente con DM2 o control) obteniéndose en promedio 5.53 mg de inmunoglobulinas totales en un volumen de elución de 24 mL. En el cromatograma típico (Figura 11), se observa el pico a (fracción de lavado) que corresponde a las proteínas no afines a la fase estacionaria con una concentración de 48.5 mg/52 mL. El pico b (fracción de elución) contiene a las inmunoglobulinas que se adsorbieron

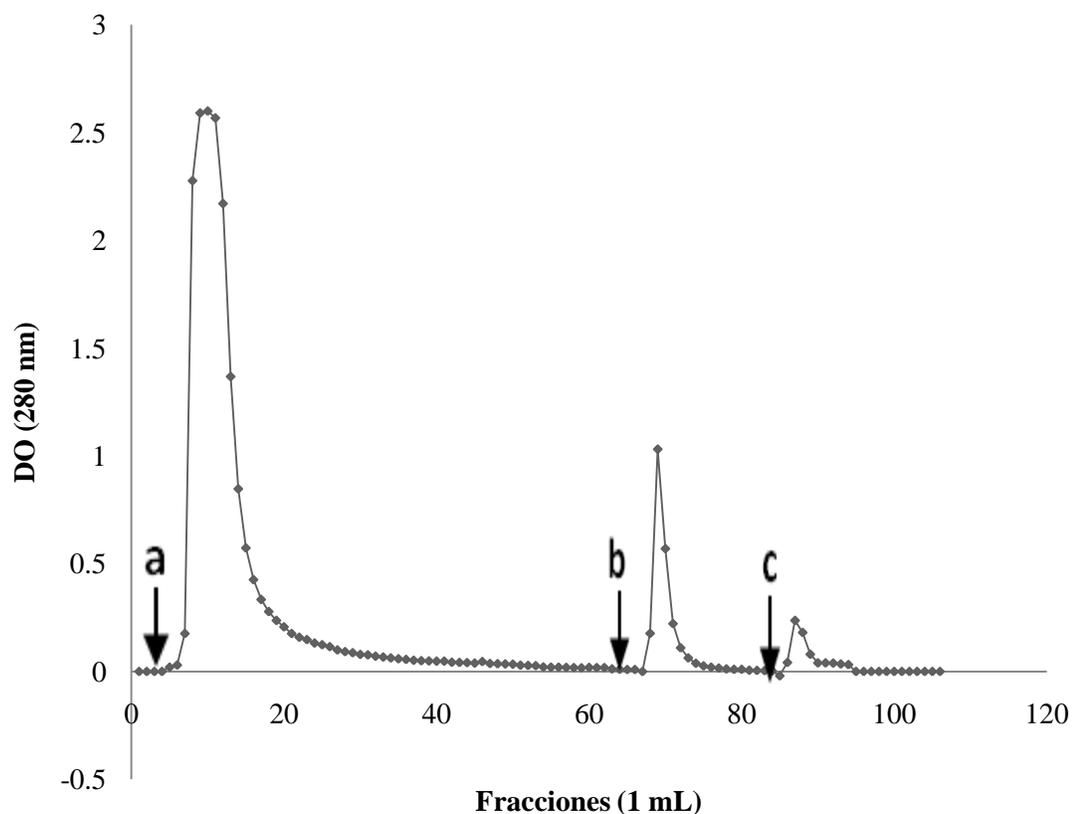


Figura 11. Cromatograma del aislamiento de inmunoglobulinas séricas en Sefarosa-6B altamente acetilada.

La muestra sérica con una concentración proteica de 61-68 mg fue aplicada a la matriz (a) y lavada con Na_2SO_4 0.5 M / PB 20 mM, pH 7.2. Las inmunoglobulinas afines a la fase estacionaria (b) fueron eluidas con PB 20 mM, pH 7.2. Las proteínas remanentes fueron removidas de la matriz con una solución de guanidina-HCl 6 M, pH 7.0 (c).

específicamente a la matriz cromatográfica, mientras que el pico c corresponde a la fracción de regeneración de aproximadamente 1.24 mg de proteína en 10 mL de hidrocloreuro de guanidina.

Los métodos más comúnmente utilizados en las primeras etapas para aislar a las inmunoglobulinas, involucran procesos de precipitación proteica con etanol, sulfato de amonio o propilenglicol, seguidos de métodos cromatográficos basados en intercambio iónico o cromatografía de exclusión de tamaño (Schneider y col., 1976). Sin embargo, los métodos de precipitación no son adecuados para mantener íntegra la estructura nativa de la proteína, por lo tanto la cromatografía de interacción hidrofóbica fue ideal para la separación de inmunoglobulinas del resto de las proteínas del suero humano debido a que no se alteró su conformación proteica (Jennissen, 2005).

En la segunda etapa se prosiguió con el aislamiento de la IgA total; algunas de las técnicas comúnmente utilizadas en la purificación de esta inmunoglobulina incluyen la precipitación con sales o alcohol, la utilización de cromatografía de intercambio aniónico y la agarosa-jacalina, siendo esta última una herramienta útil para la separación de las subclases de IgA (Álvarez y col., 2010). Sin embargo la finalidad de esta etapa fue la de remover a la IgA total del resto de las inmunoglobulinas, es por eso que la matriz cromatográfica elegida fue la agarosa-anti IgA humana, con un volumen de cama de 7.91cm^3 . Se aplicaron las inmunoglobulinas aisladas de la primera etapa cromatográfica (aproximadamente 5.5 mg/24 mL) a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. En la figura 12 se observa el cromatograma característico del aislamiento de la IgA total; el pico “a” contiene las inmunoglobulinas que no se adsorbieron a la matriz (fracción de lavado) en una concentración aproximada de 4.8 mg/31mL; esta fracción fue almacenada para su posterior utilización en la etapa tres. El pico b contiene a la IgA total (fracción de elución) con una concentración promedio de a 0.36 mg/ 16 mL.

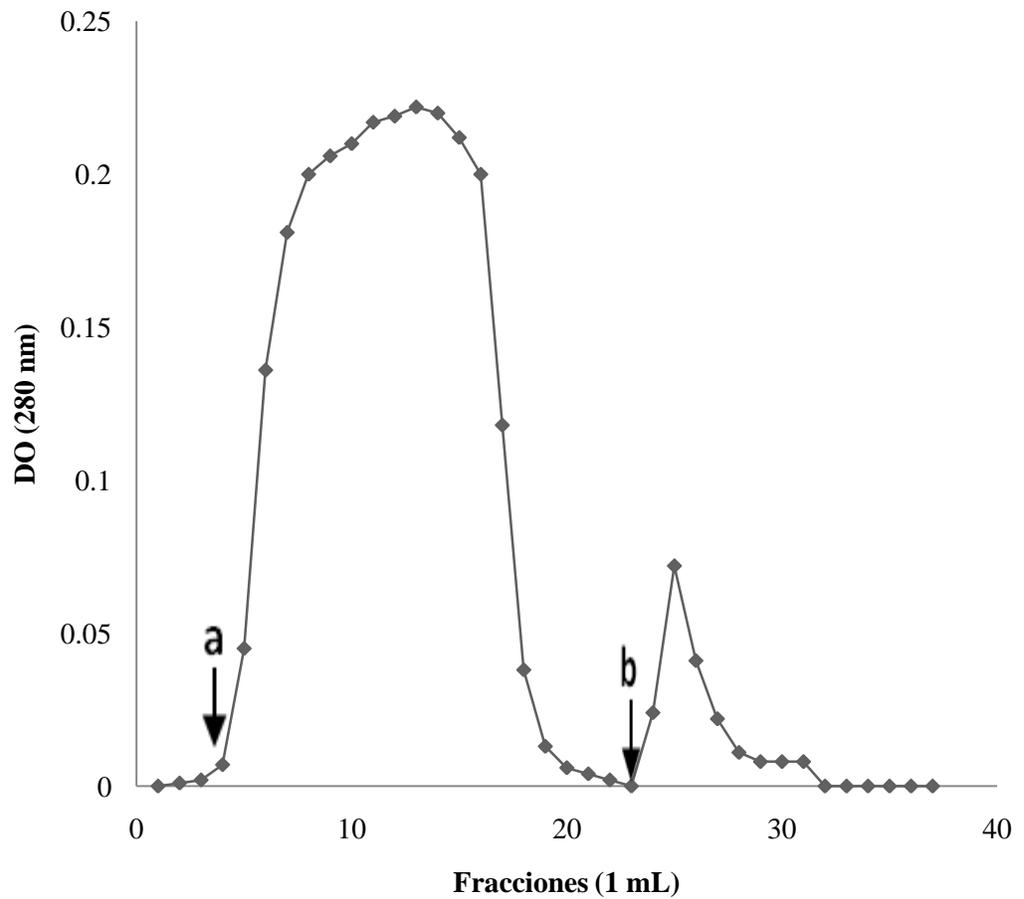


Figura 12. Cromatograma del aislamiento de IgA total en agarosa-anti IgA.

La muestra (5.5 mg en 24 ml) proveniente de la fracción de elución de la primera etapa cromatográfica, fue aplicada a la fase estacionaria (a) y lavada con PB 20 mM, pH 7.2 y la IgA total que se adsorbió a la matriz fue eluida con glicina-HCl 0.05 M, pH 2.6 (b).

La remoción de la IgA total fue crucial en el proceso de purificación de la IgM, ya que la IgA presenta cierta afinidad por la proteína A y la agarosa-anti IgM (Hage, 2006). De esta manera, se evitó la contaminación de la fracción IgM que se obtendría en la cuarta etapa cromatográfica y la interferencia de la IgA al momento de realizar la caracterización de la glicosilación terminal de la IgM, debida a que la IgA es una glicoproteína con abundantes sitios y estructuras oligosacáridas (Mattu y col., 1998).

En la tercera etapa cromatográfica se logró la remoción de la IgG sérica, utilizando una matriz de afinidad Sefarosa CL-6B-Proteína A (Sigma-Aldrich., USA). La afinidad de la IgG por la proteína A, una proteína que se obtiene de la pared celular de *Staphylococcus aureus*, es ampliamente reconocida por lo que actualmente es uno de los métodos preferidos para la purificación de IgG total (Hage, 2006). A la matriz cromatográfica, que tenía un volumen de cama de 3.14 cm³, se le aplicó la fracción de lavado (4.8 mg/31 mL) proveniente de la segunda etapa cromatográfica, a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. En el cromatograma típico de la purificación de la IgG (Figura 13) se observa el pico a, que corresponde a las inmunoglobulinas que no se adsorbieron a la matriz (fracción de lavado) de aproximadamente 1.52 mg/ 38 mL. Esta fracción se concentró hasta 1 mg / 300μL y fue almacenada para la cuarta y última etapa cromatográfica, el pico b, contiene a la IgG (fracción de elución) con una concentración de 2.18 mg/ 8.8 mL. En la cuarta etapa cromatográfica se utilizó una matriz de agarosa-anti IgM, para aislar a la inmunoglobulina M. En la mayoría de los casos en los que se purifica esta inmunoglobulina, es necesario utilizar largos procesos cromatográficos, y grandes volúmenes de muestra (Hage, 2006). La complejidad en su aislamiento radica en su estructura: una proteína de gran tamaño (950 KDa), altamente glicosilada y muy termolábil, todo esto, aunado a las bajas concentraciones séricas de IgM, de aproximadamente 2.5 mg/ mL, dificultan su purificación (Arnold y col., 2006; Hage, 2006).

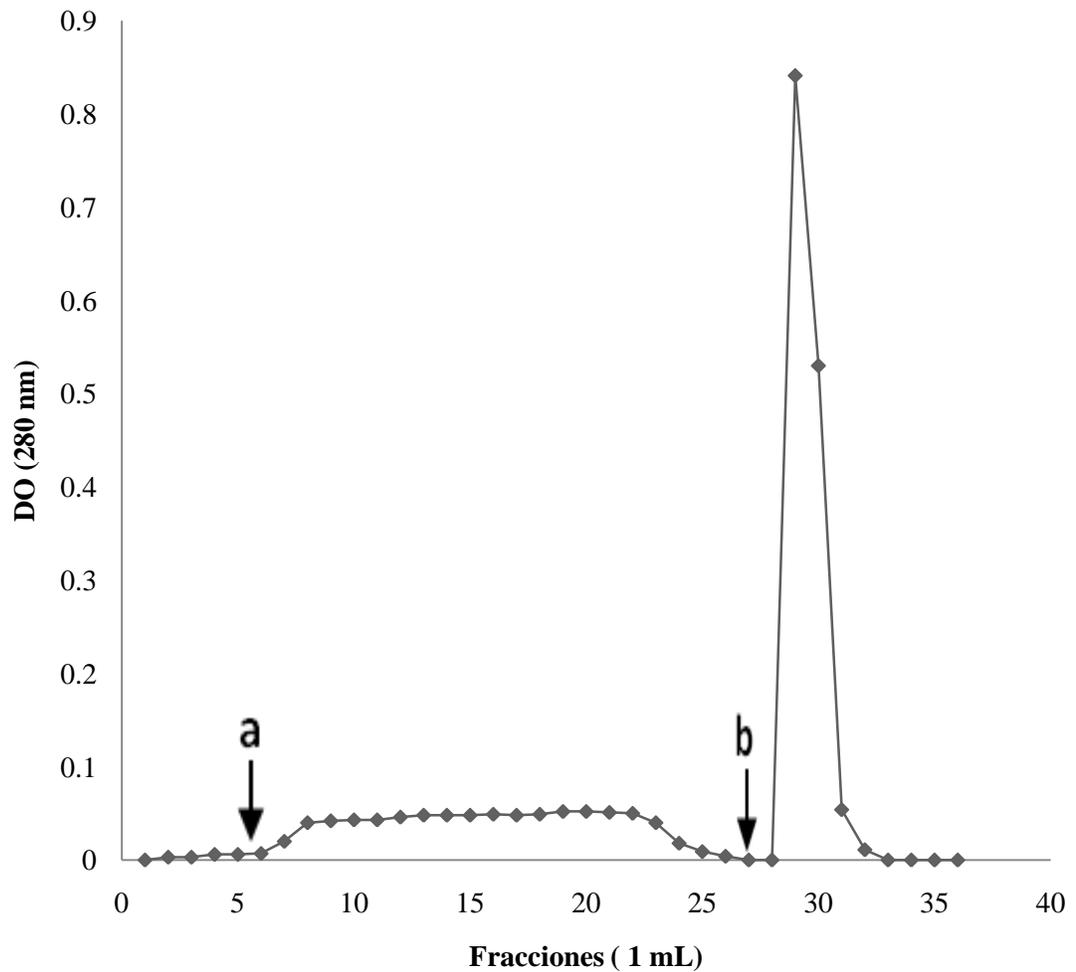


Figura 13. Cromatograma del aislamiento de la IgG sérica en Sefarosa CL-6B-proteína A.

La muestra (4.8 mg/31 mL) proveniente de la fracción de lavado de la segunda etapa cromatográfica, fue aplicada a la fase estacionaria (a) y lavada con PB 20 mM, pH 7.2. La IgG que se adsorbió a la matriz fue eluida con glicina-HCl 0.05 M, pH 2.6 (b)

A la matriz cromatográfica agarosa-anti IgM (Sigma-Aldrich, USA), que tenía un volumen de cama de 2 cm³, se le aplicó la fracción de lavado (1 mg / 300 µL) proveniente de la tercera etapa cromatográfica, a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. En el cromatograma típico del aislamiento de la IgM (Figura 14) se observa el pico a, que corresponde a las inmunoglobulinas que no se adsorbieron a la matriz (fracción de lavado) de aproximadamente 0.59 mg / 37 mL. El pico b contiene a la IgM (fracción de elución) con una concentración de 0.37 mg / 9mL, esta fracción se concentró hasta 0.21 mg en 350 µL.

La purificación de inmunoglobulinas usando matrices de inmunoafinidad, es una de las técnicas más usadas en los procesos de separación cromatográfica, ya que presentan un alto rendimiento y capacidad (Hage, 2006). Sin embargo, en este trabajo se demostró que para obtener buenos resultados deben usarse como parte de un esquema cromatográfico de varias etapas, especialmente cuando se trata de aislar inmunoglobulinas séricas debido a que los anticuerpos ligados a la fase estacionaria presentaron afinidad por otras inmunoglobulinas que contaminaron las fracciones de elución significativamente en los ensayos cromatográficos preliminares (datos mostrados más adelante). Con el esquema de cuatro etapas cromatográficas, se logró evitar la interferencia de las proteínas séricas más abundantes en el suero, tales como la albumina, IgG e IgA. Su eliminación, constituyó un paso importante para reducir la interferencia potencial que podrían ejercer en el análisis de afinidad a lectinas.

Estimación de la Masa Molecular y de la Pureza de la IgM

Para la estimación de la masa de la IgM obtenida en la última etapa cromatográfica, la fracción de elución fue cargada en un gel SDS-PAGE al 12% en condiciones desnaturizantes y reductoras. En el carril numero 1 se cargaron 5 µL de una mezcla de proteínas de masa conocida (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio-Rad, USA).

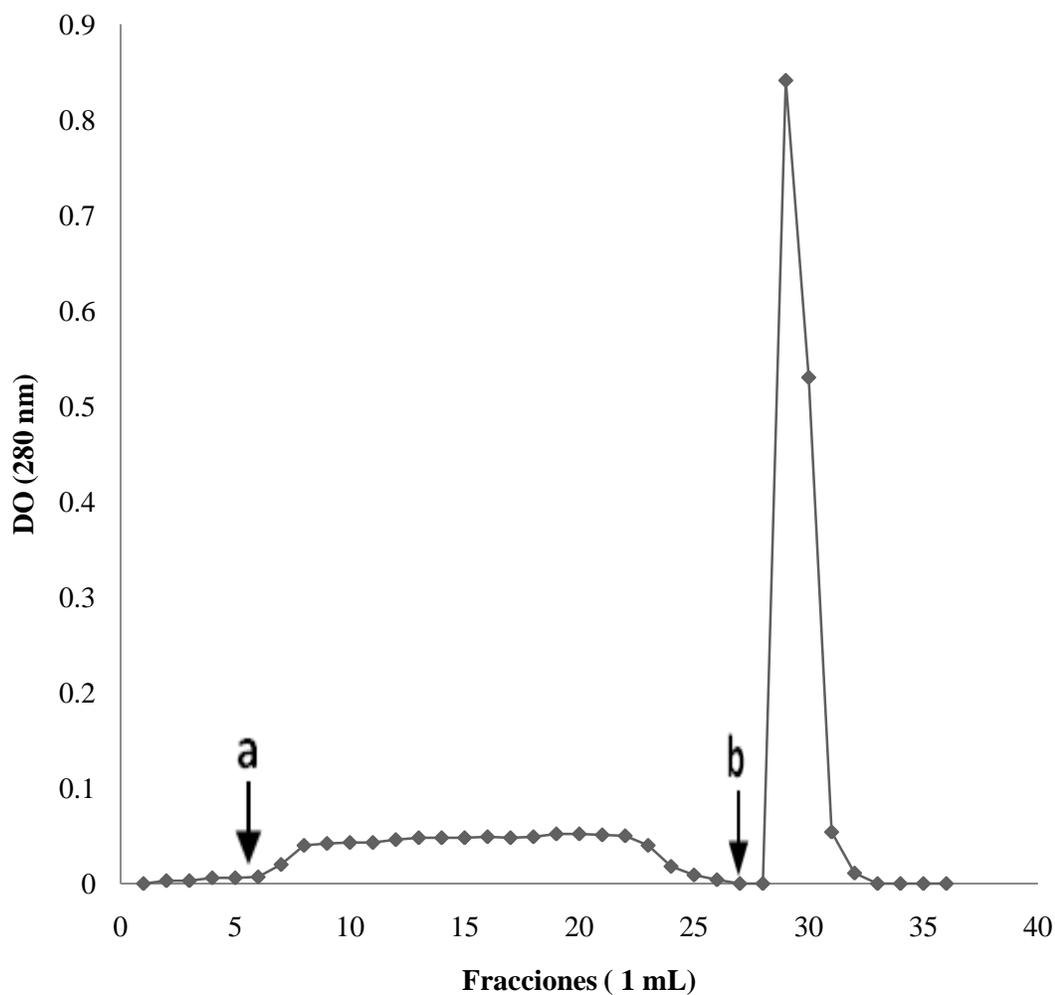


Figura 14. Aislamiento de IgM sérica, utilizando agarosa-anti IgM humana.

La fracción de lavado obtenida de la cromatografía de afinidad Sefarosa-proteína A, concentrada a 1 mg / 300 μ L se cargó a la columna de agarosa-anti IgM (a) con volumen de cama de 2 cm^3 , a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min. Las proteínas no afines a la matriz fueron removidas con PB 20 mM, pH 7.2 y las proteínas adsorbidas 0.37 mg / 9 mL fueron eluidas (b) con glicina-HCl, 0.05M, pH 2.6.

En el carril 2, se aplicaron (26 μ g de IgM y 9 del amortiguador 2 x). El gel se tiñó con azul de Coomassie R-250, se determinó la distancia de migración de las bandas y con los datos obtenidos se construyó una recta entre el log de la masa molecular (molecular weight; MW) y la movilidad relativa de las cadenas de IgM (Figura 15) (Garfín, 2003). Con la ecuación de la recta se estimó la masa relativa aproximada de la cadena pesa μ , de masa molecular de 77 KDa, este resultado concuerda con el reportado por (Ahmad-Zadeh y col., 1971). Paralelamente se corrió un gel bajo las mismas condiciones electroforéticas, con IgM en cada uno de los carriles, que no fue teñido y en cambio fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa para la inmunodetección de la IgM con un antisuero monoclonal anti-IgM humana marcado con peroxidasa, el antisuero reconoció específicamente las cadenas pesadas de la inmunoglobulina (Figura 15).

Comparación y Comprobación de la Pureza de la IgM

Se realizó un ensayo por separado para comparar el grado de pureza de la IgM obtenida, a partir de 500 μ L de suero humano total, en el esquema cromatográfico de cuatro etapas, con relación al esquema usando únicamente la columna de inmunoafinidad agarosa-anti IgM. En la figura 16, puede observarse la electroforesis SDS-PAGE al 12 % de las fracciones de elución obtenidos con cada uno de los esquemas antes descritos. El carril 2, contiene IgM obtenida del esquema cromatográfico de cuatro etapas. El carril 3, contiene la fracción de elución obtenida de la columna de agarosa-anti IgM; se observa que esta última fracción contiene mayor cantidad de proteínas séricas contaminantes, en comparación con la fracción de IgM obtenida del esquema cromatográfico en cuatro etapas.

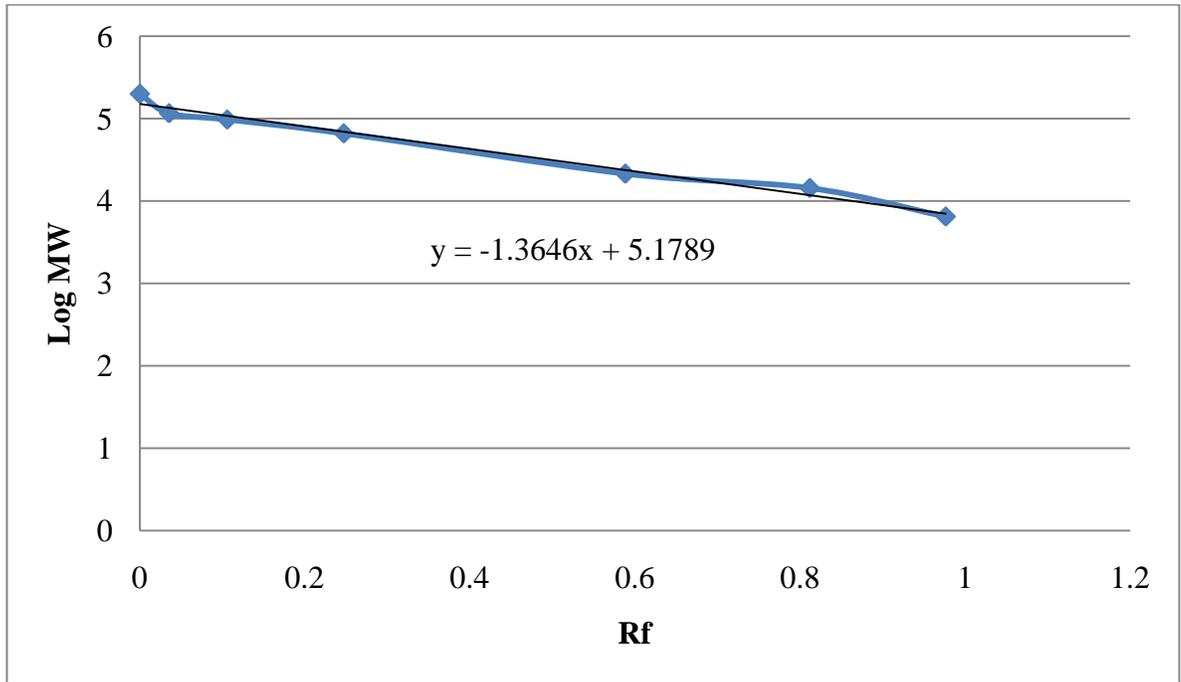


Figura 15. Curva generada entre el Log de la masa molecular de los estándares y la movilidad relativa.

A partir de la ecuación de la curva se calculó la masa molecular de la banda de IgM.

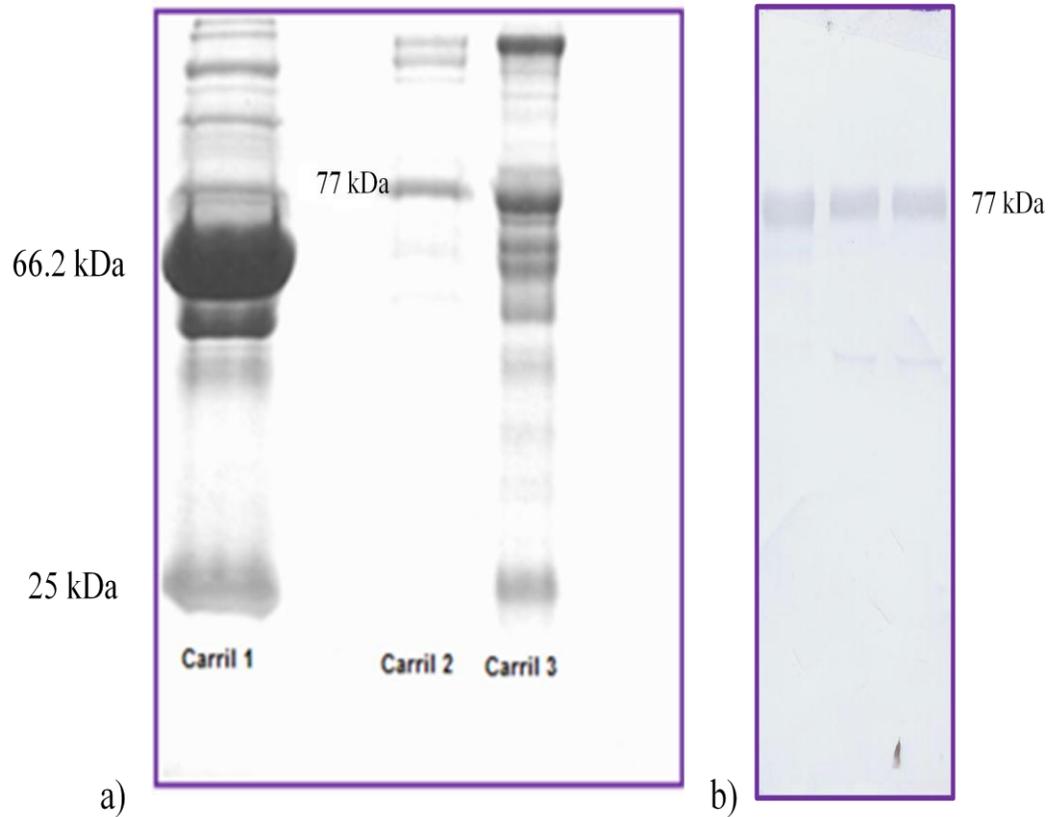


Figura 16. SDS-PAGE e Inmunodetección de la IgM.

a) Comparación de las fracciones cromatográficas de elución obtenidas mediante dos esquemas cromatográficos. Carril 1: suero total; se observa la banda de 62.2 KDa predominante que corresponde a la albúmina. Carril 2: fracción de IgM aislada por el esquema cromatográfico en cuatro etapas, se observa el enriquecimiento con la banda de 77 KDa correspondiente a la cadena pesada μ de la IgM. Carril 3: fracción de elución obtenida con agarosa-anti IgM aplicando directamente el suero total por la matriz. b) inmunodetección de la banda de 77 KDa, con el antisuero monoclonal anti-IgM humana marcado con peroxidasa (Sigma-aldrich., USA); el antisuero reconoció específicamente las cadenas pesadas de la inmunoglobulina M de los carriles 1, 2 y 3.

Para determinar el nivel de contaminación de la IgM, obtenida con el esquema de cuatro etapas, con otras inmunoglobulinas, se realizó una electroforesis en la que se aplicaron 26 µg de IgM aislada. Las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa, que fue incubada con anti-IgM peroxidasa. Posteriormente, la membrana fue incubada con anti-IgG peroxidasa y anti-IgA humana producida en conejo. El antisuero secundario usado para el ensayo con la anti-IgA no marcada, fue el antisuero anti IgG de conejo biotinilado y producido en cabra y las interacciones fueron reveladas con avidina-peroxidasa. Los antisueros fueron usados en una dilución 1:4,000. La membrana de nitrocelulosa fue revelada con diaminobencidina (*FAST DAB* tablets, “3,3’-Diaminobenzidine”; de Sigma-Aldrich., USA). El resultado del ensayo puede observarse en la figura 17, mismo que demuestra el alto grado de pureza de la IgM.

Electroforesis de las Fracciones de Lavado y Elución de Cada Etapa Cromatográfica

Las fracciones de lavado y elución, obtenidas en cada etapa cromatográfica del esquema de cuatro etapas, se analizaron mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% (Figura 18). En el carril 1, se cargaron 5 µL de marcador de masa molecular. En el carril 2, se cargó 1 µg de suero total. En el carril 3, se aplicó la fracción de elución de la cromatografía de hidrofobicidad (AA); esta fracción estaba enriquecida en mayor proporción por las IgM, IgA e IgG, lo que concuerda con los resultados previamente reportados por Ramos-Clamont y col., 2006. En el carril 4, se aplicó la fracción de lavado de la cromatografía de afinidad agarosa-anti IgA, observándose la ausencia de la IgA en el perfil electroforético. En el carril 5, se aplicó la fracción de lavado de la cromatografía de afinidad Sefarosa CL-6B-proteína A; esta matriz permitió remover la IgG de la fracción que contenía la IgM. En el carril 6, se cargó la fracción de lavado proveniente de la cromatografía de afinidad agarosa-anti IgM; con esta etapa se observó la remoción de las proteínas hidrofóbicas arrastradas desde la primera etapa cromatográfica.

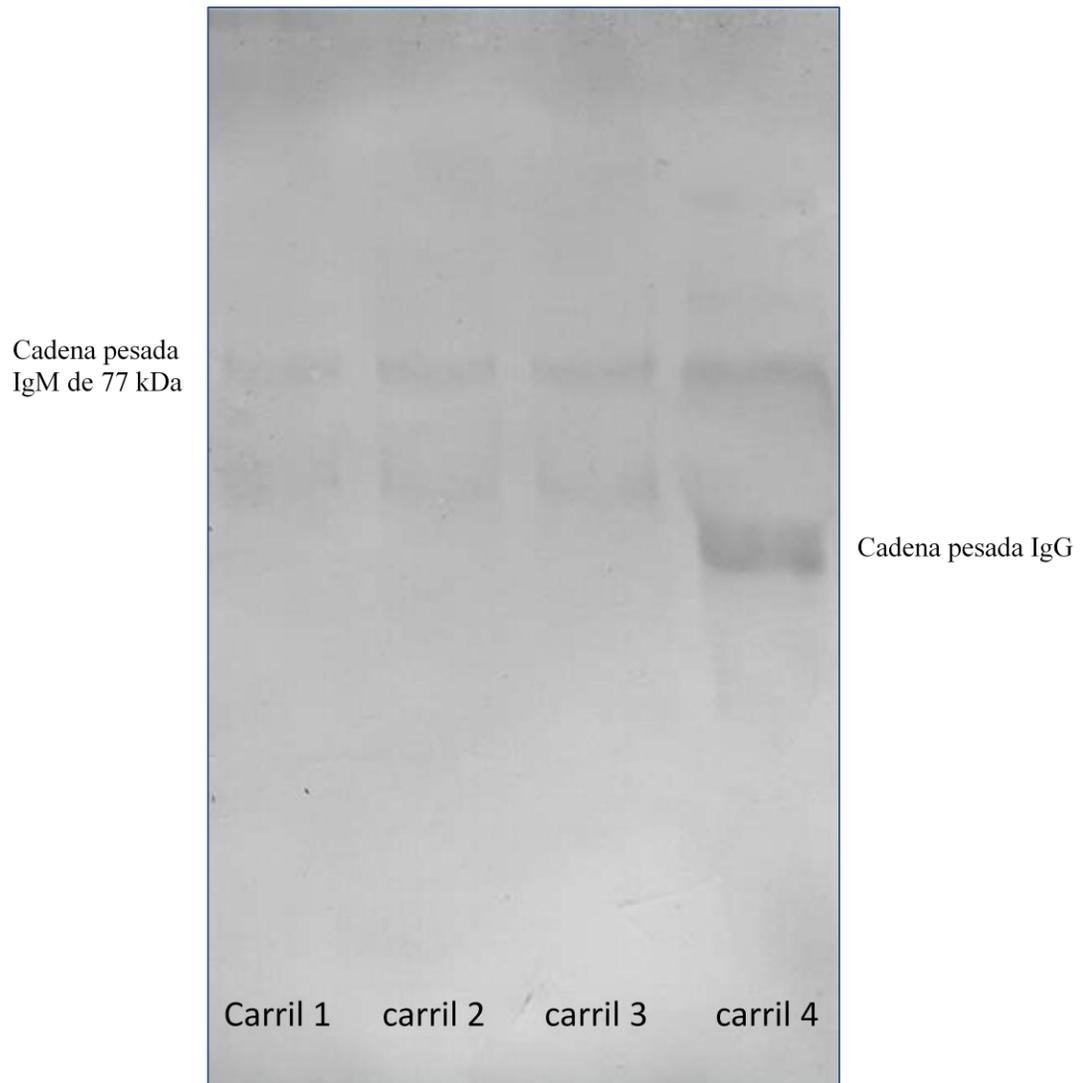


Figura 17. Comprobación del grado de pureza de la IgM sérica.

La membrana de nitrocelulosa fue incubada con anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM. Los carriles 1-3, muestras a la IgM purificada; no se observan bandas correspondientes a otras inmunoglobulinas, sólo la banda característica de la cadena pesada μ de la IgM. El carril 4, corresponde a una muestra de suero total; se observa la banda de IgM y la banda de IgG.

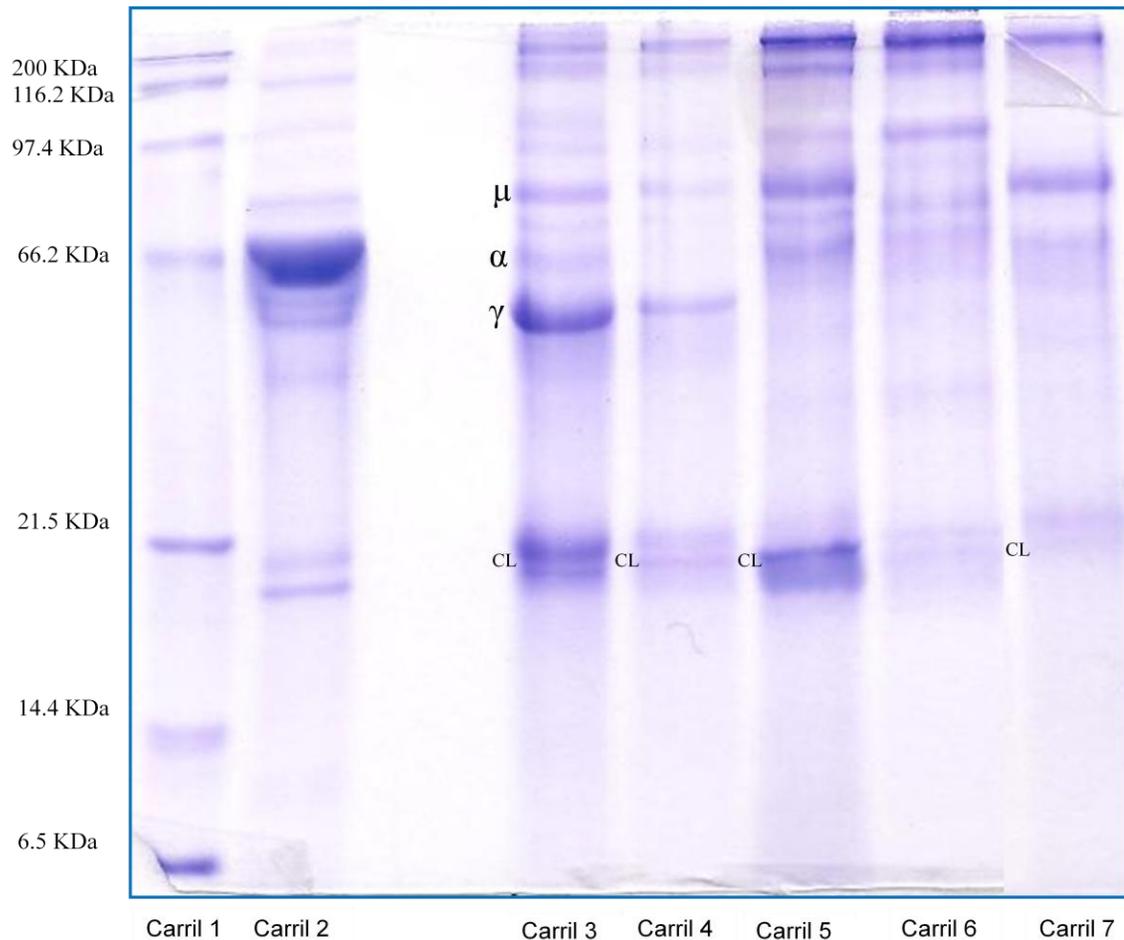


Figura 18. Electroforesis de las fracciones de lavado y elución de cada etapa cromatográfica.

Carril 1, marcadores de masa molecular. Carril 2, suero total. Carril 3, fracción de elución AA. Carril 4, fracción de lavado (Fxl) de anti-IgA. Carril 5, Fxl de Proteína A. Carril 6, Fxl de anti-IgM. Carril 7, fracción de elución de anti-IgM (IgM aislada). α corresponde a la cadena pesada de la inmunoglobulina A; γ , a la de la inmunoglobulina G; μ , a la de la inmunoglobulina M. CL, son las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas. Se cargaron 25 μ L de cada una de las fracciones en los pozos correspondientes.

En el carril 7, se aplicó la fracción de elución de esta última etapa cromatográfica; el perfil electroforético mostró una banda de 77 kDa perteneciente a la IgM. Las bandas de masa molecular mayor a 77 kDa, observadas en los carriles 5 y 7, corresponden a las de las formas poliméricas no reducidas de la IgM reportadas por Kownatzki y col., en 1973. En su estudio, ellos determinaron la sensibilidad de los puentes disulfuro a la desnaturalización a distintas concentraciones de dithiothreitol.

Estimación de la Glicosilación Terminal de la IgM

La comparación de la glicosilación terminal de la IgM de pacientes con DM2 y controles se realizó por ELLA, para ello se utilizó una batería de lectinas vegetales con afinidad específica hacia uno o un grupo de carbohidratos. Las lectinas utilizadas fueron SNA, MAA, PNA, WGA, RCAI, ECA, Con A y LCA. En primera instancia, las señales emitidas por la interacción de cada una de las lectinas con el oligosacárido de la IgM, fue analizada individualmente. Se observó que la media de la densidad óptica producida por la lectina SNA, que tiene marcada afinidad por residuos de ácido siálico en uniones α 2-6 (Wiederschai, 2009), fue significativamente menor en los pacientes en comparación con la media de la densidad óptica de los controles; esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0.02$) (Tabla I) (Figura19). La disminución de la señal observada en el grupo de pacientes, indica que la IgM está desialilada a expensas del ácido siálico en uniones α 2-6, ya que los oligosacáridos de los sitios conservados no poseen ácido siálico en uniones α 2-3 (Arnold y col., 2005). Se sabe que las alteraciones en el contenido de ácido siálico modifican las propiedades biológicas de la molécula, como: la inmunogenicidad, su actividad biológica, su tasa de aclaramiento y su capacidad para activar la vía clásica del complemento (Muraoka y Shulman, 1989; Sun y col., 1991; Wormald y col., 1991). Además, el ácido siálico de las inmunoglobulinas determina su vida media; con la disminución en la cantidad de ácido siálico terminal en los oligosacáridos de la IgM, se esperaría la aceleración del mecanismo de aclaramiento

Tabla I. Densidad óptica media obtenida por la interacción entre las lectinas y la IgM.

Lectina	Pacientes ^a	DE	Controles ^b	DE	Valor de p
SNA	0.101	± 0.0410	0.140	± 0.0180	< 0.02
MAA	0.069	± 0.0065	0.075	± 0.0055	< 0.04
PNA	0.076	± 0.0046	0.084	± 0.0048	< 0.01
RCAI	0.110	± 0.0292	0.143	± 0.0272	< 0.03
ECA	0.152	± 0.0632	0.214	± 0.0357	< 0.03
WGA	0.043	± 0.0021	0.041	± 0.0016	< 0.03
LCA	0.793	± 0.3730	0.883	± 0.1190	= 0.52
Con A	1.232	± 0.6770	1.628	± 0.1430	= 0.11

Los valores son expresados como medias ± la desviación estándar (DE).

^a Nueve sujetos constituyeron el grupo de pacientes.

^b Siete sujetos constituyeron el grupo de controles.

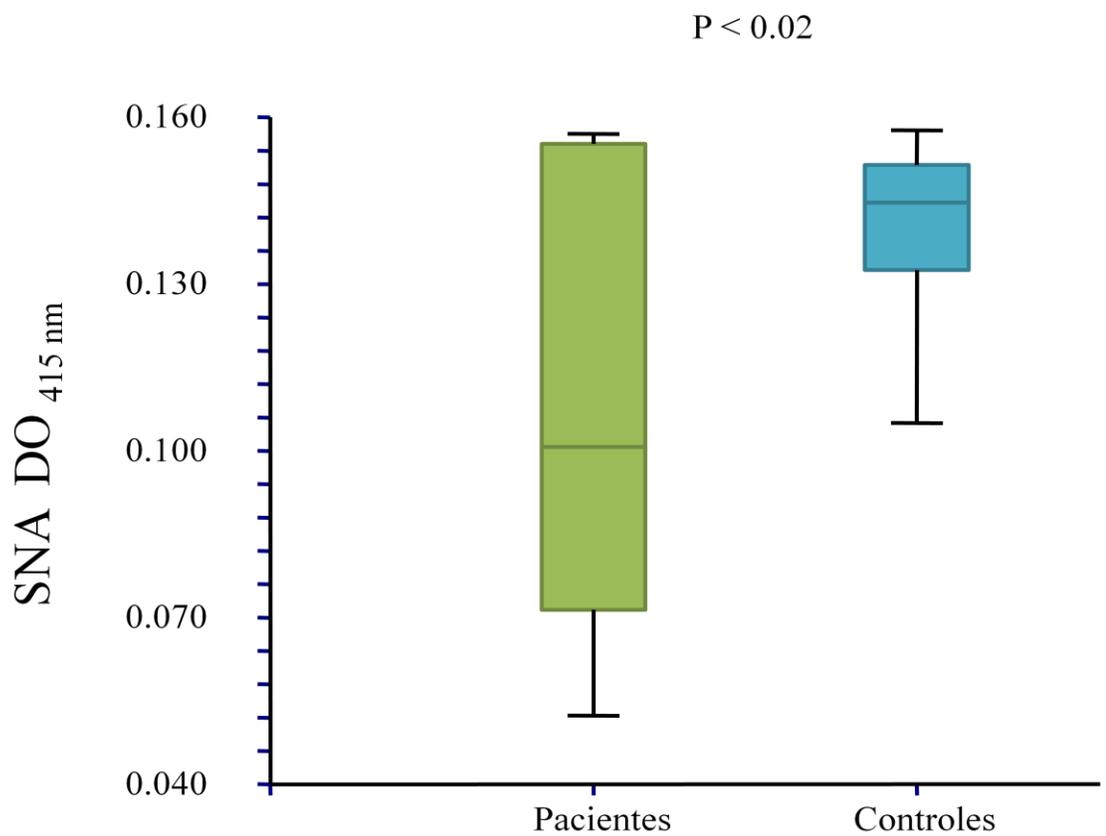


Figura 19. Interacción entre la lectina SNA y la IgM de pacientes y controles. La densidad óptica media observada en los pacientes fue significativamente menor que la media de los controles.

proteico, ya que se incrementa su afinidad por los asialoreceptores hepáticos (Spiess, 1990).

La densidad óptica media derivada de la interacción entre las lectinas MAA y PNA con los oligosacáridos de la IgM, también fueron significativamente menores en los pacientes con relación a los controles (Figuras 20 y 21). La lectina MAA, reconoce ácido siálico en uniones α 2-3 (Wiederschai, 2009), pero diversos estudios demuestran que los oligosacáridos de los sitios conservados de N- glicosilación de la IgM no poseen ácido siálico en uniones α 2-3 (Arnold y col., 2005), por lo que la señal producida por la lectina es probablemente el resultado de la interacción de ésta con los oligosacáridos ubicados en sitios no conservados de glicosilación en la IgM (Low y col., 1975). La lectina PNA, posee afinidad por O-oligosacáridos cortos con terminación en galactosa unida a β 1-3GlcNAc o β 1-3GalNAc (Goodarzi y col., 2002). La densidad óptica emitida por la lectina sugiere que la molécula de IgM posee sitios no conservados de glicosilación con O-oligosacáridos cortos con terminación en galactosa, mismo que probablemente son afectados por los procesos patológicos por los que cursa el paciente diabético (Low y col., 1975).

La lectina RCAI, ha sido ampliamente utilizada como una herramienta versátil para detectar carbohidratos en los glicanos complejos N-ligados. Se ha demostrado que la ECA, otra lectina vegetal, presenta una especificidad similar a la de la RCAI. Ambas lectinas presentan marcada afinidad por los residuos terminales de galactosa de los oligosacáridos complejos y presentan baja afinidad por oligosacáridos O-enlazados. Las diferencias en su especificidad radican en que RCAI reconoce β -galactosas y ECA reconoce estructuras con Gal β 1-4GlcNAc (Itakura y col., 2007). En las Figuras 22 y 23, se observó que la media de los pacientes fue significativamente menor en comparación con la media de los controles. La baja intensidad de la señal producida por la interacción de la lectina RCAI con la IgM de los pacientes, indicó una reducción en el contenido de galactosa terminal en la proteína.

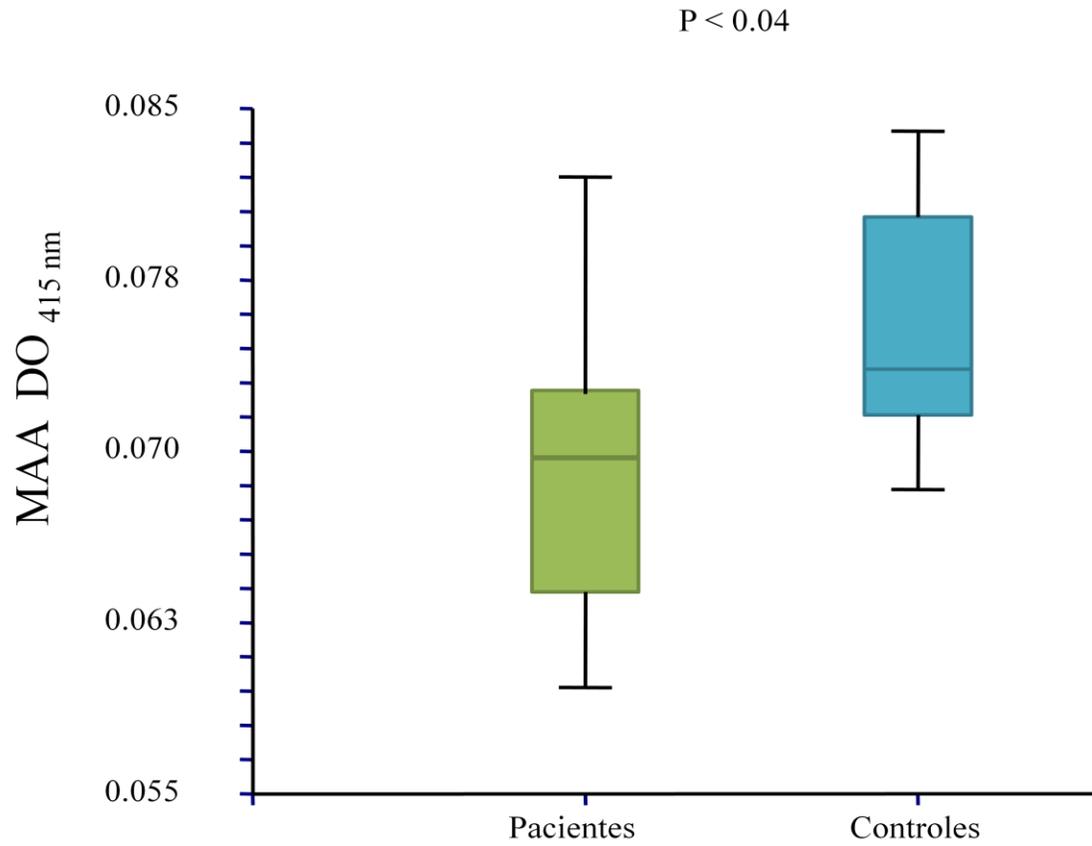


Figura 20. Interacción entre la lectina MAA y la IgM de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes fue significativamente menor que la media de los controles.

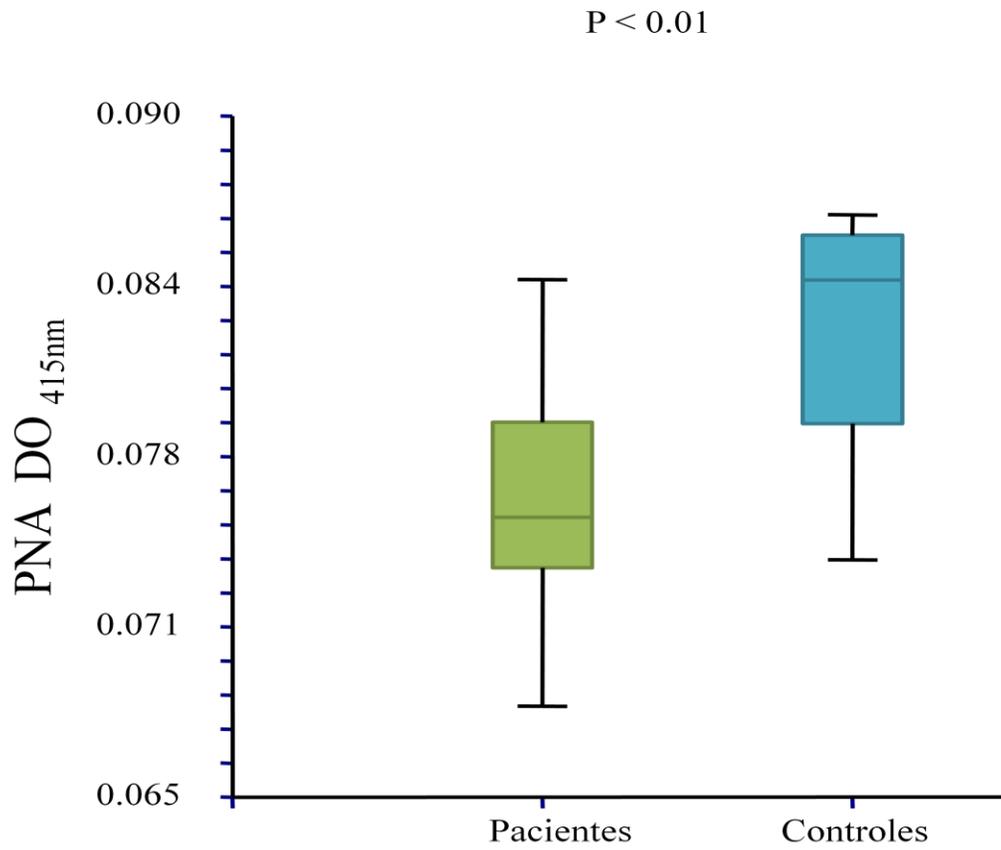


Figura 21. Interacción entre la lectina PNA y la IgM de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes fue significativamente menor que la media de los controles.

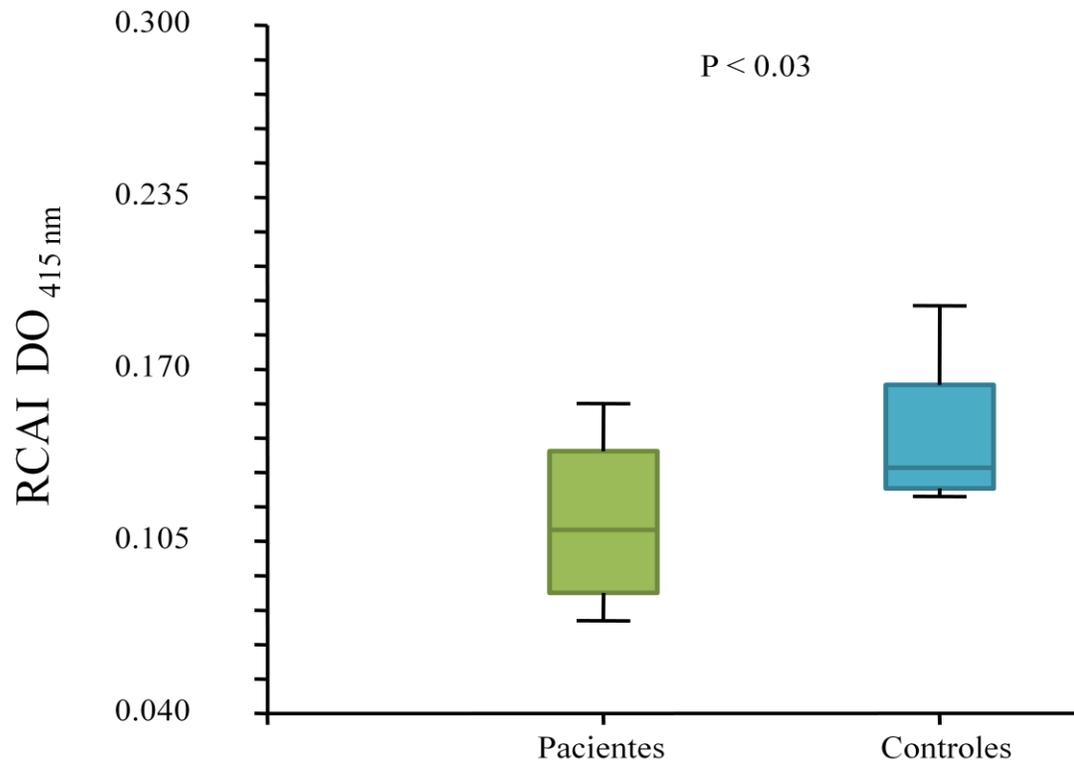


Figura 22. Interacción entre la lectina RCA I y la IgM de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes fue significativamente menor que la media de los controles.

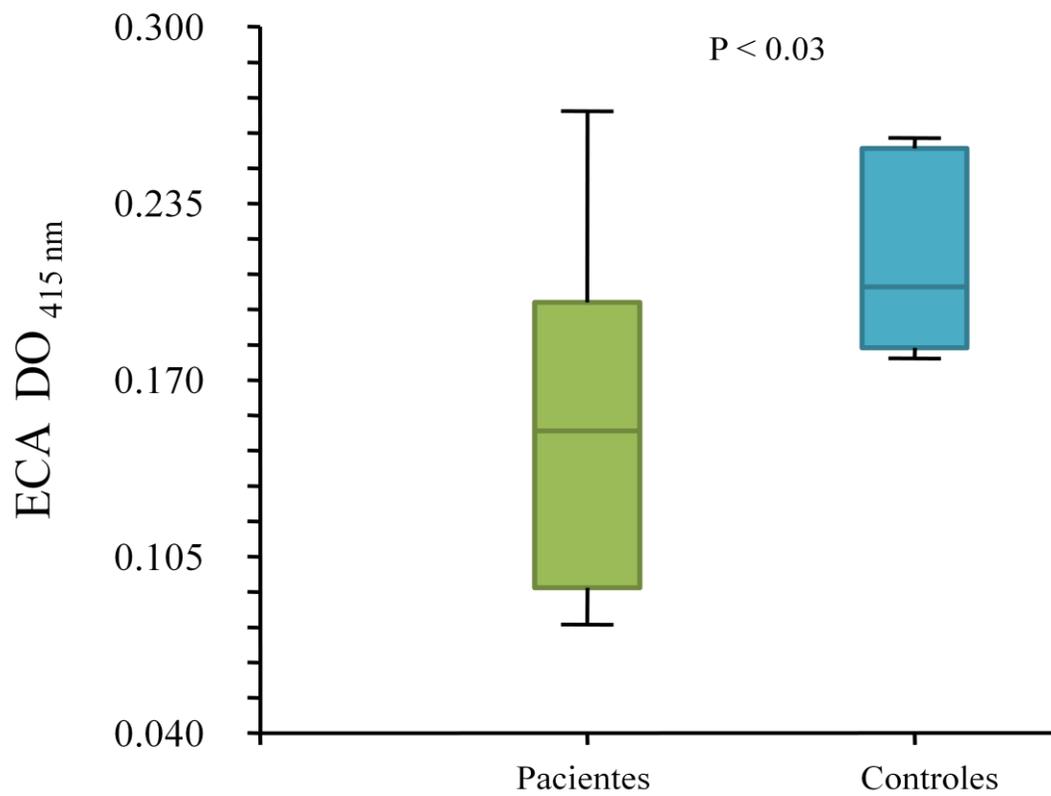


Figura 23. Interacción entre la lectina ECA y la IgM de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes fue significativamente menor que la media de los controles.

Al examinar las muestras con la lectina WGA, que reconoce con un elevado grado de afinidad a las β -GlcNAc unidas al centro quitobiosa (Debray y col., 1981), se observó que la media de la densidad óptica del grupo de pacientes fue mayor que la media de los controles (Figura 24); esto sugirió el predominio de glicoformas con terminación en β -GlcNAc en el grupo de pacientes. Además, se sabe que la lectina, WGA produce una señal más intensa cuando los azúcares están en forma libre y menos intensa cuando forman parte de estructuras complejas sialiladas. Es decir, a pesar de que la WGA es capaz de reconocer a la β -GlcNAc sialilada, el ácido siálico terminal genera un efecto de enmascaramiento reduciendo la densidad óptica emitida por la lectina (Debray y col., 1981).

La diferencia en la densidad óptica media emitida por la interacción de la IgM con la lectina LCA, no fue estadísticamente significativa entre los pacientes y los controles (Figura 25). Se ha reportado que LCA tiene afinidad por β -GlcNAc o manosas de oligosacáridos cortos, que presentan un residuo de fucosa en el centro quitobiosa (Goodarzi y col., 2002). Los resultados de este análisis sugieren que el centro quitobiosa fucosilado de las estructuras oligosacáridas en los sitios conservados de N-glicosilación Asn-171,332 y 395, no son afectados por la diabetes.

Por otro lado, la diferencia en la densidad óptica media emitida por la interacción de la IgM con la lectina Con A, no fue estadísticamente significativa entre los pacientes y los controles (Figura 26). Se ha reportado que Con A presenta una marcada afinidad por residuos de α -manosas (Lei y Chang, 2009), por lo que los resultados de este análisis sugieren que el contenido de manosa en los oligosacáridos de la IgM de pacientes y controles es similar.

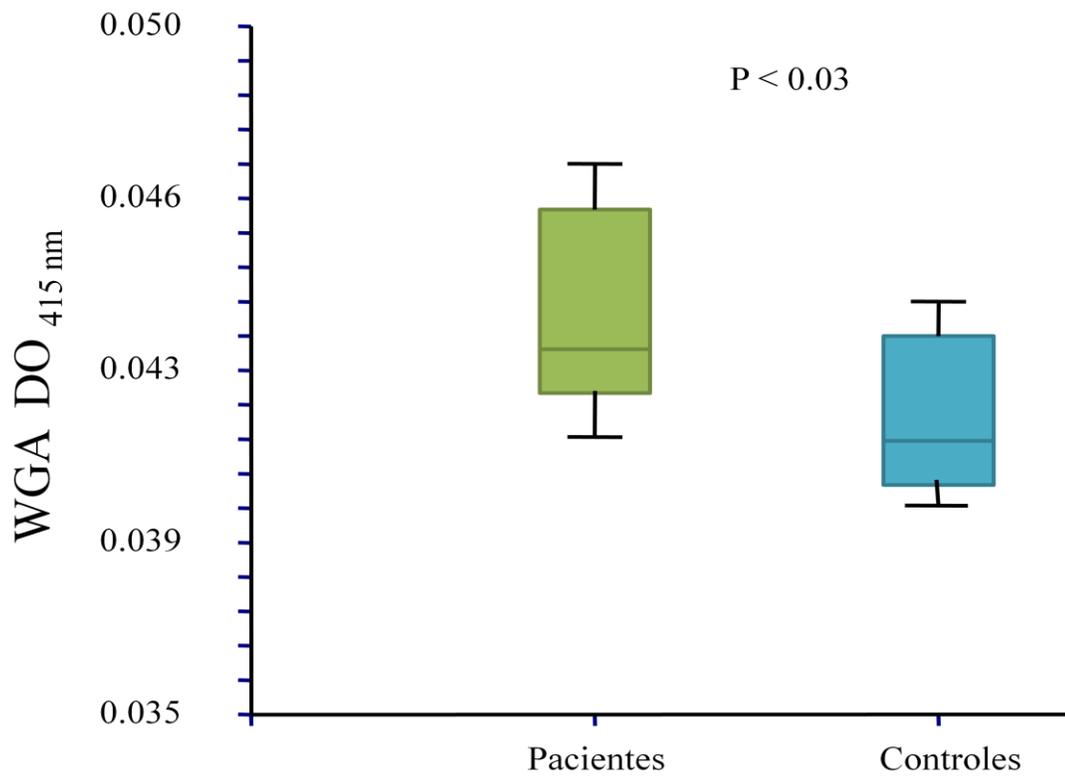


Figura 24. Interacción entre la lectina WGA y la IgM de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes fue significativamente mayor que la media de los controles.

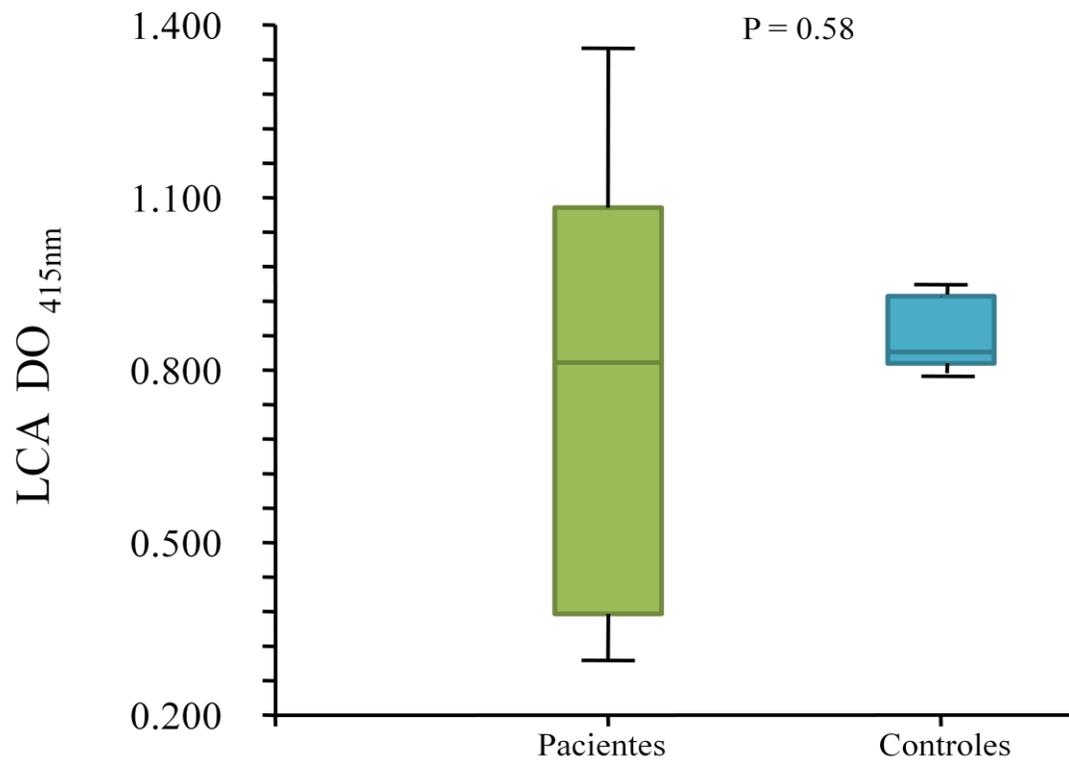


Figura 25. Interacción entre la lectina LCA y la IgM de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes no fue significativa en comparación con la media de los controles.

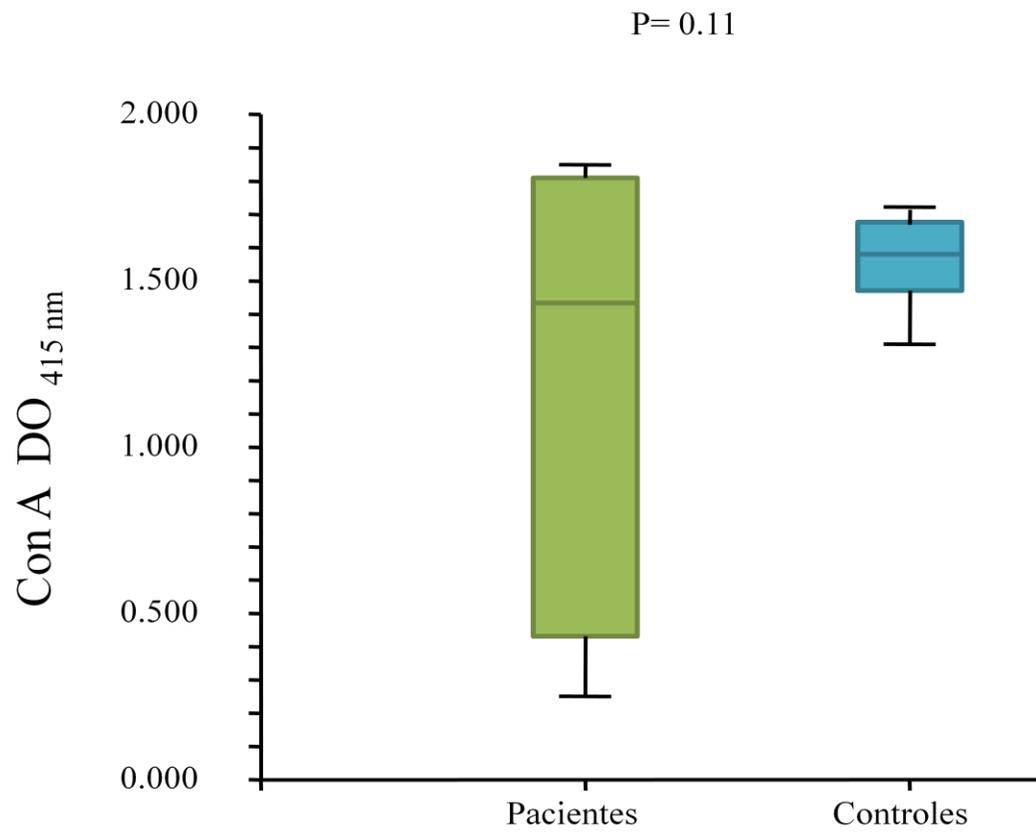


Figura 26. Interacción entre la lectina Con A y la IgM de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes no fue significativa en comparación con la media de los controles.

Las evidencias anteriores, derivadas del análisis individual de la afinidad de las lectinas SNA, MAA, ECA, RCAI, WGA hacia la IgM de los pacientes y los controles, fueron corroboradas con los resultados obtenidos posteriormente a partir de la relación de absorbancia generada por pares de lectinas afines hacia estructuras oligosacáridas.

La relación SNA/MAA, permitió conocer el contenido relativo de ácido siálico en la molécula de IgM. La media de la relación SNA/MAA fue significativamente menor en el grupo de los pacientes en comparación con el de los controles (Figura 27) (Tabla II), este resultado apoyó la hipótesis de que las diferencias observadas en la IgM de los pacientes, se deben a una disminución de ácido siálico en uniones α 2-6.

El grado de galactosilación de la molécula de IgM, se determinó con las razones RCAI/SNA y ECA/SNA; éstas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes y el de controles (Figuras 28 y 29). Estos resultados difieren del análisis individual con las lectina RCAI y ECA, que mostró una evidente hipogalactosilación en la IgM del grupo de pacientes, en comparación con el grupo de controles. La explicación a este fenómeno, radica en la disminución de la densidad óptica emitida por ECA y RCAI con la IgM de los controles, que ocurre debido a un efecto de enmascaramiento producido por el ácido siálico terminal. Se sabe que la interacción de ambas lectinas (ECA y RCAI) con sus ligandos; es reducida por la presencia de ácido siálico (Wu y col., 1997) lo que se traduce en el aumento de la señal obtenida en las razones RCAI/SNA y ECA/SNA en los sujetos controles.

No obstante lo anterior, la disminución en la galactosilación fue comprobada con la lectina WGA, la cual presentó una mayor interacción con la IgM del grupo de pacientes en comparación con la de los controles. Las relaciones WGA/RCAI y WGA/ECA permitieron comprobar el grado de N-acetilglucosaminación en la molécula de IgM; las medias de las razones fueron significativamente mayores en el grupo de pacientes en comparación con las de los controles ($p < 0.01$ y $p < 0.02$, respectivamente) (Figuras 30 y 31).

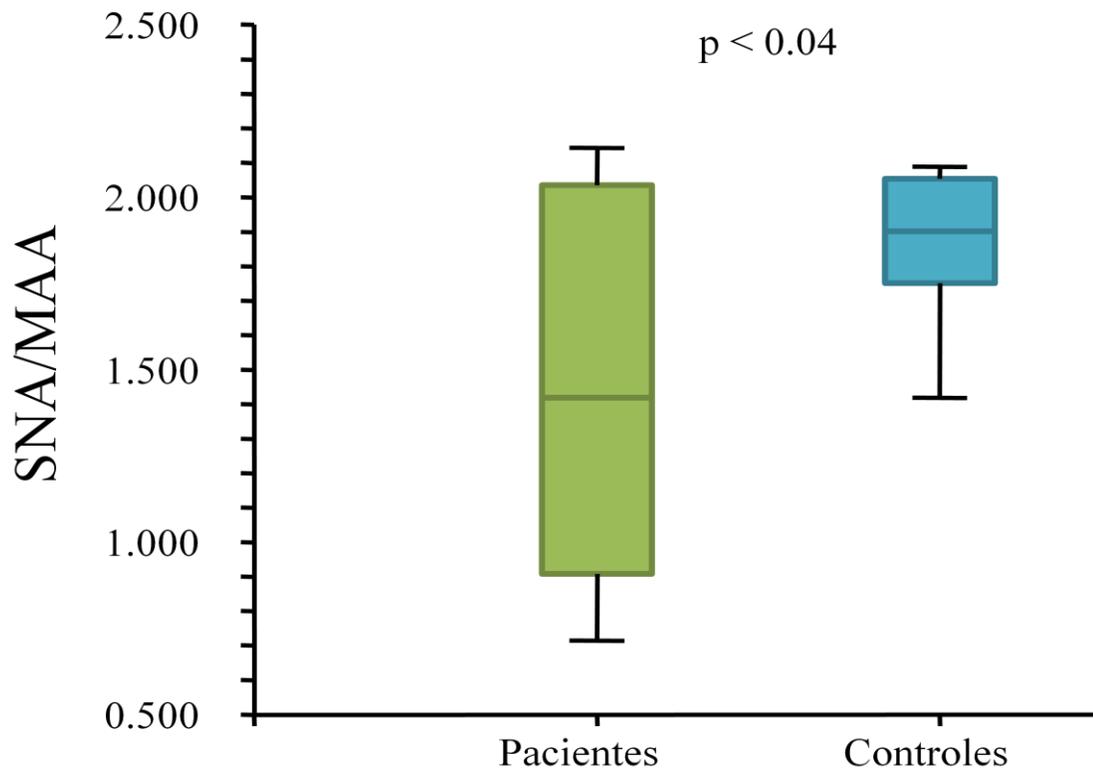


Figura 27. Relación SNA/MAA entre pacientes y controles.

Se observa que la media de los pacientes, es significativamente menor en comparación con la media de los controles. La barra en cada boxplot indica la media de cada grupo.

Tabla II. Relación de densidad óptica entre pares de lectinas afines hacia estructuras oligosacáridas de la IgM.

Razón	Pacientes ^a	DE	Controles ^b	DE	Valor de p
SNA/MAA	1.457	± 0.557	1.870	±0.238	< 0.04
ECA/SNA	1.571	± 0.489	1.527	±0.201	= 0.08
RCAI/SNA	1.184	± 0.302	1.028	±0.165	= 0.32
RCAI/ECA	0.776	± 0.160	0.672	±0.058	= 0.10
WGA/RCAI	0.416	± 0.099	0.296	± 0.047	< 0.01
WGA/ECA	0.331	± 0.129	0.197	± 0.029	< 0.02
WGA/SNA	0.508	± 0.225	0.299	± 0.043	< 0.02

Los valores son expresados como medias ± la desviación estándar (DE).

^a Nueve sujetos constituyeron el grupo de pacientes.

^b Siete sujetos constituyeron el grupo de controles.

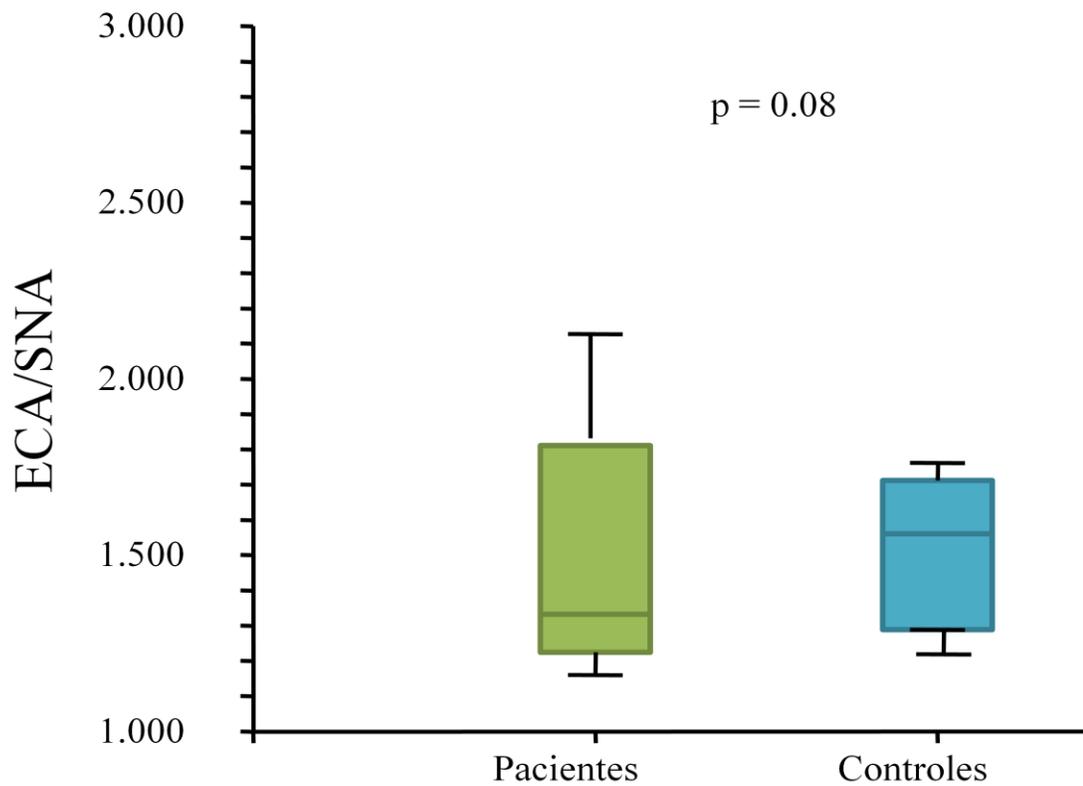


Figura 28. Relación ECA/SNA entre pacientes y controles.

No se observan diferencias significativas entre la media de pacientes y la media de controles. Sin embargo, se observa una tendencia en la disminución de Gal β 1-4GlcNAc en la IgM de los pacientes, en comparación con los controles.

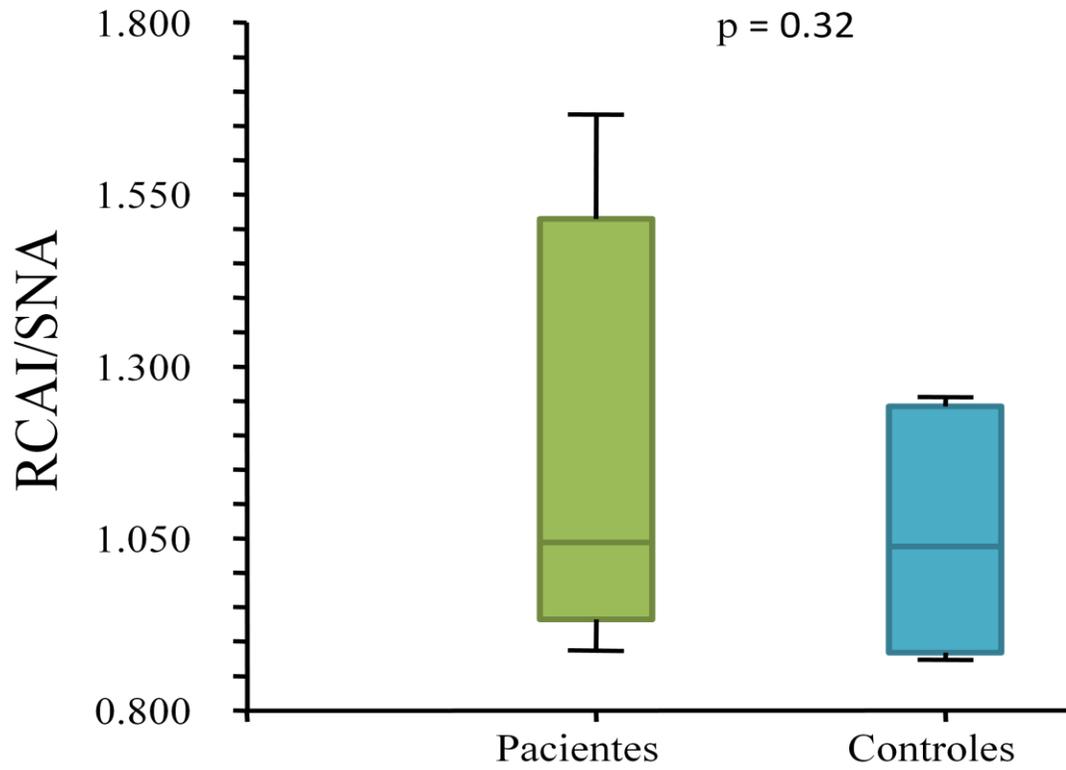


Figura 29. Relación RCAI/SNA entre pacientes y controles.

No se observan diferencias significativas entre la media de pacientes y la media de controles.

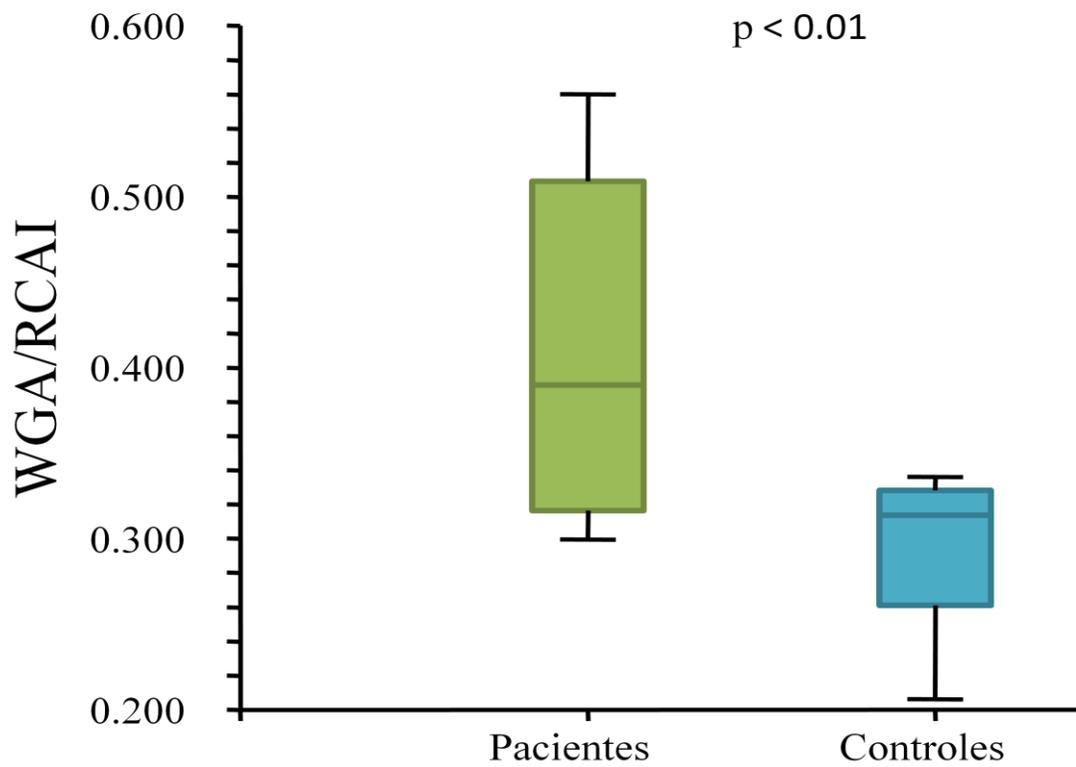


Figura 30. Relación WGA/RCAI entre pacientes y controles.

Se observó que la media de del grupo de pacientes fue significativamente mayor en comparación con la media del grupo de controles. Esta razón sugiere que los oligosacáridos en la IgM de pacientes, contienen en mayor proporción residuos de β -GlcNAc unida al centro quitobiosa.

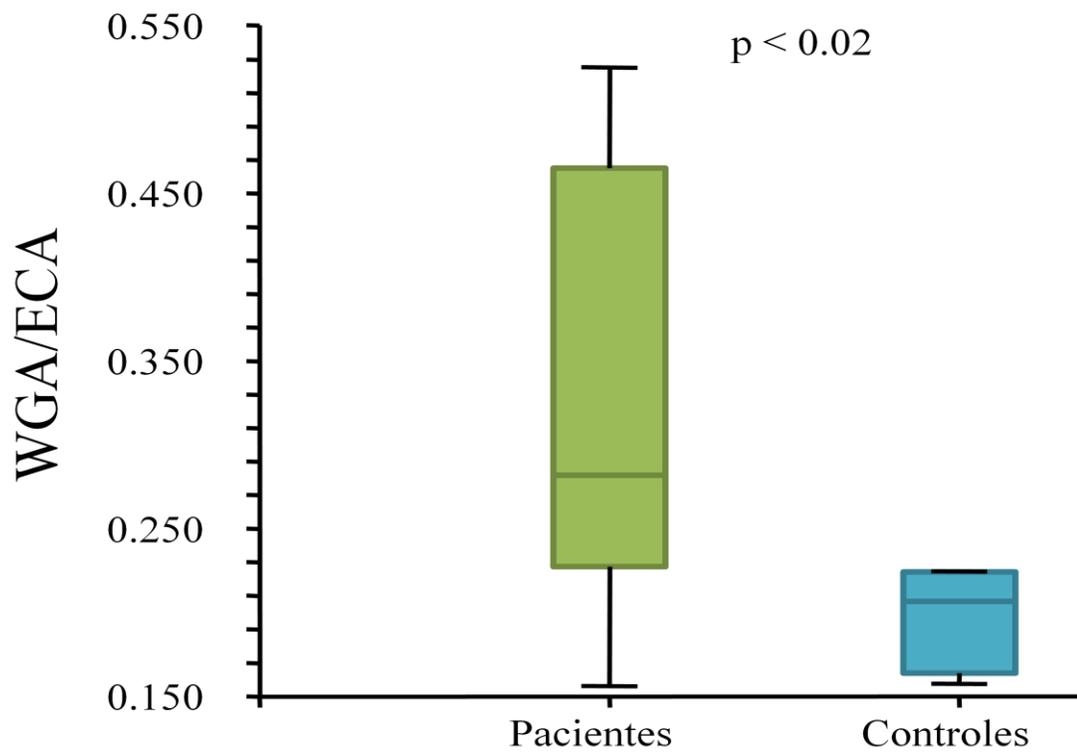


Figura 31. Relación WGA/ECA entre pacientes y controles.

Se observó que la media de del grupo de pacientes fue significativamente mayor en comparación con la media del grupo de controles. Esta razón sugiere que los oligosacáridos en la IgM de pacientes, contienen en mayor proporción residuos de β -GlcNAc unida al centro quitobiosa.

La relación WGA/SNA, permitió corroborar la información obtenida anteriormente, ya que observamos, que la media de la razón fue significativamente mayor en los pacientes con relación a los controles (Figura 32). De esta manera, podemos inferir que la cantidad relativa de β -GlcNAc es mayor que la cantidad de ácido siálico en la IgM del grupo de pacientes en comparación con la IgM del grupo de controles.

Los datos obtenidos por la comparación de las señales individuales originadas por la interacción de las lectinas individuales con la IgM de los pacientes y los controles, sugieren que las estructuras oligosacáridas de los sitios Asn-171, 332 y 395 de la IgM de los pacientes, las cuales deberían tener 70.9% de estructuras mono-sialiladas con predominio de la isoforma ($\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{Gal}_2\text{NeuAc}_1$), están siendo afectadas por los procesos patológicos por los que cursa el paciente diabético, observándose una evidente hiposialilación e hipogalactosilación, que deja expuestos los residuos de β -GlcNAc. Las alteraciones de glicosilación encontradas en pacientes con DM2, podrían ayudar a esclarecer la susceptibilidad y frecuencia de los pacientes al desarrollo de infecciones, porque se sabe que las alteraciones en la fracción oligosacárida de las inmunoglobulinas, en especial del contenido de ácido siálico, afecta la capacidad de unión al antígeno, su conformación, solubilidad, tasa de aclaramiento y su capacidad para activar la vía clásica del complemento (Arnold J. y col., 2006; Arnold J. y col., 2007).

Finalmente, algunos estudios demuestran que la lectina con afinidad a manosa (MBL) se une con mayor avidez a residuos terminales de β -GlcNAc. Esta interacción constituye una ruta de aclaramiento alternativa para los inmunocomplejos del suero, y es un mecanismo de activación del complemento para las inmunoglobulinas que han reconocido un antígeno. Por lo anterior, es posible especular que en los pacientes con DM2, la IgM podría contribuir a la activación inapropiada de la vía del complemento y,

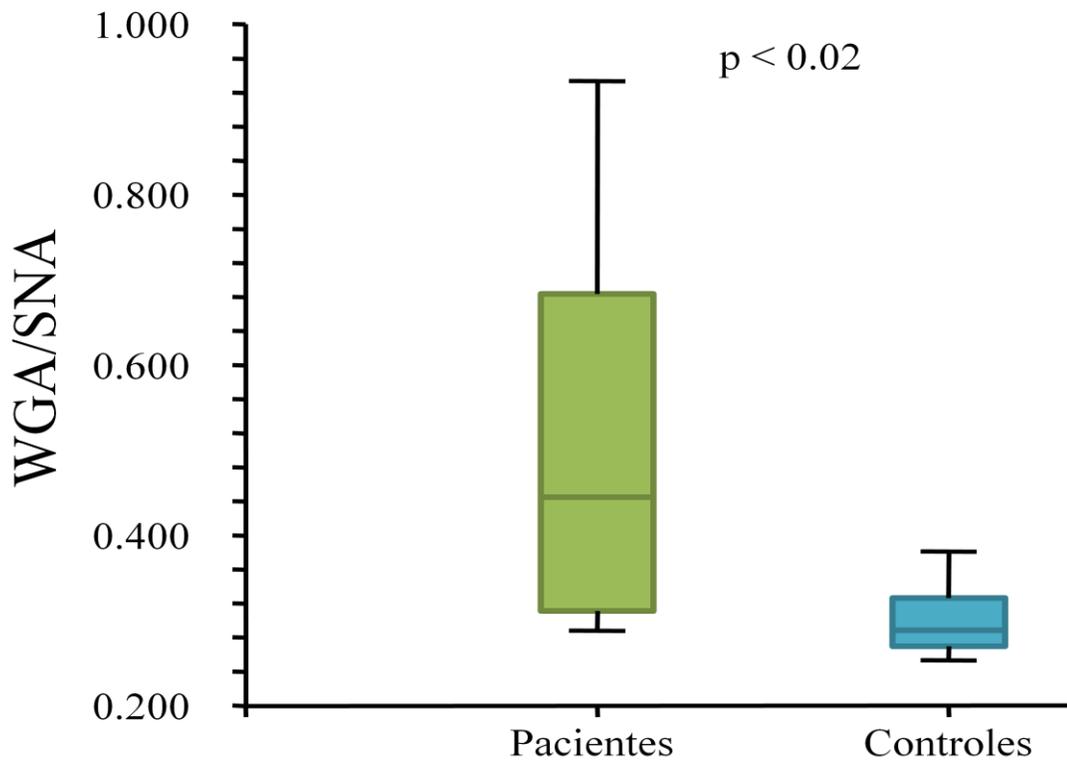


Figura 32. Relación WGA/SNA entre pacientes y controles.

Se observó que la media del grupo de pacientes fue significativamente mayor en comparación con la media del grupo de controles. Esta razón, confirma que la terminación de los oligosacáridos en la IgM de pacientes es del tipo de β -GlcNAc.

en consecuencia al mantenimiento del estado inflamatorio (Arnold y col., 2006; Arnold y col., 2007) ,asociado con las complicaciones vasculares y renales de la DM (Hansen y col., 2004; Hansen y col., 2003). El estado inflamatorio sistémico por el que cursan los pacientes con DM2 (Browning y col., 2004; Duncan y col., 2003) ha sido ampliamente estudiado y se ha asociado también con el aumento en la concentración sérica de proteínas de fase aguda que presentan cambios en la glicosilación (Chavan y col., 2005; Havenaar y col., 1998; Higai y col., 2003); se ha especulado que estas alteraciones están íntimamente relacionadas con elevación de ácido siálico sérico en los pacientes con DM2 (Gavella y col., 2003). Adicionalmente, el incremento de las glicofomas con terminación en β -GlcNAc podría favorecer el aclaramiento proteico de la IgM sérica, porque estas glicofomas tienen mayor afinidad por los asialoreceptores hepáticos que las glicofomas sialiladas (Spiess, 1990).

Muchos de los cambios de glicosilación que afectan el contenido relativo de ácido siálico y otros carbohidratos, pueden ser explicados por el efecto de factores como la edad, alteraciones genéticas u otros procesos patológicos específicos (Knezevic y col., 2010), por esta razón la muestra de pacientes incluida en este estudio fue pareada por sexo y edad con el grupo control; de esta manera se redujo la influencia de la edad sobre los resultados obtenidos y, por lo tanto, la hipogalactosilación encontrada en la IgM del paciente diabético se puede atribuir directamente a los eventos patogénicos vinculados con la DM2.

Poco se sabe acerca de los procesos metabólicos del paciente con DM2 que podrían afectar la glicosilación de la inmunoglobulina M. En el 2001, Yarema y Bertozzi, sugirieron que diversos factores externos al proceso de biosíntesis pueden afectar el proceso de glicosilación, incluyendo la hiperglicemia crónica, el estrés oxidativo o incluso alteraciones en la biodisponibilidad de sustratos o intermediarios del proceso de glicosilación (Anderson, 1975; Yarema y Bertozzi, 2001). De igual forma en el 2006, Pasek y col., sugirieron que la disminución en el contenido de galactosa y ácido siálico en las cadenas oligosacáridas podría deberse a la alteración en la acción de las

enzimas galactosiltransferasa y la sialiltransferasa, respectivamente (Pasek y col., 2006). El conjunto de evidencias nos deja claro que los cambios encontrados en la IgM no son producto de la edad, sino que se podrían ser atribuidos a los eventos patogénicos por los que cursa el paciente diabético, los cuales pueden influir directa o indirectamente en la síntesis de los oligosacáridos y/o en su estabilidad estructural.

CONCLUSIONES

La diabetes mellitus, se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, debido a las altas tasas de mortalidad y morbilidad. Las altas concentraciones de glucosa por largos periodos de tiempo inducen a cambios metabólicos importantes que conllevan a alteraciones generalizadas en el organismo de estos pacientes. Las infecciones recurrentes y de difícil control, en especial en aquellos pacientes con pobre control glicémico, afectan significativamente la calidad de vida de los pacientes.

Considerando que, la susceptibilidad de los pacientes diabéticos al desarrollo de infecciones puede ser explicada por los cambios en la fracción oligosacárida de la inmunoglobulina, el presente trabajo, se enfocó en estimar los cambios de glicosilación terminal de la IgM de pacientes con DM2 con respecto a un grupo de sujetos controles euglicémicos aparentemente sanos.

Para ello, se purificó la IgM por medio de un esquema cromatográfico en cuatro etapas; este esquema, permitió obtener a la IgM con un alto grado de pureza, reduciendo la cantidad de proteínas séricas que interaccionan con la matriz de inmovilidad agarosa-anti IgM. El esquema cromatográfico no sólo permitió obtener la fracción de IgM, sino que también permitió obtener las fracciones de (IgA e IgG), a partir de 1mL de suero humano total, para realizar otros estudios.

Los resultados del análisis de afinidad entre la IgM y las lectinas SNA, MAA, RCAI, ECA y WGA, así como sus relaciones (SNA/MAA, ECA/SNA, RCAI/SNA, RCAI/ECA, WGA/RCAI, WGA/ECA y WGA/SNA), permitieron evaluar la glicosilación terminal de la IgM. El análisis de los resultados de la interacción de la IgM con las lectinas, así como los índices de lectinas radios, sugieren que la IgM del grupo de pacientes está hiposialilada e hipogalactosilada en relación a la de los sujetos controles

Estas evidencias, en conjunto sugieren que los cambios metabólicos propios de la diabetes, generan alteraciones que afectan la glicosilación de la IgM. Sin embargo, con estas evidencias no es posible identificar la ubicación de la afectación, que bien podría darse en los linfocitos B, alterando enzimas como la galactosiltransferasa y sialiltransferasa, responsables de la adición de galactosa y ácido siálico a las glicoproteínas, respectivamente, o bien a nivel de la remoción de carbohidratos terminales por acción de enzimas como la sialidasa. En ambos casos, se obtendrían las mismas alteraciones en los perfiles de glicosilación de la IgM que fueron detectadas en este trabajo.

Finalmente, es importante señalar que tampoco hay evidencias de que la reducción de la glicosilación terminal de la IgM afecte sus funciones efectoras en los pacientes diabéticos. Por estas razones, se requieren nuevos estudios para esclarecer la relación entre los cambios en la glicosilación terminal de la IgM y sus funciones efectoras, así como para determinar la etiología de la hiposialilación e hipogalactosilación de la IgM en los pacientes con DM2.

BIBLIOGRAFÍA

Abrass, C. 1991. Fc Receptor-Mediated phagocytosis: Abnormalities associated with diabetes mellitus. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 58(1): 1-17.

Ahmad-Zadeh, C., Piguet, J., Colli, L. 1971. Molecular weight estimation of immunoglobulin subunits on polyacrylamide gel. *Immunology*. 21(6): 1065-1071.

Aitken, A., Learmonth, M. 1996. Protein determination by UV absorption. *The Protein Protocols Handbook*. 1(1): 3-6.

Álvarez-Félix, A., Celiz-Zepeda, S., Gómez-Alcalá, A. 2006. Complicaciones crónicas en la diabetes mellitus. Prevalencia en una unidad de medicina familiar. *Revista Medica Instituto Mexicano del Seguro Social*. 44(5): 415-421.

Álvarez, N., Otero, O., Falero, G., Cádiz, A., Marcet, R., Carbonell, A., Sarmiento, M. Norazmi, M., Acosta, A. 2010. Purificación de inmunoglobulina A secretora a partir de calostro humano. *Vaccimonitor*. 19(3): 26-29.

Anderson, J. 1975. Metabolic abnormalities contributing to diabetic complications. I. Glucose metabolism in insulin-insensitive pathways. *American Journal of Clinical Nutrition*. 28(3): 273-279.

Arnold, J., Dwek, R., Rudd, P., Sim, R. 2006. Mannan binding lectin and its interaction with immunoglobulins in health and in disease. *Immunology letters*. 106(2): 103-110.

Arnold, J., Wormald, M., M, D., M, C., Harvey, D., Raymond, A., M, P. 2005. Human serum IgM glycosylation. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*. 280(32): 29080–29087.

Arnold, J., Wormald, M., Sim, R., Rudd, P., Dwek, R. 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Immunology*. 25(1): 21-50.

Bessman, A., Sapico, F. 1992. Infections in the diabetic patient: The role of immune dysfunction and pathogen virulence factors. *Journal of Diabetes Complications*. 6(4): 258-262.

Bosch, X. 2002. Diabetes y enfermedad cardiovascular. Una mirada hacia la nueva epidemia del siglo XXI. *Revista Española de Cardiología*. 55(05):525. 55(5): 525-530.

Browning, L., Krebs, J., Jebb, S. 2004. Discrimination ratio analysis of inflammatory markers: implications for the study of inflammation in chronic disease. *Metabolism*. 53(7): 899-903.

Chantret, I., Moore, S. 2008. Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation. *Glycobiology*. 18(3): 210-224.

Chavan, M., Kawle, P., Mehta, N. 2005. Increased sialylation and defucosylation of plasma proteins are early events in the acute phase response. *Glycobiology*. 15(9): 838-848.

Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J. 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry*. 117(1): 41-51.

Delamaire, M., MAugendre, D., Moreno, M. 1997. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabetic Medicine*. 14(1): 29-34.

Duncan, B., Schmidt, M., Pankow, J., Ballantyne, C., Couper, D., Vigo, A., Hoogeveen, R., Folsom, A., Heiss, G. 2003. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 52(7): 1799.

Elbein, A. 1991 Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. *The FASEB*. 5(15): 3055-3063

Garfin, D. 2003. Gel electrophoresis of proteins. *AES Applications Focus*. 1(7): 197-268.

Gavella, M., Lipovac, V., Car, A., Vu i , M., Sokoli , L., Rakoš, R. 2003. Serum sialic acid in subjects with impaired glucose tolerance and in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Acta Diabetologica*. 40(2): 95-100.

Gavella, M., Lipovac, V., Crnek, S. 1990. Total and ganglioside-bound sialic acid content of lymphocytes from non-insulin-dependent diabetic patients. *Acta Diabetologica*. 27(4): 357-364.

Geerlings, S., Hoepelman, A. 1999. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 26(1999):256-265.

Goodarzi, M., Fotinopoulou, A., Turner, G. 2002. A lectin-binding assay for the rapid characterization of the glycosylation of purified glycoproteins. *The Protein Protocols Handbook*. 1(6): 795-802.

Goodarzi, M., Turner, G. 1997. A lectin method for investigating the glycosylation of nanogram amounts of purified glycoprotein. *Glycoconjugate Journal*. 14(4): 493-496.

Gornik, O., Wagner, J., Pučić, M., Knežević A., Redžić, I., Lauc, G. 2009. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*. 19 (12):1547- 1553.

Hage, D. 2006. Handbook of affinity chromatography, Second ed. CRC Press. Lincoln, Nebraska, U.S.A.

Hammes, H., Kiefel, V., Laube, H. 1990. Impaired agglutination of IgM resulting from non-enzymatic glycation in diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 9(1): 37-42.

Hansen, T., Tarnow, L., Thiel, S., Steffensen, R., Parving, H., Flyvbjerg, A. 2004. Association between mannanose binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes*. 53(6): 1570-1576.

Hansen, T., Thiel, S., Knudsen, S., Gravholt, C., Christiansen, J., Mogensen, C., Poulsen, P. 2003. Elevated levels of mannan-binding lectin in patients with type 1 diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 88(10): 4857-4860.

Havenaar, E., Hoff, R., Van den Eijnden, D., Van Dijk, W. 1998. Sialyl LewisX epitopes do not occur on acute phase proteins in mice: relationship to the absence of 3-fucosyltransferase in the liver. *Glycoconjugate Journal*. 15(4): 389-395.

Helenius, A. 1994. How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell*. 5(3): 253-265.

Higai, K., Azuma, Y., Aoki, Y., Matsumoto, K. 2003. Altered glycosylation of [alpha] 1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*. 329(1-2): 117-125.

Huseynova, G., Azizova, G., Efendiyev, A., Memmedhesenov, R. 2010. Antibody avidity in patients with different stages of type 2 diabetes mellitus in Azerbaijan Republic. *International Journal of Diabetes in Developing Countries*. 30(1): 162-166.

Itakura, Y., Nakamura-Tsuruta, S., Kominami, J., Sharon, N., Kasai, K., Hirabayashi, J. 2007. Systematic comparison of oligosaccharide specificity of Ricinus communis agglutinin I and Erythrina lectins: a search by frontal affinity chromatography. *Journal of Biochemistry*. 142(4): 459-469.

Itoh, N., Sakaue, S., Nakagawa, H., Kurogochi, M., Ohira, H., Deguchi, K., Nishimura, S., Nishimura, M. 2007. Analysis of N-glycan in serum glycoproteins from db/db mice and humans with type 2 diabetes. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*. 293(4): 1069-1077.

Jennissen, H. 2005. Hydrophobic interaction chromatography. *Wiley Online Library*

Jiménez, M., Trejo, H., Herrera, A., Romero, J., Chávez, R., Lascurain, R., Zenteno, E. 2002. Alteraciones de la glicosilación en las enfermedades humanas. *Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias México*. 15(1): 39-47.

Kennedy, D., Skillen, A., Self, C. 1994. Glycation of Monoclonal Antibodies Impairs Their Ability to Bind Antigen. *Clinical and Experimental Immunology*. 98(2): 245–251. .

Knezevic, A., Gornik, O., Polasek, O., Pucic, M., Redzic, I., Novokmet, M., Rudd, P., Wright, A., Campbell, H., Rudan, I. 2010. Effects of aging, body mass index, plasma lipid profiles, and smoking on human plasma N-glycans. *Glycobiology*. 20(8): 959-969.

Koolman. 2005. Color Atlas of Biochemistry, 2nd ed. Thieme. New York.

Kownatzki, E. 1973. Disulfide bonds of human IgM: differential sensitivity to reductive cleavage. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2(4): 433-438.

Lei, H., Chang, C. 2009. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *Journal of Biomedical Science*. 16(1): 1-10.

Leibiger, H., Kersten, B., Albersheim, P., Darvill, A. 1998. Structural characterization of the oligosaccharides of a human monoclonal anti-lipopolysaccharide immunoglobulin M. *Glycobiology*. 8(5): 497-507.

Liberatore, R., Barbosa, S. 2005. Is Immunity in diabetic patients influencing the susceptibility to infections? immunoglobulins, complement and phagocytic function in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Pediatric Diabetes*. 6(4): 206-212.

Low, T., Liu, Y., Putnam, F. 1975. Structure, function, and evolutionary relationships of Fc domains of human immunoglobulins, A, G, M and E. *Science*. 9(1): 390-392.

Mattu, T., Pleass, R., Willis, A., Kilian, M., Wormald, M., Lellouch, A., Rudd, P., Woof, J., Dwek, R. 1998. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc receptor interactions. *Journal of Biological Chemistry*. 273(4): 2260.

Muraoka, S., Shulman, M. 1989. Structural requirements for IgM assembly and cytolytic activity. Effects of mutations in the oligosaccharide acceptor site at Asn402. *The Journal of Immunology*. 142(2): 695-698.

Murray, R., Granner, D., Rodwell, V. 2002. Harper. *Bioquímica Ilustrada*. 15ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México, DF.

Opdenakker, G., Rudd, P., Ponting, C., Dwek, R. 1993. Concepts and principles of glycobiology. *The FASEB Journal*. 7(14): 1330.

Papanas, N., Zissimopoulos, A., Maltezos, E. 2010. The role of nuclear medicine in the diagnosis of common and specific diabetic infections. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*. 13(2): 150-157.

- Pasek, M., Duk, M., Podbielska, M., Sokolik, R., Szechinski, J., Lisowska, E., Krotkiewski, H. 2006. Galactosylation of IgG from rheumatoid arthritis (RA) patients – changes during therapy. *Glycoconjugate Journal*. 23: 463-471.
- Poland, D., Schalkwijk, C., Stehouwer, C., Koeleman, C., van het Hof, B., van Dijk, W. 2001. Increased 3-fucosylation of 1-acid glycoprotein in type I diabetic patients is related to vascular function. *Glycoconjugate Journal*. 18(3): 261-268.
- Ramos-Clamont, G., Candia-Plata, M., Zamudio, R., Vázquez-Moreno, L. 2006. Novel hydrophobic interaction chromatography matrix for specific isolation and simple elution of immunoglobulins (A, G, and M) from porcine serum. *Journal of Chromatography A*. 1122(1-2): 28-34.
- Roskoski, R. 2002. Principles of biochemistry with a Human Focus, 2 ed. California, USA.
- Schacter, H. 2000. Biosynthesis of N- and O- glicans. *Prozyme inc*. 1(1): 1-4.
- Schneider, W., Wolter, D., McCarty, L. 1976. Alternatives for Plasma Fractionation1. *Vox Sanguinis*. 31(2): 141-151.
- Sethuraman, N., Stadheim, T. 2006. Challenges in therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*. 17(4): 341-346.
- Sitia, R., Rubartelli, A., Hämmerling, U. 1984. The role of glycosylation in secretion and membrane expression of immunoglobulins M and A. *Molecular Immunology*. 21(8): 709-719.
- Spiess, M. 1990. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochemistry*. 29(43): 10009-10018.

- Stoscheck, C. 1990. Quantitation of protein. *Methods in Enzymology*. 182: 50-68.
- Sukumaran, A. 2006. Immunoglobulin concentration in gingival tissue of type 2 diabetic patients with periodontitis. *Indian Journal of Dental Research*.(17):151-4.
- Sun, W., Xiong, J., Shulman, M. 1991. Substitution of asparagine for serine-406 of the immunoglobulin [mu] heavy chain alters glycosylation at asparagine-402. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 179(3): 1627-1634.
- Suzuki, H., Fan, R., Zhang, Z., Brown, R., Hall, S., Julian, B., Chatham, W., Suzuki, Y., Wyatt, R., Moldoveanu, Z. 2009. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *The Journal of Clinical Investigation*. 119(6): 1668-1670.
- Vázquez-Moreno, L., Candia-Plata, M., Robles-Burgueño, M. 2001. Hypersialylated macromolecular serum immunoglobulin A1 in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Biochemistry*. 34(1): 35-41.
- Vázquez-Moreno, L., Porath, J., Schluter, S., Marchalonis, J. 1992. Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*) serum by gel-immobilized metal chromatography. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*. 103(3): 563-568.
- Voet, D., Voet, J., Pratt, C. 2006. *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level*, 3^a ed. Wiley Hoboken, NJ.
- Walter, J., Robert, J., Albrecht. 2001. Etiology of type II diabetes mellitus: role of the foregut. *World Journal of Surgery*. 25:527–531.
- Wiederschai, G. 2009. *Essentials of glycobiology*, 2th ed. Springer. San Diego, CA.

Wormald, M., Wooten, E., Bazzo, R., Edge, C., Feinstein, A., Rademacher, T. 1991. The conformational effects of N-glycosylation on the tailpiece from serum IgM. *European Journal of Biochemistry*. 198(1): 131-139.

Wu, A., Song, S., Sugii, S., Herp, A. 1997. Differential binding properties of Gal/GalNAc specific lectins available for characterization of glycoreceptors. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 34(1-2): 61-63.

Yarema, K., Bertozzi, C. 2001. Characterizing glycosylation pathways. *Genome Biology*. 2(5): 1-8.

Yasukawa, Z., Sato, C., Kitajima, K. 2005. Inflammation-dependent changes in 2, 3-, 2, 6-, and 2, 8-sialic acid glycotopes on serum glycoproteins in mice. *Glycobiology*. 15(9): 827-830.