

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

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

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

DÁMARIS PINEDA OROZCO

1942

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 Dámaris Pineda Orozco, 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 al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad de Sonora (UNISON), por permitirme culminar satisfactoriamente mis estudios de posgrado.

De igual manera reitero mi agradecimiento y gran admiración hacia mi director de tesis la Dra. Maria del Carmen Candia Plata por el apoyo que me brindó, por haber depositado su confianza en mí y permitirme formar parte de este proyecto. Gracias por su invaluable guía, comprensión, y por sus consejos no sólo en el plano profesional sino en el personal.

Así mismo agradezco las sugerencias del Dr. Enrique Bolado Martínez, del Dr. Luis Fernando López Soto y de la MC. Lucia Guadalupe Castellón Campaña.

Quiero agradecer de manera muy especial a mis amigos y compañeros que estuvieron cerca apoyándome durante este tiempo, especialmente a Marlenne Rendón Álvarez que me brindó su ayuda y estuvo siempre a mi lado, y a mi novio Christian Israel Luján Camarillo, no sólo por apoyarme, entenderme y mostrar paciencia en esos momentos difíciles sino por brindarme su ayuda incondicional, este proyecto es parte de ustedes porque de cierta manera estuvieron en él en todo momento, sin importar el tiempo, el día o el cansancio, gracias por todo su apoyo.

Por último, quiero agradecer eternamente a Dios por brindarme salud y permitirme finalizar mis estudios, a mis padres Tavita y Moisés, a mis hermanas Tavita, Myriam y Anahi y a mis sobrinos Gilberto, Madián y Lineth, por su paciencia y por comprender lo importante que es para mí esta etapa en mi vida y por entender que los sacrificios valen la pena. Gracias por su apoyo y su infinito amor, siempre están en mi corazón.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | v |
| LISTA DE TABLAS | vii |
| OBJETIVOS | viii |
| Objetivo General | viii |
| Objetivos Específicos | viii |
| RESUMEN..... | ix |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES..... | 3 |
| Tipos de Glicosilación Proteica, Estructura y Biosíntesis de los N-Glicanos..... | 3 |
| Glicosilación proteica | 3 |
| Estructura de los N-Glicanos..... | 7 |
| Biosíntesis de los N-Glicanos..... | 9 |
| Estructura, Glicosilación y Función de la Inmunoglobulina G Sérica Humana..... | 11 |
| Estructura de la IgG Sérica Humana..... | 11 |
| Función de la IgG Sérica Humana..... | 13 |
| Glicosilación Normal de la IgG Sérica Humana y su Importancia Biológica..... | 16 |
| Alteraciones en la Glicosilación Terminal de la IgG en Enfermedades Crónico-Degenerativas | 21 |
| Alteraciones en la Función del Sistema Inmune de los Pacientes Diabéticos..... | 23 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| Tipo de Investigación | 25 |

| | |
|---|-----------|
| Muestras de Estudio | 25 |
| Reactivos y Materiales | 26 |
| Cuantificación de Proteínas Séricas Totales de las Muestras Seleccionadas | 26 |
| Purificación de la IgG Sérica..... | 26 |
| Etapa 1: Cromatografía de Interacción Hidrofóbica..... | 27 |
| Etapa 2: Cromatografía de Afinidad Agarosa Anti-IgA..... | 28 |
| Etapa 3: Cromatografía de Afinidad Sefarosa Proteína-A..... | 28 |
| Estimación de la Pureza de la IgG por Electroforesis (SDS-PAGE) e Inmunodetección | 29 |
| Caracterización de la Glicosilación de IgG por ELLA | 30 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 32 |
| Cuantificación de Proteínas Totales Séricas..... | 32 |
| Purificación de la IgG Sérica por Cromatografía | 32 |
| Estimación de la Masa Molecular y de la Pureza de la IgG..... | 36 |
| Estimación de la Glicosilación Terminal de la IgG..... | 39 |
| CONCLUSIONES | 70 |
| BIBLIOGRAFÍA | 72 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. Representación del enlace N-glucosídico. | 4 |
| 2. Representación del enlace O-glucosídico. | 5 |
| 3. Pentasacárido nuclear común. | 6 |
| 4. Estructuras de los tres tipos de N- glicanos. | 8 |
| 5. Esquema de la biosíntesis de N- glicanos. | 12 |
| 6. Estructura de la IgG sérica humana. | 14 |
| 7. Isotipos o subclases de IgG. | 15 |
| 8. Estructura del oligosacárido biantenarico complejo presente en la IgG humana. | 17 |
| 9. Principales glicofomas de la IgG. | 19 |
| 10. Glicofomas sialiladas de la IgG. | 20 |
| 11. Cromatograma del aislamiento de inmunoglobulinas séricas en Sefarosa-6B altamente acetilada. | 33 |
| 12. Cromatograma del aislamiento de IgA total en agarosa anti-IgA. | 35 |
| 13. Cromatograma del aislamiento de la IgG sérica en Sefarosa CL-6B Proteína- A. | 37 |
| 14. Electroforesis SDS-PAGE de la fracción IgG. | 38 |
| 15. Curva generada entre el Log de la masa molecular de los marcadores de peso molecular y la movilidad relativa de las bandas en el gel. | 40 |
| 16. Electroforesis SDS-PAGE de IgG. | 41 |
| 17. Inmunodetección específica de la IgG pura. | 42 |
| 18. Interacción entre la lectina SNA y la IgG de pacientes y controles. | 45 |
| 19. Interacción entre la lectina MAA y la IgG de pacientes y controles. | 46 |
| 20. Interacción entre la lectina PNA y la IgG de pacientes y controles. | 48 |
| 21. Interacción entre la lectina RCAI y la IgG de pacientes y controles. | 48 |
| 22. Interacción entre la lectina ECA y la IgG de pacientes y controles. | 50 |
| 23. Interacción entre la lectina WGA y la IgG de pacientes y controles. | 51 |

| | |
|--|----|
| 24. Interacción entre la lectina Con A y la IgG de pacientes y controles. | 53 |
| 25. Interacción entre la lectina LCA y la IgG de pacientes y controles. | 54 |
| 26. Relación de densidad óptica SNA/MAA entre pacientes y controles. | 57 |
| 27. Relación de densidad óptica ECA/SNA entre pacientes y controles. | 58 |
| 28. Relación de densidad óptica ECA/MAA entre pacientes y controles. | 59 |
| 29. Relación de densidad óptica RCAI/SNA entre pacientes y controles. | 60 |
| 30. Relación de densidad óptica RCAI/MAA entre pacientes y controles. | 61 |
| 31. Relación de densidad óptica RCAI/ECA entre pacientes y controles. | 62 |
| 32. Relación de densidad óptica WGA/RCAI entre pacientes y controles. | 64 |
| 33. Relación de densidad óptica WGA/ECA entre pacientes y controles. | 65 |
| 34. Relación de densidad óptica WGA/SNA entre pacientes y controles. | 66 |
| 35. Relación de densidad óptica Con A/WGA entre pacientes y controles. | 67 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | Página |
|---|--------|
| I. Densidad óptica media obtenida por la interacción entre las lectinas y la IgG. | 44 |
| II. Relación de densidad óptica entre pares de lectinas afines hacia estructuras oligosacáridas de la IgG. | 56 |

OBJETIVOS

Objetivo General

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

Objetivos Específicos

1. Purificar y determinar el grado de pureza de la IgG sérica de pacientes y controles, con el fin de tener a la proteína pura para realizar el análisis de glicosilación terminal.
2. Determinar la afinidad de la IgG de los pacientes y controles hacia un grupo de lectinas vegetales con el fin de estimar la glicosilación terminal de la inmunoglobulina.
3. Comparar estadísticamente la afinidad de la IgG sérica de pacientes y controles por las lectinas vegetales para estimar las diferencias en la glicosilación terminal.

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un síndrome plurimetabólico que se caracteriza por hiperglicemia crónica. Los pacientes con DM2 son susceptibles al desarrollo de infecciones recurrentes así como de complicaciones vasculares y neurológicas.

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 G, responsable de la respuesta secundaria 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 IgG de los pacientes con DM2. Por esta razón, el presente trabajo se enfocó en buscar diferencias en la glicosilación terminal de la IgG de pacientes con DM2 con respecto a la 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. La IgG de los pacientes con DM2 y los sujetos control, se purificó utilizando un esquema cromatográfico de tres etapas en secuencia, utilizando una matriz de Sefarosa 6B altamente acetilada en la primera etapa, con la que se logró aislar a las inmunoglobulinas totales del resto de las proteínas del suero; agarosa-anti IgA en la segunda etapa, con la que se separó a la IgA total del resto de las inmunoglobulinas, y en la tercera etapa se utilizó una matriz de Sefarosa-Proteína A, con el fin de aislar a la IgG del resto de las inmunoglobulinas. La elevada pureza de la IgG de la fracción de elución de la última etapa cromatográfica fue comprobada por electroforesis en condiciones desnaturizantes y reductoras e inmunodetección.

La estimación de la glicosilación terminal de la IgG pura fue realizada mediante ensayos con lectinas ligadas a una enzima (ELLA), utilizando una batería de lectinas vegetales con afinidad específica hacia uno o un grupo de carbohidratos determinados. Las lectinas utilizadas fueron: *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* (PNA), *Ricinus communis I* (RCAI), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) y *Triticum vulgare* (WGA).

Los resultados obtenidos con las lecturas individuales de las lectinas (SNA, MAA, PNA, RCAI, ECA, Con A, y WGA) y las relaciones entre lectinas (SNA/MAA, ECA/SNA, RCAI/SNA, WGA/ECA, WGA/RCAI y Con A/WGA) sugieren que los N-oligosacáridos de la IgG sérica están hiposialilados e hipogalactosilados en el grupo de pacientes con DM2, en comparación con el grupo control. La disminución de galactosa (incluyendo ácido siálico) deja expuesto al siguiente carbohidrato de la cadena oligosacárida (GlcNAc). Además, la lectura individual de la lectina LCA sugirió que el centro quitobiosa de la IgG de pacientes con DM2 se encuentra hipofucosilado.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) se define como un síndrome plurimetabólico crónico, de alta prevalencia a nivel mundial, que conduce a alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, aunado a elevadas tasas de morbilidad y muerte en los pacientes que la padecen (Organización Mundial de la Salud, 2008). La hiperglicemia crónica del paciente con DM2, contribuye al desarrollo de complicaciones microvasculares y macrovasculares. Otra complicación frecuente en los sujetos con DM2, producto de un sistema inmune deteriorado, es el desarrollo de infecciones recurrentes (Andreasen y col., 2010; Deresinski, 1995; Papanas y col., 2010). Se desconocen los mecanismos patogénicos responsables de la elevada susceptibilidad a las infecciones de los pacientes diabéticos, pero podrían estar vinculados tanto con alteraciones en el sistema inmune, tanto innato como adquirido (Abrass, 1991; Geerlings y Hoepelman, 1999; Pickup, 2004).

La IgG, principal inmunoglobulina secretada durante la respuesta humoral e involucrada en la activación del complemento frente a un antígeno, es una glicoproteína que posee dos sitios conservados de N-glicosilación, en la Asn-297 del dominio constante CH2 de las cadenas pesadas. Los oligosacáridos son biantenarios complejos (Bond y col., 1993; Byrne y col., 2007; Kobata, 1990; Scallon y col., 2007; Wuhrer y col., 2008) con tres glicofomas principales: IgG-G0 (IgG agalactosilada), que representa el 35% del total de glicanos; IgG-G1 (IgG monogalactosilada), que constituye el 35% del total de glicanos, y la IgG-G2 (IgG digalactosilada), que representa el 16% de los glicanos de la IgG. El 14% remanente lo constituyen glicofomas G1 y G2 con ácido siálico terminal (Arnold y col., 2007; Butler y col., 2003; Shields y col., 2002).

Se sabe que las modificaciones en el glicano de la IgG pueden alterar su solubilidad, conformación, y el reconocimiento por receptores de macrófagos o

linfocitos, así como por el sistema de aclaramiento proteico y de activación de la vía del complemento (Bond y col., 1993; Shields y col., 2002; Sumar y col., 1991).

Los cambios en la glicosilación terminal de proteínas séricas como la inmunoglobulina A1 polimérica (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 (Havenaar y col., 1998; Higai y col., 2003) . A su vez, la alteración en la glicosilación de las proteínas séricas podrían 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 aún no comprendidos, 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 IgG de un grupo de pacientes con DM2.

Para llevar a cabo este proyecto, se realizó un estudio transversal, observacional y analítico, en el que se purificó la IgG sérica de las muestras sanguíneas de nueve pacientes con DM2 y de siete personas euglicémicas aparentemente sanas. Los cambios de glicosilación de la IgG fueron estimados por lectinoensayos (ELLA) con una batería de lectinas vegetales con afinidad específica hacia uno o un grupo de carbohidratos. El análisis estadístico de los resultados de los lectinoensayos fue realizado por la prueba T de Student.

ANTECEDENTES

Tipos de Glicosilación Proteica, Estructura y Biosíntesis de los N-Glicanos

Glicosilación proteica

La glicosilación proteica es el proceso de adición serial de carbohidratos a una proteína (Voet y col., 2007). Existen varios tipos de glicoproteínas, de las cuales dos son las más abundantes: las N-Glicoproteínas y las O-Glicoproteínas. En las N-Glicoproteínas, el carbohidrato (*N*-acetilglucosamina) se une al grupo amino de la cadena lateral del aminoácido asparagina o glutamina de la proteína (Figura 1). En las O-Glicoproteínas el lugar de unión del carbohidrato (*N*- acetilgalactosamina) (Figura 2), es el grupo hidroxilo de las cadenas laterales de los aminoácidos serina y treonina de la proteína (Murray y col., 2001).

La N-glicosilación es el tipo de glicosilación que será descrito a continuación debido a que la inmunoglobulina G sólo presenta N-oligosacáridos en los sitios conservados de glicosilación. La N-glicosilación de la IgG inicia de modo cotraduccional, es decir, la adición de carbohidratos a la cadena oligosacárida ocurre mientras el polipéptido se sintetiza en los ribosomas. Los pasos exactos del proceso de enlace N- de los oligosacáridos varían con el tipo de glicoproteína y con el conjunto de glucosiltransferasas y glucosidasas de la célula, pero todos los oligosacáridos N-enlazados tienen un pentasacárido nuclear común (Figura 3). A diferencia de los N-oligosacáridos, los oligosacáridos O-enlazados se sintetizan de manera postraduccional, es decir, la adición serial de unidades de monosacáridos inicia cuando la síntesis de la cadena polipeptídica ha finalizado (Opdenakker y col., 1993; Voet y col., 2007) . La

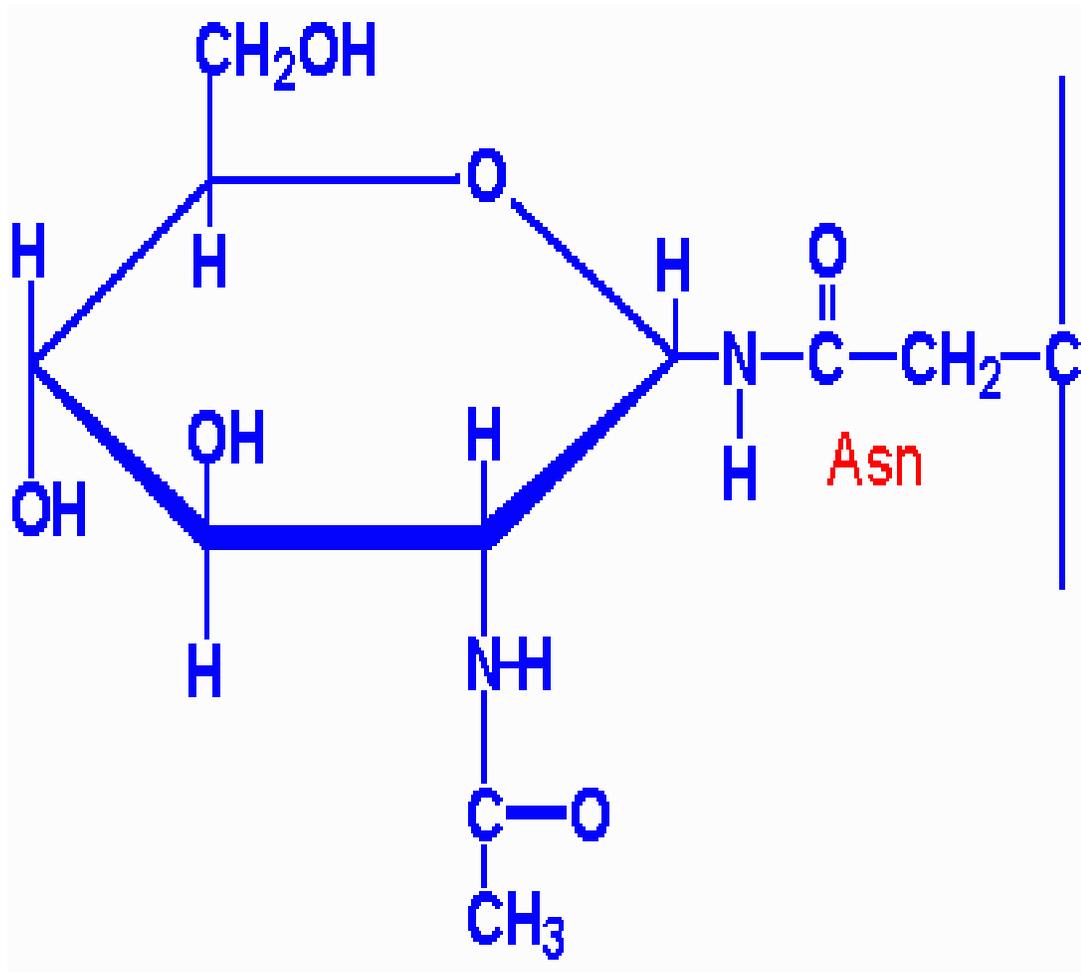


Figura 1. Representación del enlace N-glucosídico.

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

Fuente: Voet y col., 2007.

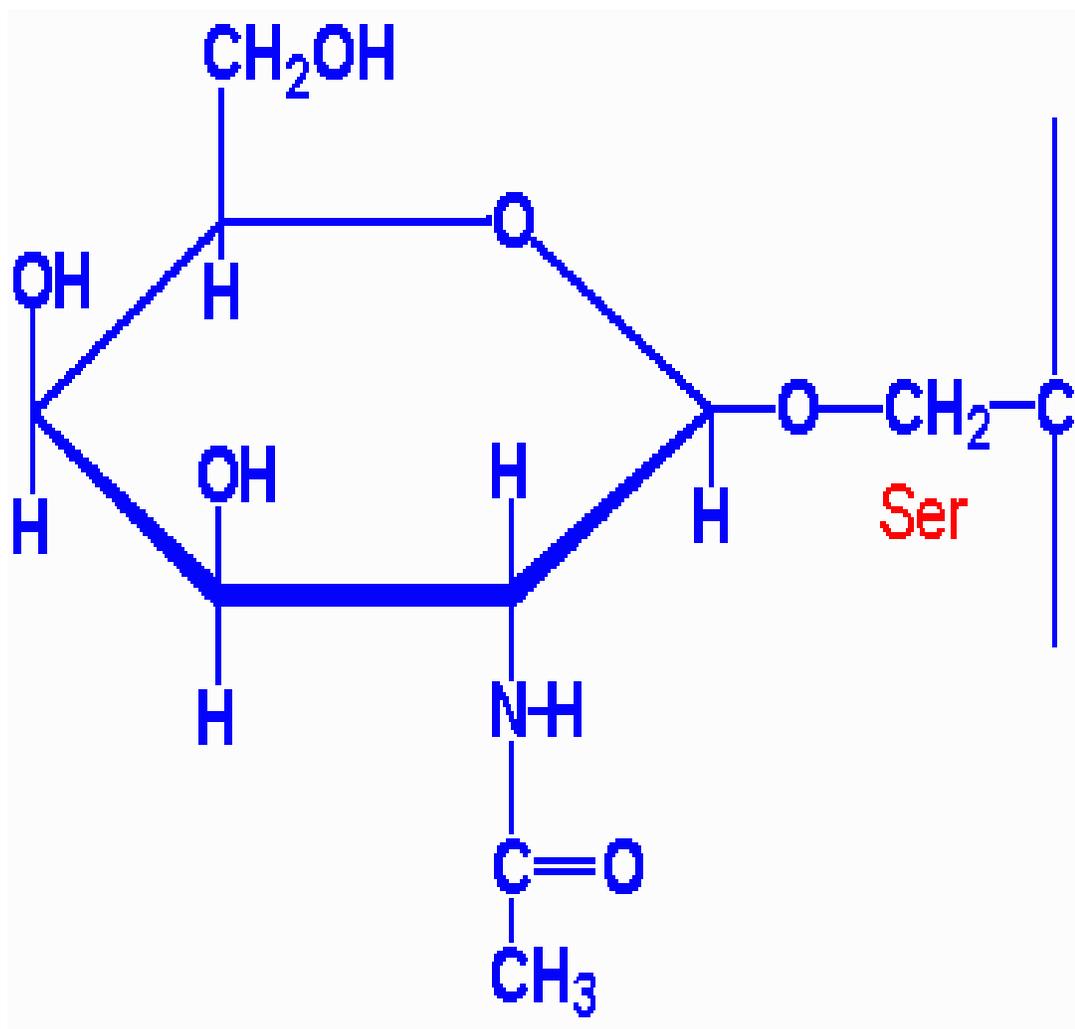


Figura 2. Representación del enlace O-glucosídico.

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: Voet y col., 2007.

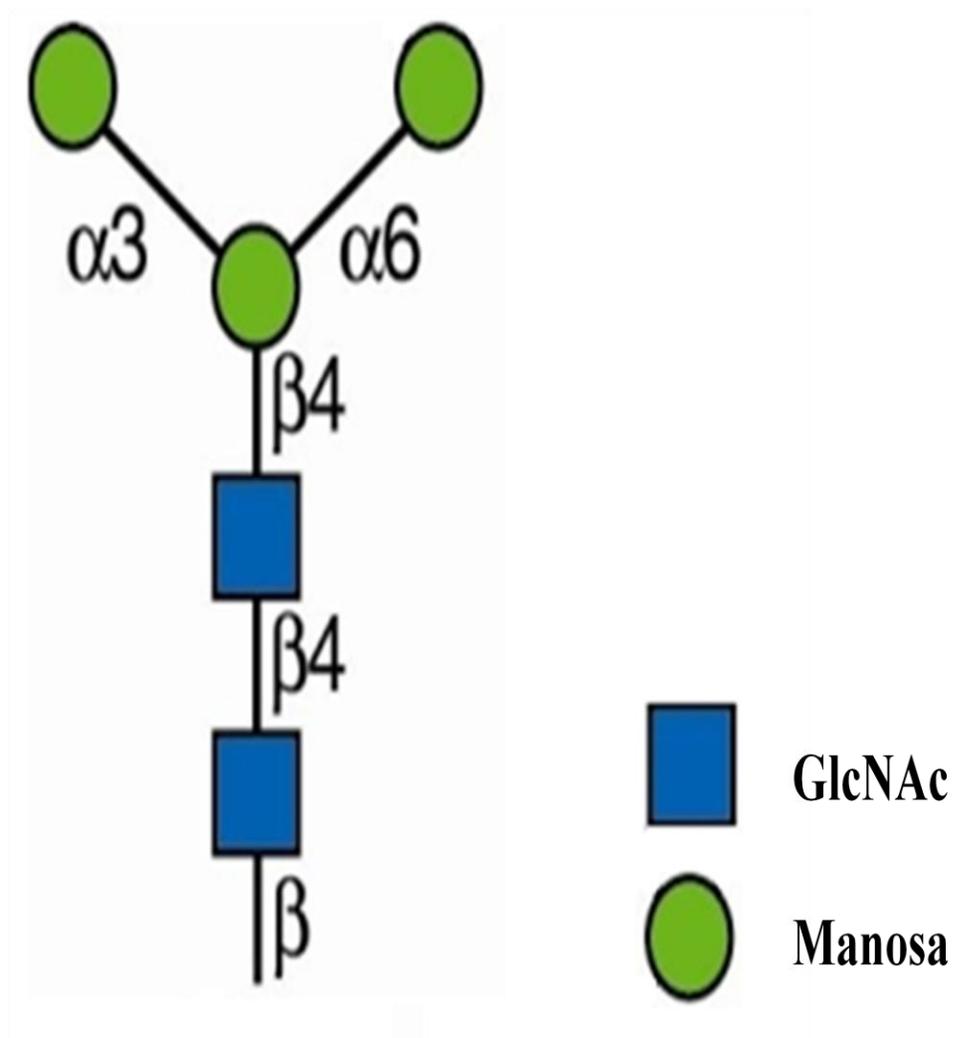


Figura 3. Pentasacárido nuclear común.

El centro quitobiosa 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 Varki y col., 2009.

glicosilación terminal de las N-glicoproteínas también es un proceso postraduccional y las enzimas que participan en la adición y remoción final de carbohidratos terminales, son afectadas por enfermedades crónicas como la diabetes (Vázquez-Moreno y col., 2001). Por lo anterior, es de esperarse que en los pacientes con diabetes no haya modificaciones en la estructura central de los N-oligosacáridos de la IgG sino sólo en la parte terminal de éstos.

Estructura de los N-Glicanos.

Las glicoproteínas con enlaces N- se distinguen por la presencia de uniones del tipo Asn-GlcNAc. Las N-glicoproteínas constituyen la clase principal de glicoproteínas, tanto circulantes como las unidas a membranas. La diferencia entre ellas está dada fundamentalmente por dos elementos: su biosíntesis y la naturaleza de los aminoácidos unidos a la cadena de oligosacáridos (Murray y col., 2001).

Todos los N-glicanos comparten un pentasacárido nuclear común, el $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$, sin embargo difieren en sus ramas externas, las cuales pueden ser muy variadas y complejas. Hasta hoy se han reconocido cuatro grupos de oligosacáridos con enlaces N, sin embargo tres de ellos son los más importantes, dentro de los cuales se encuentran los complejos, los de alto contenido de manosa (oligomanosa) y los híbridos (Figura 4) (Varki y col., 2009).

Por lo general, las glicoproteínas de la clase compleja, poseen residuos terminales de NeuAc y residuos adyacentes de galactosa y de GlcNAc. La mayor parte de los oligosacáridos complejos contienen dos, tres, cuatro, e incluso cinco ramas o antenas, por lo tanto pueden encontrarse estructuras bi, tri tetra y penta antenarias. Los N-glicanos de alto contenido de manosa, únicamente contienen de dos a seis residuos de D-manosa unidos al pentasacárido nuclear común (Varki y col., 2009).

Las moléculas híbridas como su nombre lo indica, poseen características de las dos clases anteriores; sólo poseen residuos de manosa en las uniones $\text{Man}\alpha 1-6$ en uno de los brazos unido al centro quitobiosa (pentasacárido nuclear común) y otros azúcares en uniones $\text{Man}\alpha 1-3$ al otro brazo (Murray y col., 2001).

Biosíntesis de los N-Glicanos

La biosíntesis de los N-glicanos inicia de modo contraduccional (la adición de carbohidratos a la cadena oligosacárida ocurre mientras el polipéptido se sintetiza en los ribosomas). El primer paso en la biosíntesis de N-glicanos ocurre en el retículo endoplásmico rugoso, que inicia con la transferencia de un oligosacárido compuesto por 14 azúcares ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) del dolicol difosfato al residuo de Asn en el polipéptido que se está sintetizando (De Praeter y col., 2000). Antes de su participación en la biosíntesis de glicoproteínas, el dolicol debe fosforilarse para formar dolicol fosfato, en una reacción catalizada por la dolicol cinasa, que emplea ATP como donador de fosfato. En una reacción subsecuente, en la membrana del retículo endoplásmico, se obtiene GlcNAc-dolicol difosfato, lípido clave que actúa como receptor de otros azúcares en el ensamblaje del oligosacárido-P-Pdolicol; dicha reacción es catalizada por la GlcNAc-P transferasa, a partir de Dol-P y UDP-GlcNAc. De esta manera se concluye la primera etapa en el ensamblaje del oligosacárido (Murray y col., 2001; Varki y col., 2009).

Posteriormente, un segundo residuo de GlcNAc se adiciona al GlcNAc-dolicol difosfato, utilizando de nuevo UDP-GlcNAc. Una vez que se ha formado el 2-GlcNAc-P-Pdolicol, la cadena oligosacárida aumenta con la adición serial de cinco residuos de manosa, utilizando GDP-manosa como donador. A diferencia de la reacción descrita anteriormente, otros cuatro residuos de manosa se adicionan a la cadena oligosacárida, pero el Dol-P-Man es el que actúa como donador de manosa (el Dol-P-Man se forma de la reacción entre Dol-P y GDP-Man). Por último, se adicionan tres

residuos de glucosa donados por el Dol-P-Glc, el cual se forma de una reacción análoga a la descrita anteriormente, de esta manera el oligosacárido compuesto por 14 azúcares ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) se ha completado para proseguir con el siguiente paso en la síntesis de la glicoproteína (De Praeter y col., 2000). El oligosacárido unido al dolicol-P-P que fue sintetizado, tanto en la superficie citoplasmática, como luminal de las membranas del retículo endoplásmico, es transferido en conjunto, para formar un enlace N-glucosídico con un residuo de Asn de una proteína receptora que emerge de la superficie luminal de la membrana del retículo endoplásmico. La reacción es catalizada por la oligosacárido-transferasa. Para que esta transferencia se lleve a cabo, la Asn debe formar parte de una secuencia aminoacídica o triplete Asn-Xaa-Ser/Thr (donde Xaa puede ser cualquier aminoácido excepto prolina) (Opdenakker y col., 1993). Una vez que el oligosacárido se ha transferido a la proteína, se inicia el procesamiento de la cadena oligosacárida, proceso que dependerá de la proteína que se está sintetizando, sin embargo estas modificaciones a la cadena oligosacárida, se pueden resumir en dos fases: una fase temprana y una tardía.

La fase temprana inicia en el retículo endoplásmico con la remoción de tres residuos de glucosa. El primer residuo es removido por la glucosidasa I y los dos siguientes por acción de la enzima glucosidasa II. Si la glicoproteína que se está sintetizando fuera de la clase de alto contenido en manosa, el proceso terminaría aquí, o bien seguiría hasta la remoción de cuatro residuos de manosa. No obstante lo anterior, para la formación de cadenas complejas, son necesarios los siguientes pasos adicionales. Una vez concluida la remoción de los tres residuos de glucosa, se prosigue con la movilización de cuatro residuos de manosa, mediante al menos dos manosidasas distintas; esto debido a que una actúa en el retículo endoplásmico y la otra en la cisterna cis del aparato de Golgi (Murray y col., 2001).

En la siguiente reacción (en la cisterna medial del aparato de Golgi) un residuo de GlcNAc es adicionado al residuo de manosa del extremo $\text{Man}\alpha 1-3$, mediante la

GlcNAc transferasa. La acción de esta última enzima, da lugar a la remoción de dos residuos más de manosa; de esta manera termina la fase temprana (Murray y col., 2001).

La fase tardía continua en la cisterna medial del aparato de Golgi, donde se adiciona un segundo GlcNAc al residuo periférico de manosa, al otro extremo de la estructura biantenaria; dicha reacción es catalizada por la enzima GlcNAc transferasa II. Posteriormente las enzimas fucosil, galactosil y sialil transferasas se encargan de la adición de fucosa, galactosa y ácido siálico respectivamente, reacciones que se realizan principalmente en la cisterna trans del aparato de Golgi, terminando así, con la síntesis del glicano (Murray y col., 2001).

Cabe mencionar que las glicoproteínas se movilizan del retículo endoplásmico al aparato de Golgi mediante vesículas, y de igual manera la formación de vesículas de glicoproteínas son necesarias para la movilización entre las tres cisternas del aparato de Golgi (cis, medial y trans) (De Praeter y col., 2000; Murray y col., 2001; Varki y col., 2009) (Figura 5).

Estructura, Glicosilación y Función de la Inmunoglobulina G Sérica Humana

Estructura de la IgG Sérica Humana

Existen cinco tipos de inmunoglobulinas que constituyen el sistema inmune humoral del humano, y la inmunoglobulina G (IgG) es la más abundante, representando el 75 % de las inmunoglobulinas circulantes. La IgG tiene una concentración sérica de 15 a 18 mg/mL. Su masa molecular es de 150 kDa y está compuesta por dos cadenas pesadas H (γ), con una masa individual aproximada de 50 kDa, y dos cadenas ligeras con una masa de 25-26 kDa (L κ o L λ) cada una.

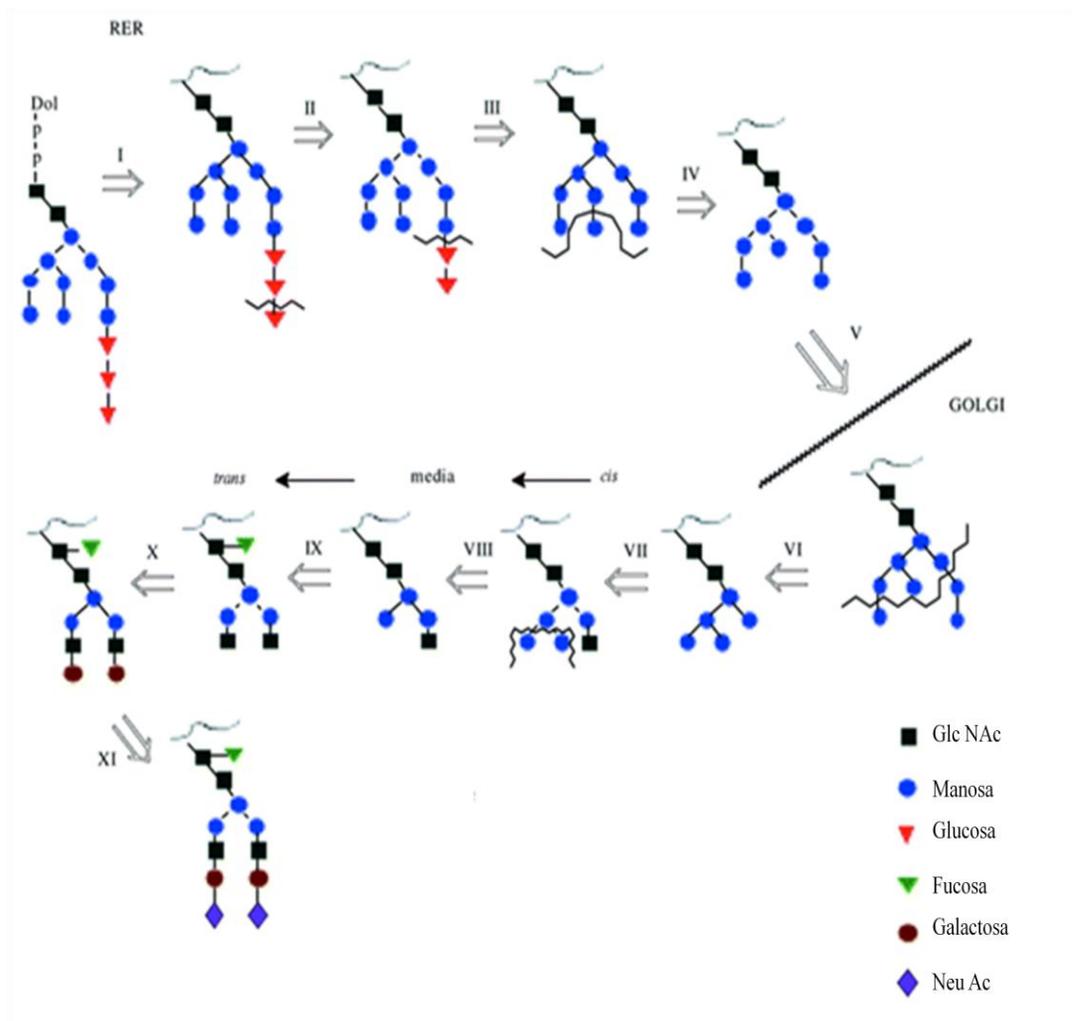


Figura 5. Esquema de la biosíntesis de N- glicanos.

Las reacciones son catalizadas por las siguientes enzimas: **I**, Oligosacárido proteína transferasa; **II**, α - glucosidasa I; **III**, α - glucosidasa II; **IV**, α -1,2 manosidasa del retículo endoplásmico; **V**, α -manosidasa I del retículo endoplásmico; **VI**, N-acetilglucosaminiltransferasa I; **VII**, α -manosidasa II del retículo endoplásmico; **VIII**, N-acetilglucosaminiltransferasa II; **IX**, Fucosiltransferasa; **X**, Galactosiltransferasa y **XI**, Sialiltransferasa.

Fuente: Modificado de Voet y col., 2007

Las cadenas ligeras están unidas covalentemente a las cadenas pesadas, al igual que las cadenas pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro (Arnold y col., 2007; Kobata, 1990; Turner, 1992) (Figura 6).

Existen cuatro isotipos o subclases de IgG: IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 (Jefferis y col., 1994) (Figura 7). La principal diferencia estructural entre las subclases se ubica en la región de bisagra, la cual es totalmente específica tanto en términos de la cantidad y tipo de aminoácidos, como del número de puentes disulfuro presentes entre las cadenas de cada isotipo. Las proporciones de las cuatro diferentes isoformas de IgG en el torrente sanguíneo son: 60-70% de la subclase IgG1, 20-30% de IgG2, 5-8% de IgG3 y el 1-3% restante corresponde a la clase IgG4. Las IgG1 e IgG3 alcanzan los niveles normales de adulto a los 5-7 años de edad mientras que los niveles de IgG2 e IgG4 aumentan más lentamente, alcanzando los niveles normales de adulto aproximadamente a los 10 años de edad (Wang y Gosh, 2009).

Función de la IgG Sérica Humana

La IgG juega un papel importante en el sistema inmune humoral. Es la principal inmunoglobulina de la respuesta inmune humoral secundaria y, por lo tanto, la inhabilidad de producir anticuerpos de una subclase específica, puede hacer que el individuo sea susceptible a ciertas clases de infecciones pero no a otras. Cada subclase posee una función biológica específica, en respuesta a antígenos específicos. Por ejemplo, las subclases IgG1 e IgG3 actúan contra proteínas tales como las toxinas producidas por las bacterias de la difteria y tétanos, así como contra proteínas virales.

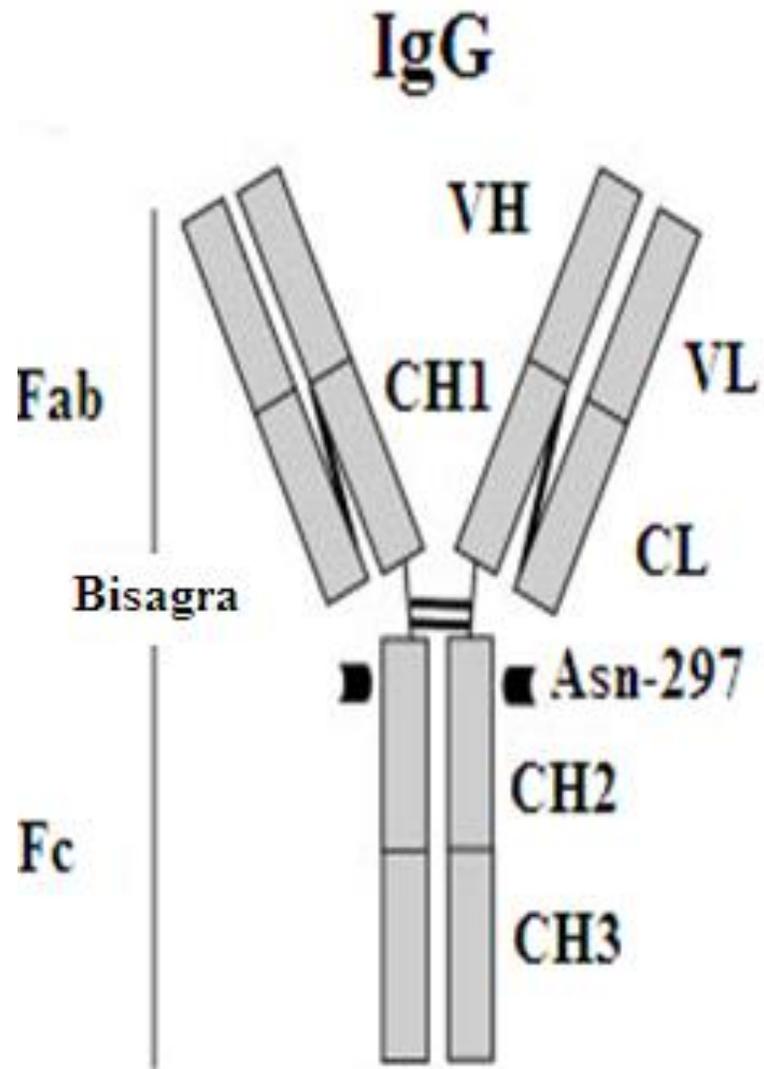


Figura 6. Estructura de la IgG sérica humana.

La IgG está constituida por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las cadenas ligeras se encuentran unidas covalentemente a las cadenas pesadas por puentes disulfuro.

Fuente: Modificada de Arnold y col., 2005.

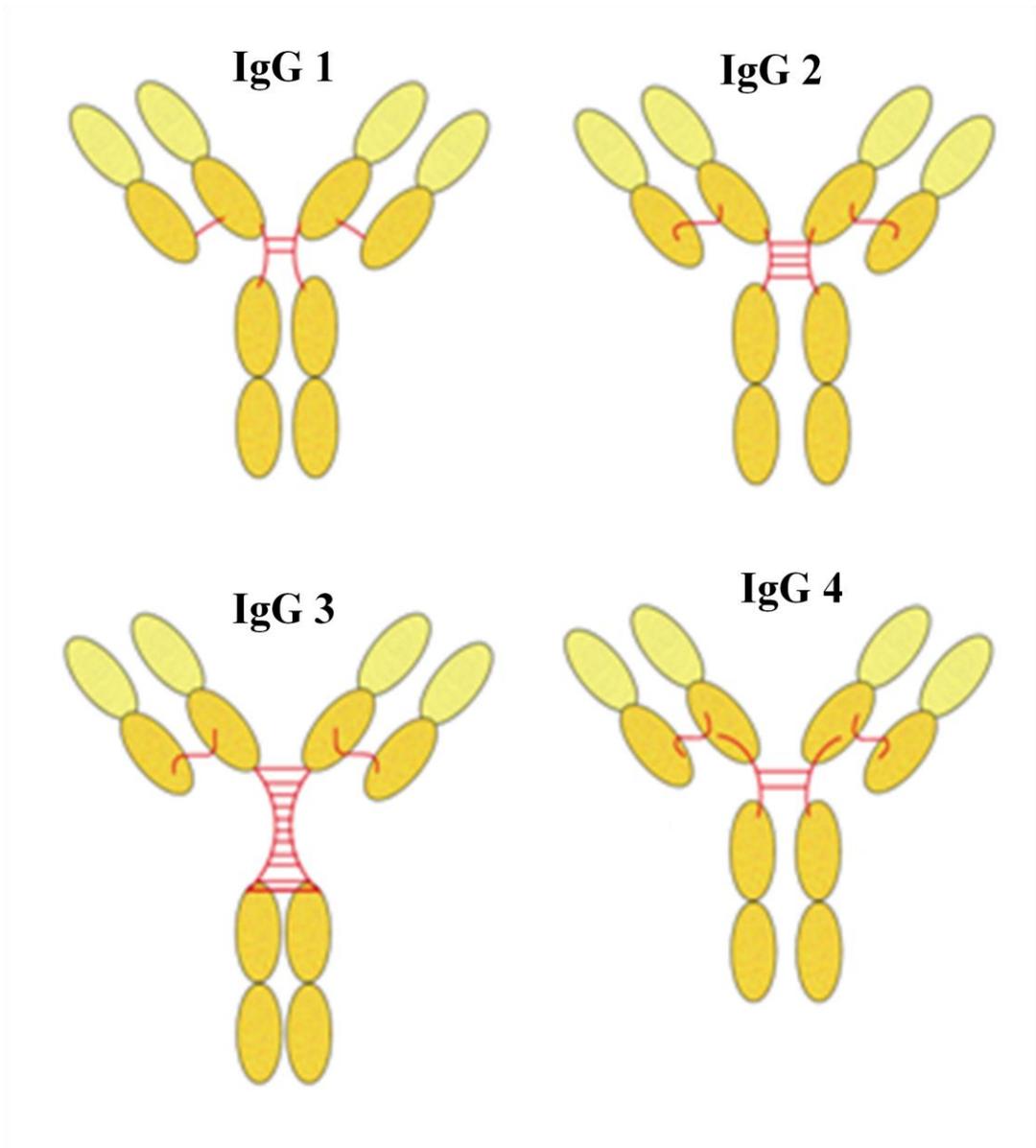


Figura 7. Isotipos o subclases de IgG.

La principal diferencia estructural entre las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 se ubica en la región bisagra, la cual es totalmente distinta en términos de la cantidad y tipo de aminoácidos.

Fuente: http://img.medscape.com/pi/emed/ckb/allergy_immunology

En contraste, la IgG2 actúa contra la cápsula de polisacáridos de algunas bacterias patógenas como neumococo y *Haemophilus influenzae*; la habilidad de producir anticuerpos a subclase IgG2, se desarrolla más lentamente que la habilidad de producir anticuerpos contra proteínas (Wang y Gosh, 2009).

Glicosilación Normal de la IgG Sérica Humana y su Importancia Biológica

La IgG es una glicoproteína que posee dos sitios conservados de N-glicosilación para la unión de oligosacáridos biantenarios complejos a la Asn-297 del dominio constante CH2 de las cadenas pesadas (Figura 8) (Bond y col., 1993; Byrne y col., 2007; Kobata, 1990; Scallon y col., 2007; Wuhner y col., 2008). Se pueden encontrar cadenas oligosacáridas adicionales en el fragmento Fab de las cadenas ligeras y pesadas, pero no son sitios conservados de glicosilación, sino la consecuencia de los cambios en la secuencia aminoacídica de la región variable que a su vez determinan la variación profunda en la cantidad y la ubicación de los oligosacáridos asociados a la región Fab, aún entre las poblaciones de moléculas que constituyen una misma subclase de inmunoglobulina (Mimura y col., 2007; Raju, 2008).

La microheterogeneidad estructural del oligosacárido biantenarico complejo de la IgG se expresa por las diferencias cuali y cuantitativas en el contenido de los residuos de monosacáridos terminales, tales como el ácido siálico, galactosa, fucosa y GlcNAc (Hajdukovic-Dragojlovc y col., 1997). Los glicanos presentes en las inmunoglobulinas juegan un papel muy importante con respecto a su funcionalidad. Su importancia radica en que juegan un rol estructural crucial que incluye: mantener la solubilidad y conformación de la proteína, facilitando el transporte subcelular, secreción, sistema de aclaramiento y el mantenimiento de las funciones efectoras (Arnold y col., 2007; Opdenakker y col., 1993). Así mismo, el glicano ayuda a mantener la estructura cuaternaria y la estabilidad del Fc, así como a proporcionar epitopos para la unión de lectinas (Arnold y col., 2007).

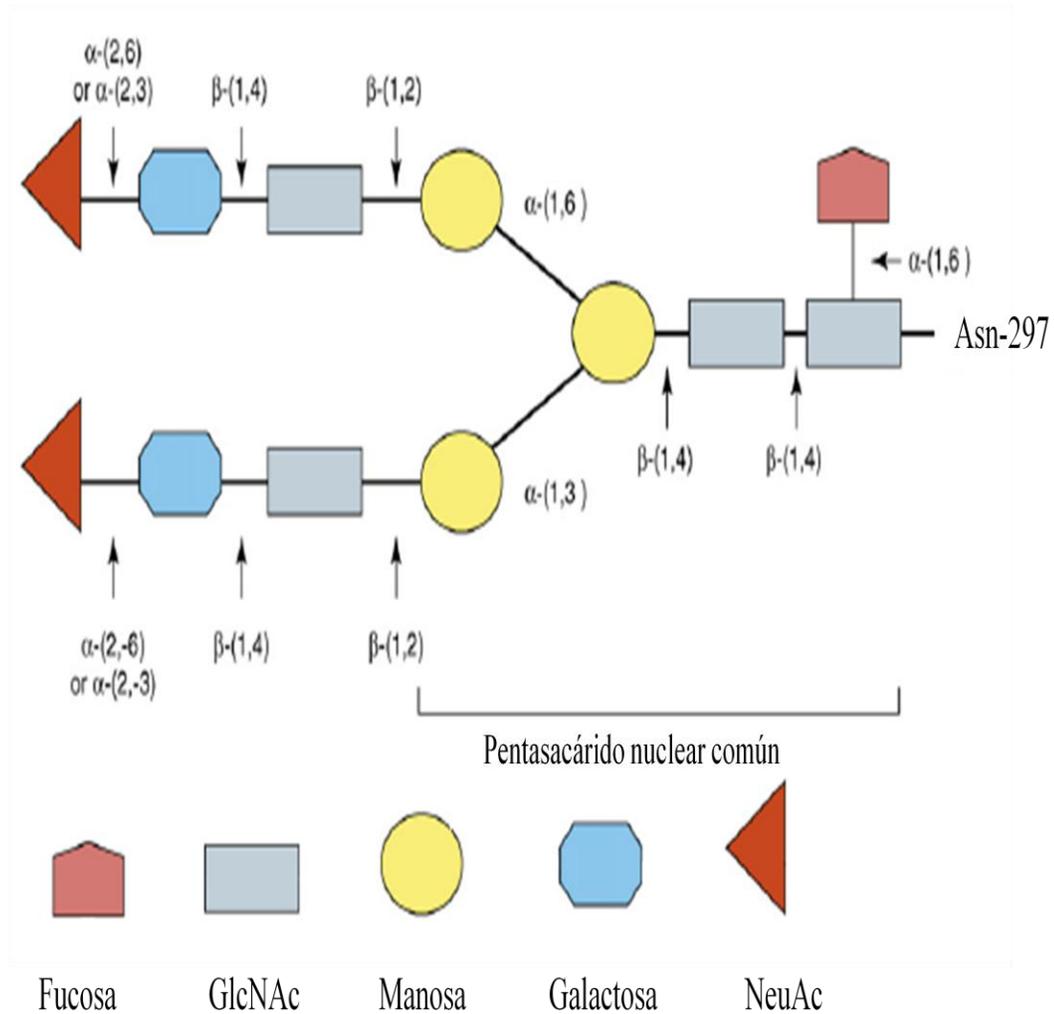


Figura 8. Estructura del oligosacárido biantenario complejo presente en la IgG humana.

El oligosacárido se encuentra unido al residuo de Asn-297 de cada cadena pesada de la proteína. En la figura se observa al NeuAc como residuo terminal de ambas antenas, sin embargo la presencia de NeuAc es poco frecuente.

Fuente: Modificado de Byrne y col., 2007.

Los estudios con cristalografía de rayos X, sugieren que la IgG puede mostrar distintas estructuras oligosacáridas en sus dos sitios conservados de N-glicosilación. Así, los glicanos ubicados en la Asn-297 se agrupan en una gran familia de 32 glicanos que puede dividirse en tres clases: IgG-G0, IgG-G1 e IgG-G2 (Arnold y col., 2007; Jefferis y col., 1990) (Figura 9). La clase IgG-0 o agalactosilada representa el 35% de los glicanos; se caracteriza por no contener residuos de galactosa en ninguna de sus antenas, por lo tanto, ambos brazos terminan en GlcNAc; aparentemente, los niveles séricos de IgG-0 incrementan después de los 25 años de edad. Por otra parte, la clase IgG-G1 representa el 35% de los glicanos que poseen un residuo de galactosa en una de sus antenas, de esta manera quedan expuestos los residuos de GlcNAc en un brazo y de galactosa en el otro brazo (Butler y col., 2003). En las glicofomas de la clase IgG-G2, que constituye el 16% de los glicanos de la IgG, ambos brazos del oligosacárido terminan en residuos de galactosa. Las glicofomas IgG-G1 e IgG-G2, frecuentemente están sialiladas (tienen un residuo de ácido siálico terminal ligado a cada una de las galactosas terminales) (Figura 10) constituyendo el 14% de las glicofomas remanentes (Arnold y col., 2007; Butler y col., 2003; Shields y col., 2002).

El ácido siálico puede estar ligado covalentemente a la galactosa por uniones predominantemente α 2-6, aunque también puede haberlas de tipo α 2-3 (Parekh y col., 1988). Sin embargo, es importante destacar que el proceso de incorporación de ácido siálico durante el proceso de glicosilación postraducciona de los oligosacáridos N-ligados a la Asn 297 de la IgG es altamente ineficiente. Esto es debido fundamentalmente a que los oligosacáridos se localizan en el espacio intersticial entre los dominios constantes CH2 de las cadenas pesadas, una cavidad relativamente hidrofóbica que limita la acción de las enzimas galactosiltransferasa y sialiltransferasa, que catalizan la incorporación de la galactosa y del ácido siálico al oligosacárido en construcción, respectivamente (Arnold y col., 2007; Dwek, 1995).

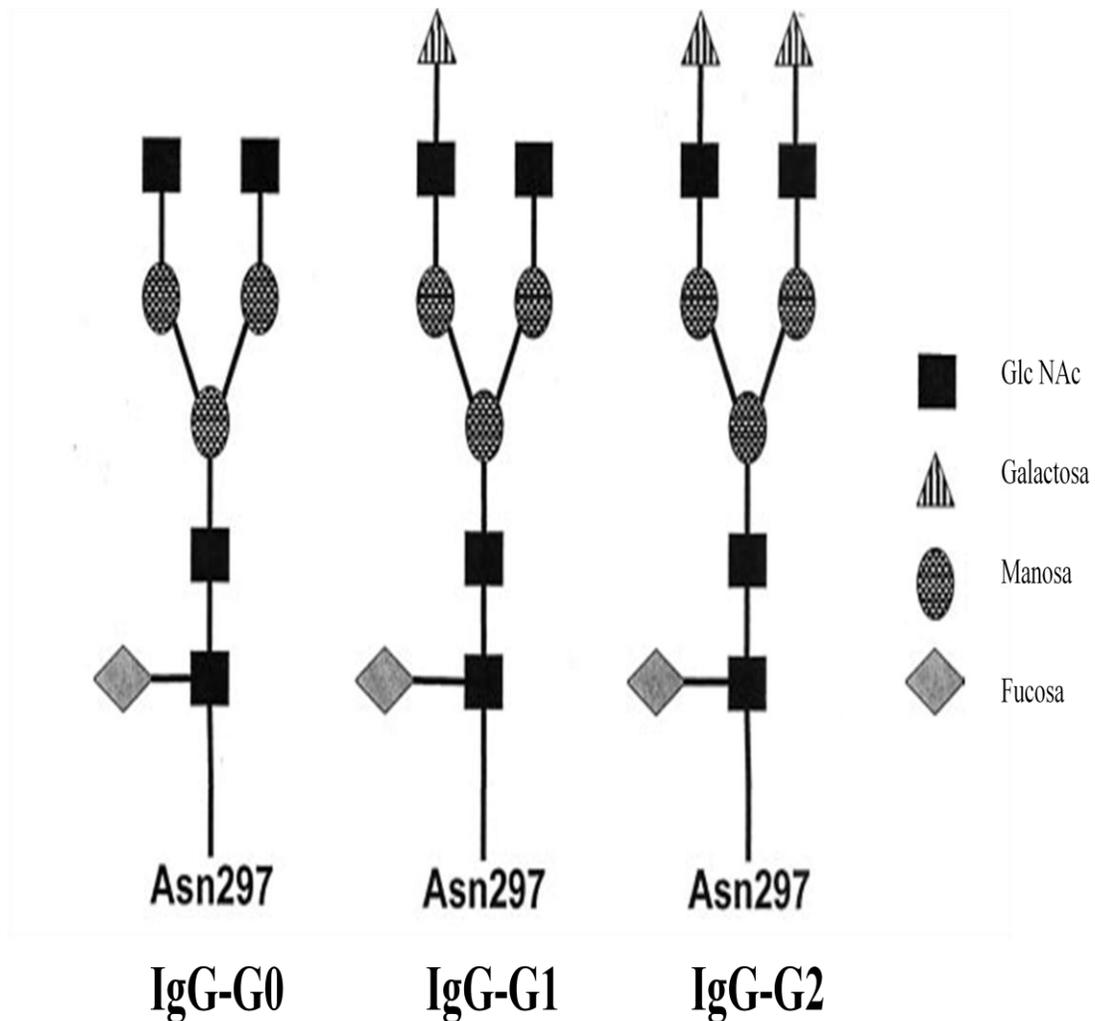


Figura 9. Principales glicoformas de la IgG.

Son tres las glicoformas principales de la IgG; la IgG-0, IgG-G1 y la IgG-2. La clase IgG-0, se caracteriza por no contener residuos de galactosa en ninguna de sus antenas, la glicoforma IgG-G1, posee un residuo de galactosa en una de sus antenas, mientras que la IgG-G2, posee residuos de galactosa en ambos brazos del oligosacárido.

Fuente: Modificado de Shields y col., 2002.

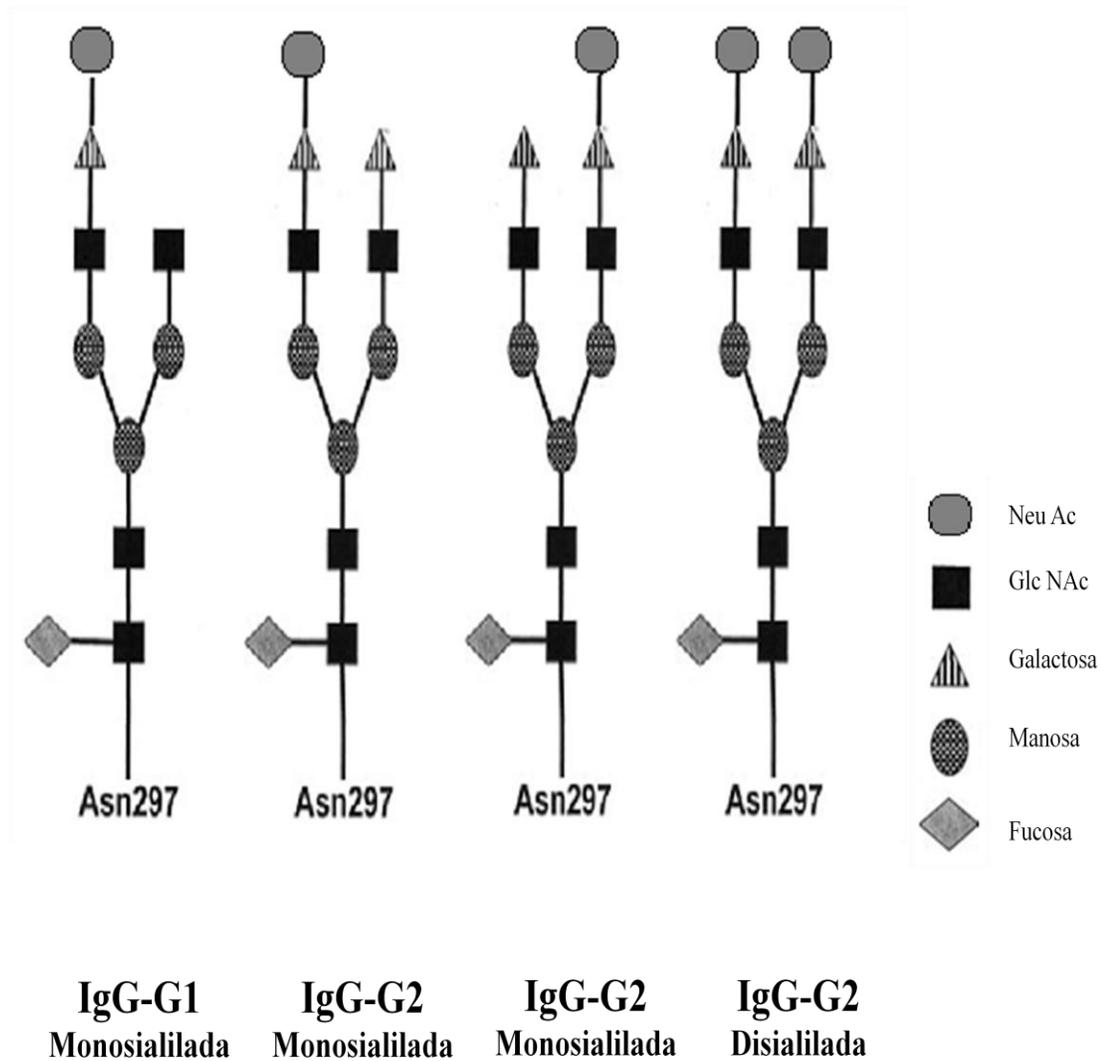


Figura 10. Glicoformas sialiladas de la IgG.

Las glicoformas IgG-G1 e IgG-G2, presentan variaciones estructurales debido al número de residuos de ácido siálico terminales y al tipo de unión con la galactosa, que puede ser α -2-3 ó α -2-6, siendo el último el enlace predominante.

Fuente: Modificado de Shields y col., 2002.

Alteraciones en la Glicosilación Terminal de la IgG en Enfermedades Crónico-Degenerativas

La estructura final de los N-oligosacáridos de la IgG no sólo es limitada por su ubicación intramolecular en los sitios conservados de glicosilación; también se ha documentado que el glicano de la IgG sufre variaciones fisiológicas asociadas con la edad y el embarazo (Rademacher y col., 1994). Además, algunas enfermedades crónico degenerativas como la artritis reumatoide (RA) y la osteoartritis (Wuhrer y col., 2008) influyen importantemente en la estructura final de los N-oligosacáridos de la IgG. En la artritis reumatoide, el contenido de galactosa de la IgG disminuye considerablemente predominando la glicofoma G0 (Bond y col., 1993; Pasek y col., 2006; Sumar y col., 1990). La glicosilación de la proteína influye básicamente en su función efectora, en la unión a los receptores de IgG ubicados en macrófagos y en linfocitos, en la activación de la vía del complemento, en el reconocimiento del receptor Fc y en la citotoxicidad mediada por células. Por lo tanto, es muy probable que la alteración en la glicosilación de la IgG pueda estar asociada con la patogénesis de las enfermedades antes citadas (Bond y col., 1993; Shields y col., 2002; Sumar y col., 1991). Al respecto, hay evidencias de que la abundancia de glicofomas G0 en la IgG esté vinculada con la activación de la vía del complemento mediada por la lectina unidora de manosas (MBL), lo que conlleva a la inflamación en las articulaciones. Esto es debido a la interacción directa del oligosacárido agalactosilado con proteínas afines a carbohidratos como la MBL (Arnold y col., 2007; Malhotra y col., 1995; Nimmerjahn y col., 2007; Rudd y col., 2001; Wuhrer y col., 2008).

En la DM2 también se han observado alteraciones en la cadena oligosacárida de otra glicoproteína del sistema inmune, la inmunoglobulina A1 (IgA1). Tales cambios podrían ayudar a explicar parcialmente la participación patogénica de la IgA1 en complicaciones como la nefropatía diabética (enfermedad definida como, la dominancia y codominancia de la IgA, para formar complejos inmunes de IgA en el mesangio

glomerular) y a la autoagregación de la IgA1 (Emancipator y col., 1999; Homma y col., 2006; Jennette, 1988; Suzuki y col., 2008). Diversos estudios han demostrado que la inusual sialilación de la IgA1, posiblemente afecta el aclaramiento de la IgA1 polimérica, por lo tanto, el incremento sérico de la proteína podría ser originado por el aclaramiento ineficaz de la IgA1, en vez del aumento en la tasa de síntesis de la proteína (Vázquez-Moreno y col., 2001). En el 2001, Vázquez-Moreno y col, reportaron que la IgA1 macromolecular de pacientes con diabetes mellitus, se encontraba hipersialidada, y que éste podría ser un factor por el cual la IgA1 se encuentra; los asialoreceptores remueven de circulación a todas las asialoglicoproteínas para su posterior degradación a aminoácidos y el reciclaje de los carbohidratos de los oligosacáridos (Ashwell y Harford, 1982; Spiess, 1990). Sin embargo, aún es necesaria la caracterización de otras inmunoglobulinas para poder explicar fenómenos que aún no tienen explicación, como la elevada susceptibilidad y el escaso control de las infecciones en los pacientes diabéticos (Geerlings y Hoepelman, 1999).

También en el caso de la nefropatía por IgA, la enfermedad renal de mayor prevalencia mundial (Gharavi y col., 2011; Narayan y col., 2011), se han demostrado cambios en el contenido de ácido siálico terminal de la IgA (Mestecky y col., 2008). Sin embargo, en el caso de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), la enfermedad plurimetabólica, crónica y degenerativa, de mayor prevalencia y mayor impacto negativo sobre la morbimortalidad de los adultos a escala mundial (Shaw y col., 2010), la caracterización de la glicosilación de las inmunoglobulinas séricas está en una etapa incipiente. Aunque se han demostrado cambios en la glicosilación terminal de la IgA1 sérica polimérica, que podrían estar vinculados con el aumento de la IgA en un porcentaje importante de pacientes con DM2, (Vázquez-Moreno y col., 2001) la glicosilación terminal de la IgG, la inmunoglobulina sérica más abundante, no ha sido analizada en pacientes con DM2 a pesar de que este enfoque de investigación representa una opción para estudiar la susceptibilidad a las infecciones recurrentes de este grupo de pacientes.

Alteraciones en la Función del Sistema Inmune de los Pacientes Diabéticos

Los mecanismos patogénicos por los que los pacientes con DM2 presentan una susceptibilidad elevada a las infecciones (Andreasen y col., 2010; Deresinski, 1995; Papanas y col., 2010) se conocen sólo parcialmente, pero parecen involucrar un conjunto de fenómenos que actúan de forma sinérgica. Se ha especulado acerca de la posibilidad de que la DM2 y sus complicaciones sean el resultado de la expresión patológica del sistema inmune innato en las células hipotalámicas, así como en los adipocitos viscerales, las células pancreáticas y el endotelio vascular (De Souza y col., 2005), pero esta hipótesis es sólo el principio de un largo camino que explorar (Kohn y col., 2005), el incremento en la adherencia de los microorganismos a las células de los pacientes diabéticos también parece ser un factor de riesgo importante para el desarrollo de las infecciones, así como la presencia de complicaciones vasculares y nerviosas que determinan un elevado número de intervenciones médicas en este grupo de pacientes (Abrass, 1991; Geerlings y Hoepelman, 1999; Pickup, 2004).

La respuesta normal frente a infecciones bacterianas, requiere de la producción adecuada de anticuerpos, una buena función fagocítica y una adecuada muerte intracelular de leucocitos polimorfonucleares y monocitos (Abrass, 1991). Sin embargo, en los pacientes con diabetes los niveles circulantes de los monocitos se encuentran reducidos en comparación con sujetos control (Geisler y col., 1982; Huseynova y col., 2010). A escala experimental, se ha observado que el bajo número de monocitos, aunado a la reducción en el número de linfocitos contribuye a la deficiente respuesta de los anticuerpos (Ishibashi y col., 1980). El resultado de las anomalías, tanto en la respuesta humoral como en la inmunidad mediada por células, parece traer consigo el incremento en la frecuencia de infecciones bacterianas y fúngicas que se presentan en sujetos diabéticos (Abrass, 1991). Asimismo, se ha demostrado que la producción de anticuerpos con baja afinidad antigénica está asociada a la escasa capacidad para

neutralizar antígenos y a la tendencia a la formación de complejos inmunes en circulación. En un estudio con ratas diabéticas, se encontró relación entre la elevación de los niveles de complejos inmunes, la acumulación glomerular progresiva de IgG y el aceleramiento de la glomeruloesclerosis (Abrass y col., 1983).

Otras alteraciones en la respuesta inmune involucran a la IgG, la principal inmunoglobulina de la respuesta inmune secundaria, fundamental para la activación del complemento. Se ha demostrado, que las alteraciones en la glicosilación de esta glicoproteína, favorecen la unión de la IgG a la MBL (lectina unidora de manosas) desencadenando la vía del complemento (Arnold y col., 2005). La MBL posee una estructura muy similar a la del componente C1q del complemento, que inicia la vía clásica del complemento. En el torrente circulatorio, la MBL se une a los azúcares terminales de las glicoproteínas que poseen grupos hidroxilos en el carbono 3 y carbono 4 del anillo piranosa del plano ecuatorial de carbohidratos tales como manosa, fucosa y GlcNAc. Esta especificidad le permite a la MBL unirse a las superficies de los microorganismos patógenos, pero no a los glicanos de glicoproteínas humanas, las cuales generalmente terminan en galactosa y ácido siálico. Por estas razones, la desilalilación y pérdida de galactosa de la estructura oligosacárida de la IgG, podría desencadenar la activación alterna inapropiada del complemento (Arnold y col., 2006). Con base en los anteriores argumentos, el objetivo de este trabajo fue el de determinar las diferencias en la glicosilación terminal de la IgG de un grupo de pacientes con DM2 con relación a la glicosilación de la IgG purificada del suero de personas euglicémicas aparentemente sanas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Investigación

Se trata de un estudio transversal, observacional y analítico, en el que se comparó la glicosilación terminal de la inmunoglobulina G de un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, con relación a la de la IgG 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 IgG sérica en tres 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 IgG humana marcada con peroxidasa (específica para la cadena γ) producida en cabra, fue adquirida de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). La Sefarosa 4B 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* y la agarosa-anti IgA fueron adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA). Las lectinas biotiniladas, *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* (PNA), *Ricinus communis I* (RCAI), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) y *Triticum vulgare* (WGA), fueron obtenidas de Oxford GlycoSystems (NY, USA). Todos los demás reactivos de grado analítico fueron de Sigma-Aldrich. Todos los procesos cromatográficos fueron realizados 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).

Purificación de la IgG Sérica

La purificación de la IgG sérica, se llevó a cabo mediante tres etapas cromatográficas en secuencia. 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 cargo a una matriz agarosa-anti IgA para separar la IgA total de la IgG y otras inmunoglobulinas. Por último, 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 recuperar a la IgG en la fracción de elución.

Etapa 1: Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

El primer paso para la purificación de IgG, 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 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.

Etapa 2: Cromatografía de Afinidad Agarosa Anti-IgA

Una vez aisladas las inmunoglobulinas en la etapa 1, 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 $0.5\text{mL}/\text{min}$. 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 $0.25\text{ mL}/\text{min}$. 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 etapa 3. 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 (modificado de Vázquez-Moreno y col., 2001).

Etapa 3: Cromatografía de Afinidad Sefarosa Proteína-A

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 $0.5\text{ mL}/\text{min}$. 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 $0.25\text{ mL}/\text{min}$. 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).

Estimación de la Pureza de la IgG por Electroforesis (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 μ m (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 IgG, la membrana de nitrocelulosa se incubó con antisuero monoclonal anti-IgG 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 de IgG por ELLA

Los cambios de glicosilación en la IgG sérica de pacientes y controles, se determinaron mediante ensayos en placa con lectinas ligadas a una enzima (Enzyme-linked lectin assays “ELLA”). Se inmovilizaron 100 μ L de una solución de IgG de 1 μ g/100 μ l en amortiguador de carbonatos (Na_2CO_3 15 mM y NaHCO_3 35 mM), pH 9.6 por pozo, en microplacas de poliestireno (Immuno 96 MicroWell; NUNC, Thermo Corp., USA) por 12 h, a 4°C. Después, se lavaron los pozos cuatro veces continuas con una solución con 0.05 mol/L de Tris-HCl, 0.15 mol/L de NaCl y 0.05% de Tween 20 (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. 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 CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl y 0.1% de Tween 20 (Ritchie G. y col., 2002). Posteriormente, la IgG adsorbida se incubó con 100 μ L de una solución de cada una de las lectinas biotiniladas con una concentración de 1 μ g/mL en TBS, pH 7.5. Las lectinas ensayadas fueron *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA), *Canavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* (PNA), *Ricinus communis I* (RCAI), *Lens culinaris* agglutinin (LCA), *Erythrina cristagalli* agglutinin (ECA) y *Triticum vulgare* (WGA), por 1 h a 37 °C. Después de lavar cuatro veces con TBST, pH 7.5, los pozos fueron incubados con estreptavidina-peroxidasa (ExtrAvidin-peroxidase, de Sigma-Aldrich., USA), en dilución 1:1,000 en TBS, pH 7.5 por 1 h a TA. Por último, los pozos fueron lavados cuatro veces con TBS, pH 7.5 e incubados con O-fenilendiamina (Sigma-aldrich., USA) durante 30 minutos. La afinidad entre la IgG y la lectina fue revelada a 415 nm en un lector de microplacas Benchmark (Bio-Rad., Japón) (modificado de Goodarzi y col 2002).

Antes de realizar los ensayos de lectinas con la IgG de los pacientes y de los controles, se determinó la repetibilidad de los ensayos mediante la estimación de la precisión inter e intraensayo. Los valores coeficientes de variación alcanzados fueron de 3.1% y 2.8%, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuantificación de Proteínas Totales Séricas

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 G purificada, siendo ésta mayor en el caso de los pacientes.

Purificación de la IgG Sérica por Cromatografía

La purificación de la IgG sérica se realizó en tres 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

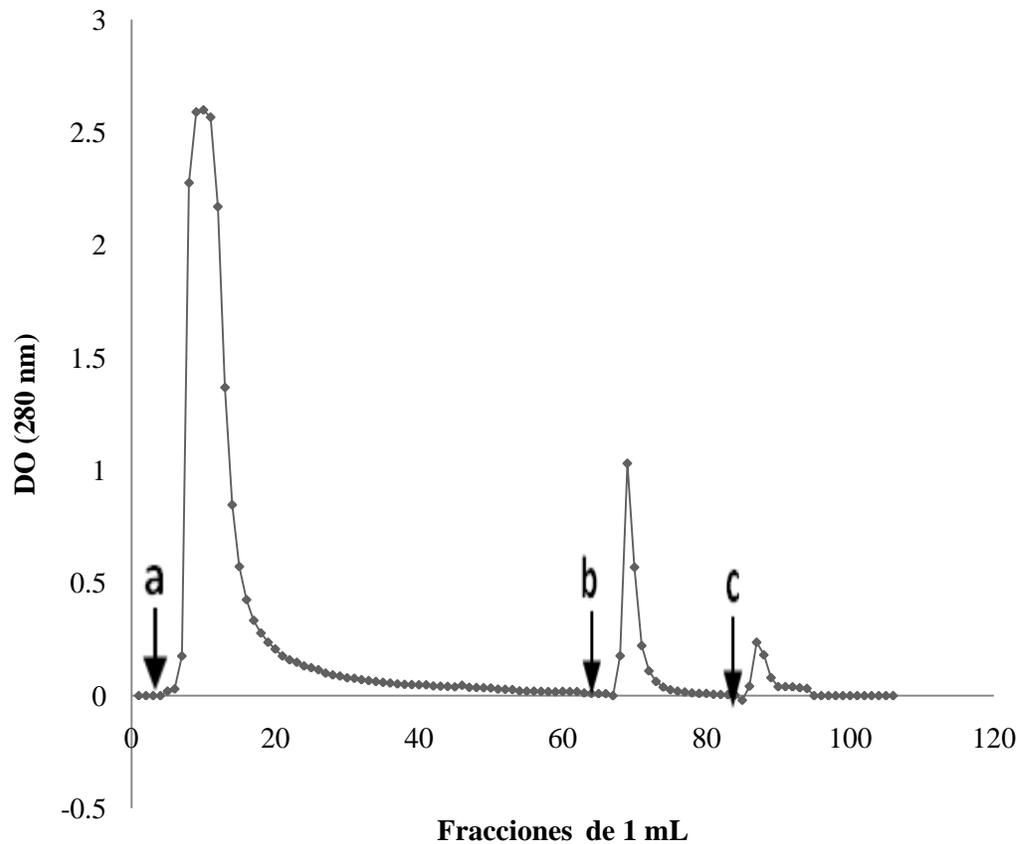


Figura 11. Cromatograma del aislamiento de inmunoglobulinas séricas en Sefarosa-6B altamente acetilada.

La muestra sérica con una concentración proteica de 61-68mg 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).

pico b (fracción de elución) contiene a las inmunoglobulinas que se adsorbieron 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 etapa dos, se llevó a cabo el aislamiento de la IgA total del resto de las inmunoglobulinas séricas, para evitar su interferencia con la purificación de la IgG en la tercera etapa cromatográfica en la que se utilizó la matriz Sefarosa-Proteína A, que es relativamente afín a la IgA. Algunas de las técnicas comúnmente utilizadas en la purificación de la IgA, incluyen a la matriz agarosa-jacalina, muy útil para la separación de las subclases de IgA por su alta afinidad hacia la IgA1 (Álvarez y col., 2010). Sin embargo, en lugar de esta última matriz, en el presente trabajo se eligió la agarosa-anti IgA porque la finalidad de la etapa fue remover a la IgA total del resto de las inmunoglobulinas. El volumen de cama de la matriz agarosa-anti IgA fue de 7.91cm^3 , a la cual se le 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.

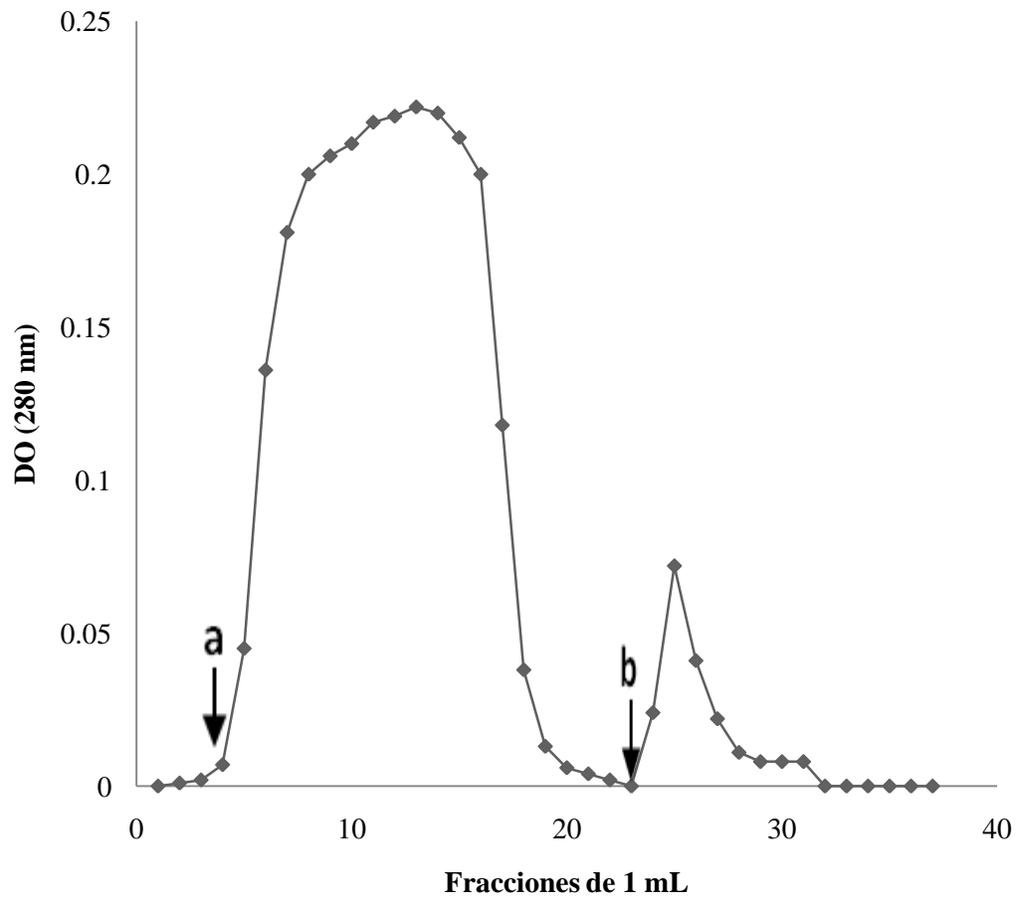


Figura 12. Cromatograma del aislamiento de IgA total en agarosa anti-IgA.

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)

Tal como se señaló antes, el objetivo de la remoción de la IgA total fue evitar la competencia de la IgA con la IgG en la siguiente etapa de purificación, debido a que la IgA presenta cierta afinidad hacia la proteína A (Hage, 2006). La remoción de la IgA era fundamental en este trabajo, debido a que es una glicoproteína con abundantes sitios glicosilados (Mattu y col., 1998).

En la tercera etapa cromatográfica se logró la purificación 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). Pero a pesar de las especificaciones de uso de la matriz Sefarosa CL-6B-Proteína A, que señalan que usándola en una sola etapa permite la purificación de la IgG, pudimos observar que al utilizar la matriz de esa forma, la fracción de elución estaba muy contaminada con otras proteínas. En cambio, al aplicar la fracción de lavado (4.8 mg/31 mL) proveniente de la segunda etapa cromatográfica, a la Sefarosa-Proteína A que tenía un volumen de cama de 3.14 cm³, a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min, se logró una pureza de la IgG mayor al 92%. 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, y el pico b contiene a la IgG (fracción de elución) con una concentración de 2.18 mg/ 8.8 mL.

Estimación de la Masa Molecular y de la Pureza de la IgG

Para la estimación de la masa de la IgG obtenida en la última etapa cromatográfica, la fracción de elución fue cargada en un gel SDS-PAGE al 12% en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Figura 14).

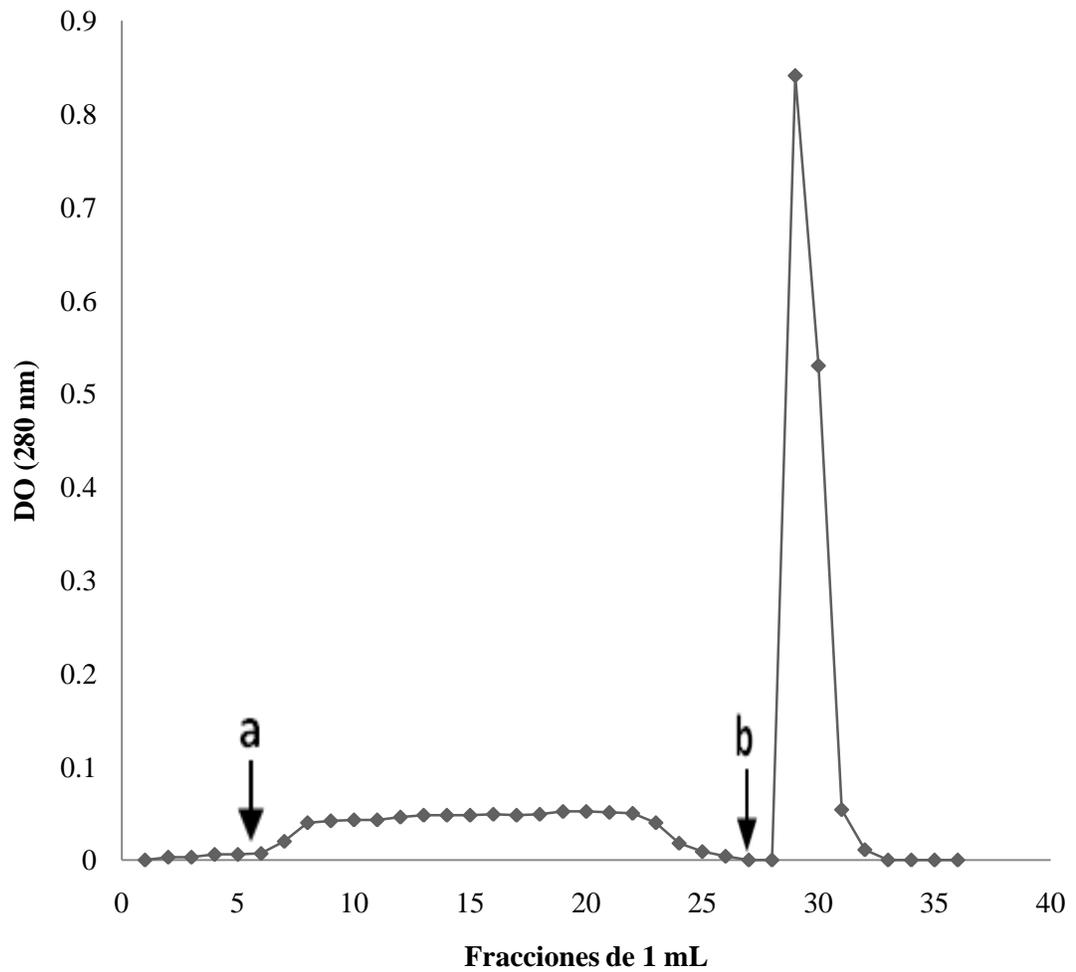


Figura 13. Cromatograma del aislamiento de la IgG sérica en Sefarosa CL-6B Proteína-A.

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).

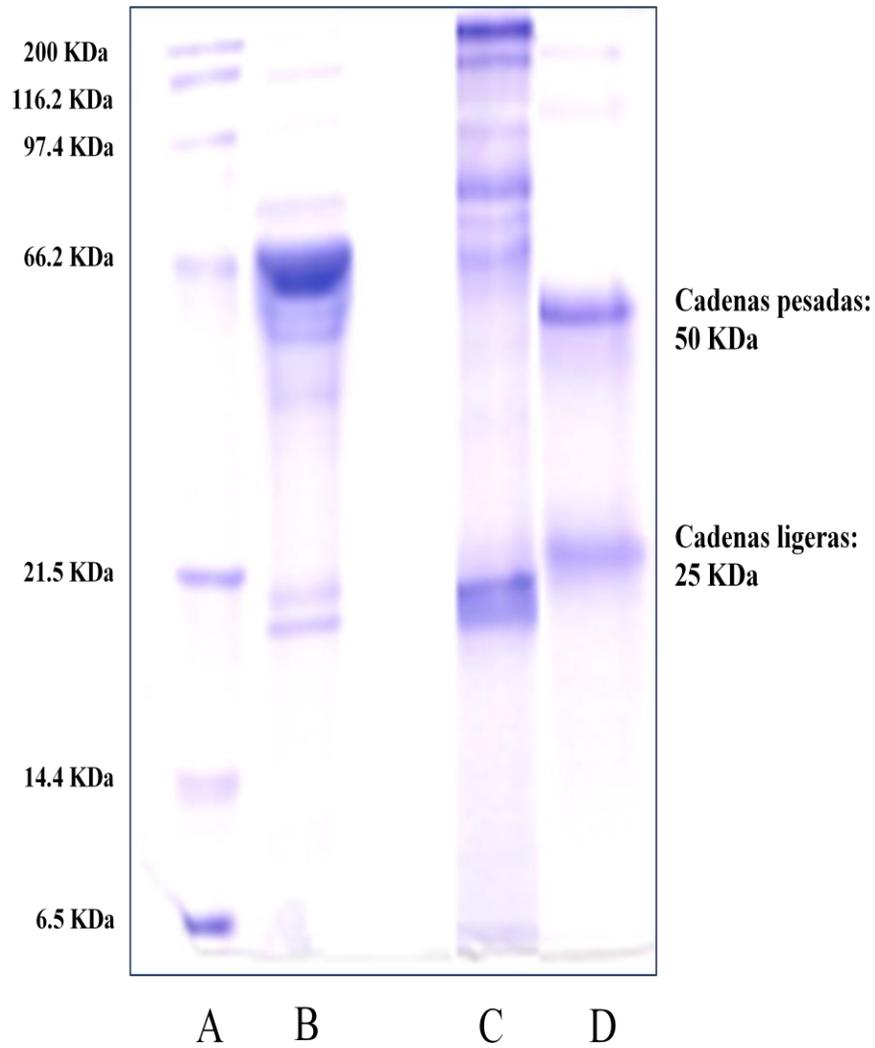


Figura 14. Electroforesis SDS-PAGE de la fracción IgG.

En el carril A se aplicó la mezcla de marcadores de masa molecular. En el carril B se cargó el suero total. La fracción de lavado y la elución de la cromatografía con Sefarosa Proteína-A se aplicaron en los carriles C y D, respectivamente.

En el carril 1 del gel, se cargaron 5 μL de una mezcla de proteínas de masa conocida (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Bio-Rad, USA), en el segundo carril se aplicó suero total (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), en el tercer carril se aplicaron 25 μL de la fracción de lavado de la cromatografía con Sefarosa-Proteína A, y en el carril 4, se aplicaron 20 μL (7 μg de proteína) de IgG (fracción de elución cromatografía de Sefarosa Proteína-A). La electroforesis se corrió a 90 volts constantes y el gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 para estimar la migración de las bandas características de la IgG (Garfin, 2003). Con la ecuación de la recta obtenida se calculó la masa de las cadenas pesadas de la IgG, que fue de 50 kDa y la masa de las cadenas ligeras, que fue de 25 kDa (Figura 15). Paralelamente se corrió un gel, bajo las mismas condiciones electroforéticas, que no fue teñido y en cambio fue electrotransferido a una membrana de nitrocelulosa para la inmunodetección de la IgG con un antisuero monoclonal anti-IgG humana marcado con peroxidasa; no se observaron proteínas contaminantes en la fracción de IgG obtenida en la elución de la matriz Sefarosa-Proteína A (Figura 16) y el antisuero reconoció específicamente las cadenas pesadas de la inmunoglobulina (Figura 17).

Estimación de la Glicosilación Terminal de la IgG

La estimación de la glicosilación terminal de la IgG 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 IgG, fue analizada individualmente.

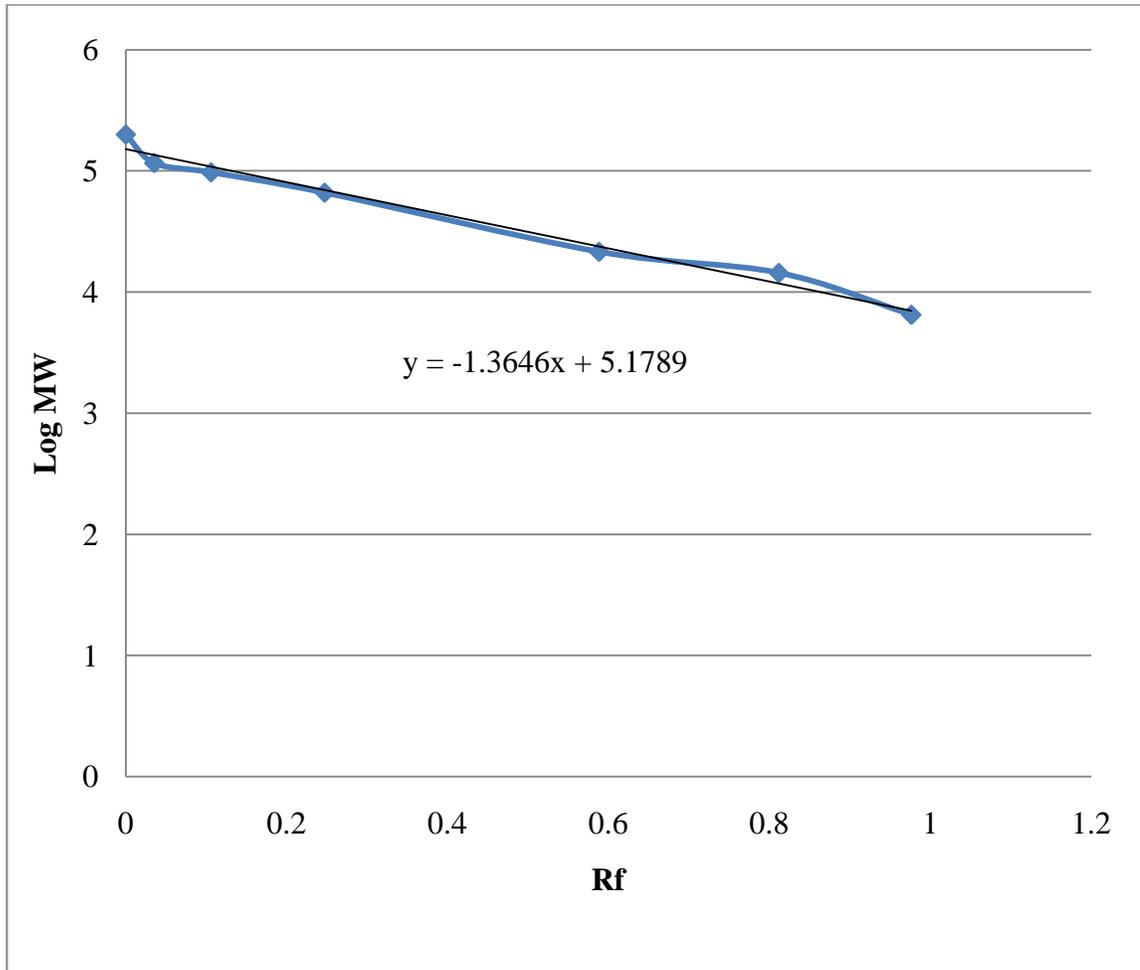


Figura 15. Curva generada entre el Log de la masa molecular de los marcadores de peso molecular y la movilidad relativa de las bandas en el gel.

A partir de la ecuación de la curva, se estimó la masa molecular de las cadenas pesadas y ligeras de la IgG.

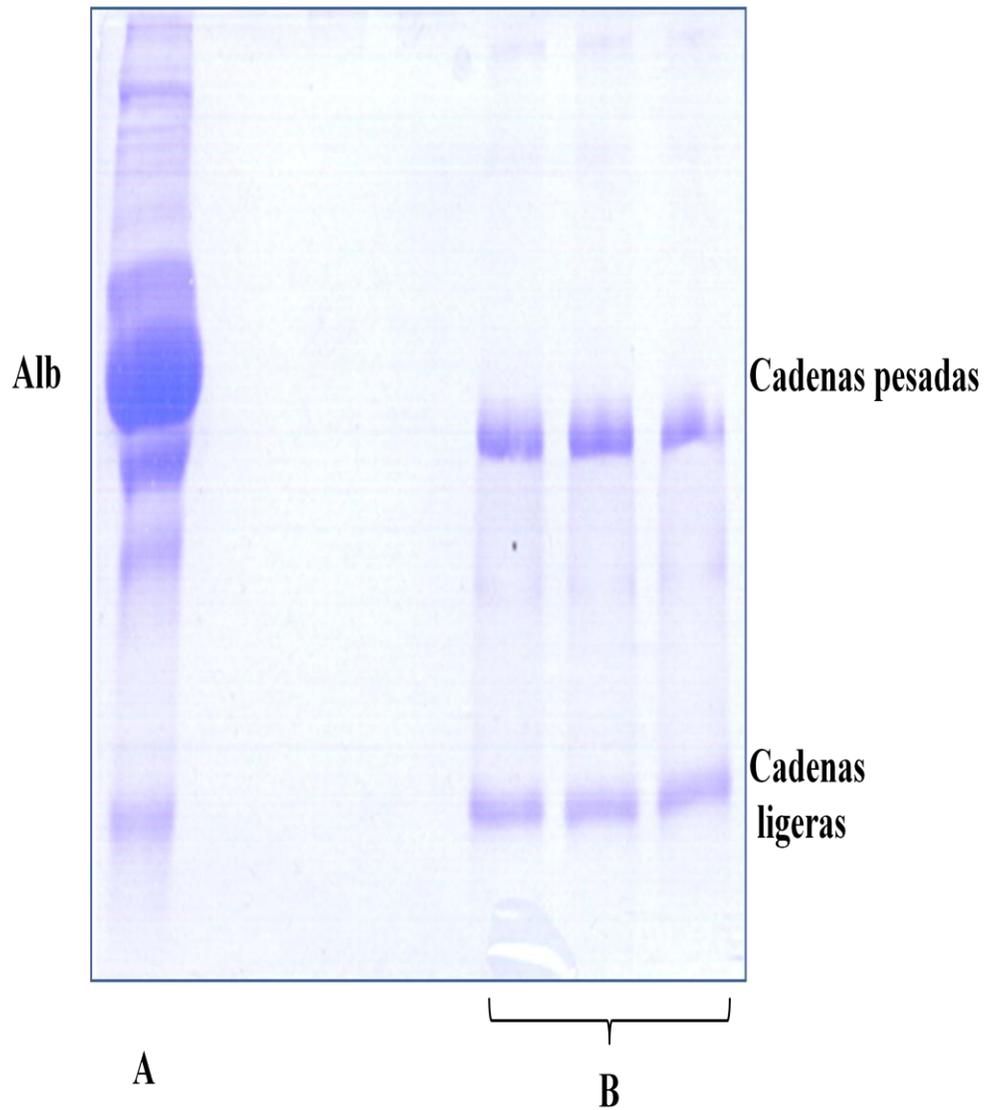


Figura 16. Electroforesis SDS-PAGE de IgG.

En el carril A contiene suero total, en el que se puede observar la banda correspondiente a la albumina. Los carriles B contienen a la IgG purificada en tres etapas cromatográficas; se observan las cadenas pesadas y ligeras de la IgG sin la presencia de proteínas contaminantes.



Figura 17. Inmunodetección específica de la IgG pura.

La flecha indica el reconocimiento de las cadenas pesadas de la IgG por el antisuero monoclonal anti IgG-peroxidasa.

Con la lectina SNA, que presenta marcada afinidad por residuos de ácido siálico en uniones α 2-6 (Wiederschain, 2009) se observó que la media de la densidad óptica de los pacientes fue menor, en comparación con la media de la densidad óptica de los controles; esta disminución fue estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Tabla I) (Figura 18). Esta disminución en la densidad originada por la interacción de la SNA con los oligosacáridos de la IgG de los pacientes es relevante porque se ha observado que en la sialilación de la IgG sérica predominan las uniones α 2-6 sobre las uniones α 2-3 (Arnold y col., 2007), lo que significa que esta proteína está significativamente desialilada en los pacientes con DM2 en comparación con los controles. Se sabe que el ácido siálico de las inmunoglobulinas determina su vida media, su inmunogenicidad y su actividad biológica (Arnold y col., 2007; Muraoka y Shulman, 1989; Worrnald y col., 1991). Con la disminución en la cantidad de ácido siálico terminal de los oligosacáridos de la IgG se esperaría la aceleración del mecanismo de aclaramiento proteico antes del término de su vida media, porque se incrementa su afinidad por los asialoreceptores hepáticos (Spiess, 1990). Este hallazgo es consistente con la observación de que la concentración de IgG sérica en los pacientes con DM2 suele estar reducida (Del Roio-Liberatore y col., 2005; Rodríguez-Segade y col., 1991).

La densidad óptica media derivada de la interacción entre la lectina *Maackia amurensis* (MAA), que reconoce ácido siálico en uniones α 2-3 (Wiederschain, 2009) y los oligosacáridos de la IgG, también fue significativamente menor en los pacientes con relación a los controles (Figura 19). Sin embargo, las señales generadas por la interacción de MMA con la IgG fueron significativamente menores a las observadas entre la IgG y la lectina SNA (Figura 18) lo que se explica por el hecho de que el ácido siálico ligado a galactosa en α 2-3 se encuentra en mucho menor proporción que el ácido siálico ligado en α 2-6 en los oligosacáridos de la IgG y sugiere la baja expresión de la sialiltransferasa α 2-3 en las células productoras de IgG (Arnold y col., 2007).

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

| Lectina | Pacientes ^a | Controles ^b | Valor de p |
|---------|------------------------|------------------------|------------|
| SNA | 1.08 ± 0.288 | 1.56 ± 0.109 | <0.01 |
| MAA | 0.058 ± 0.002 | 0.063 ± 0.003 | < 0.01 |
| PNA | 0.070 ± 0.005 | 0.067 ± 0.003 | =0.86 |
| RCAI | 0.096 ± 0.008 | 0.110 ± 0.010 | < 0.01 |
| ECA | 0.101 ± 0.011 | 0.116 ± 0.017 | < 0.04 |
| WGA | 0.146 ± 0.014 | 0.136 ± 0.010 | = 0.08 |
| Con A | 1.724 ± 0.040 | 1.720 ± 0.027 | = 0.60 |
| LCA | 0.358 ± 0.103 | 0.497 ± 0.118 | < 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.

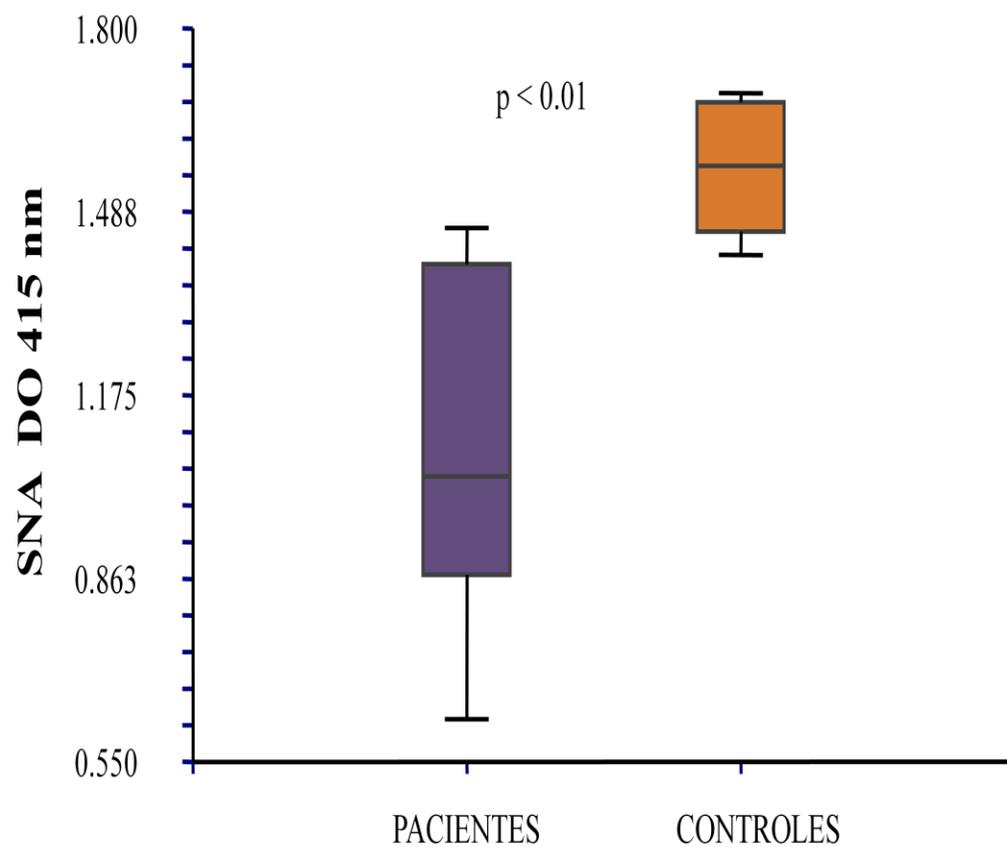


Figura 18. Interacción entre la lectina SNA y la IgG de pacientes y controles.

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

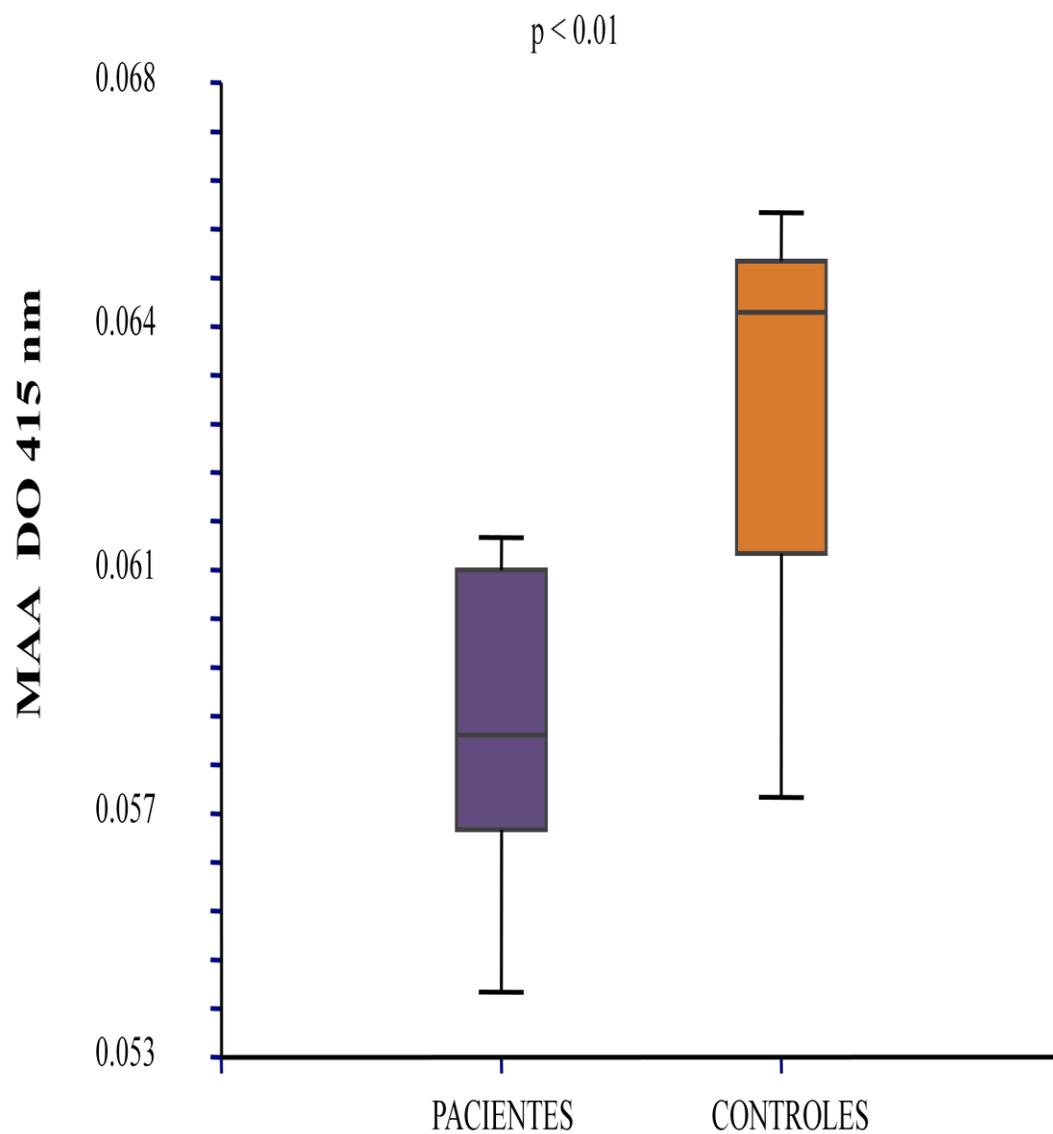


Figura 19. Interacción entre la lectina MAA y la IgG de pacientes y controles.

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

La lectina PNA, posee fuerte afinidad por los O-oligosacáridos con terminación en galactosa unida a GlcNAc/GalNAc por uniones β 1-3 (Goodarzi y col., 2002). La densidad óptica media emitida por la interacción entre PNA y la IgG de pacientes y controles no mostró diferencias estadísticamente significativas (Figura 20). Este resultado se debe a que los N-oligosacáridos de la IgG carecen de uniones Gal- β 1-3-GlcNAc/ GalNAc. En las regiones Fab puede haber O-oligosacáridos (Mimura y col., 2007), que sí tienen esta clase de disacáridos, pero la señal semejante entre la IgG de los pacientes y controles con la lectina PNA sugiere que no hay diferencia en la glicosilación a ese nivel.

La lectina RCAI ha sido ampliamente utilizada como una herramienta versátil para detectar cambios en los carbohidratos de los glicanos complejos N-ligados. Esta lectina muestra marcada afinidad por los residuos terminales de galactosa de oligosacáridos complejos y presenta baja afinidad por oligosacáridos O-enlazados. La lectina ECA presenta una especificidad similar a la RCAI, con la diferencia de que RCAI reconoce β -galactosa y ECA prefiere estructuras disacáridas Gal β 1-4GlcNAc (Itakura y col., 2007). La señal media de la interacción de estas lectinas con la IgG de pacientes, fue significativamente menor en comparación con la interacción media de ambas lectinas con la IgG de los controles (Figura 21 y 22). Estos resultados sugieren que la IgG de los pacientes con DM2 está hipogalactosilada.

En el caso del ensayo con la lectina WGA, que reconoce con un elevado grado de afinidad a GlcNAc (Debray y col., 1981), no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la media de los pacientes y los controles (Figura 23). Este resultado era el esperado, ya que si bien es cierto que los oligosacáridos de la IgG de los pacientes están hipogalactosilados y tienen expuesta la GlcNAc responsable de la interacción con la lectina, la IgG de los controles está más sialilada, lo cual incrementa la afinidad de la WGA por sus oligosacáridos (Wiederschain, 2009; Wright, 1992).

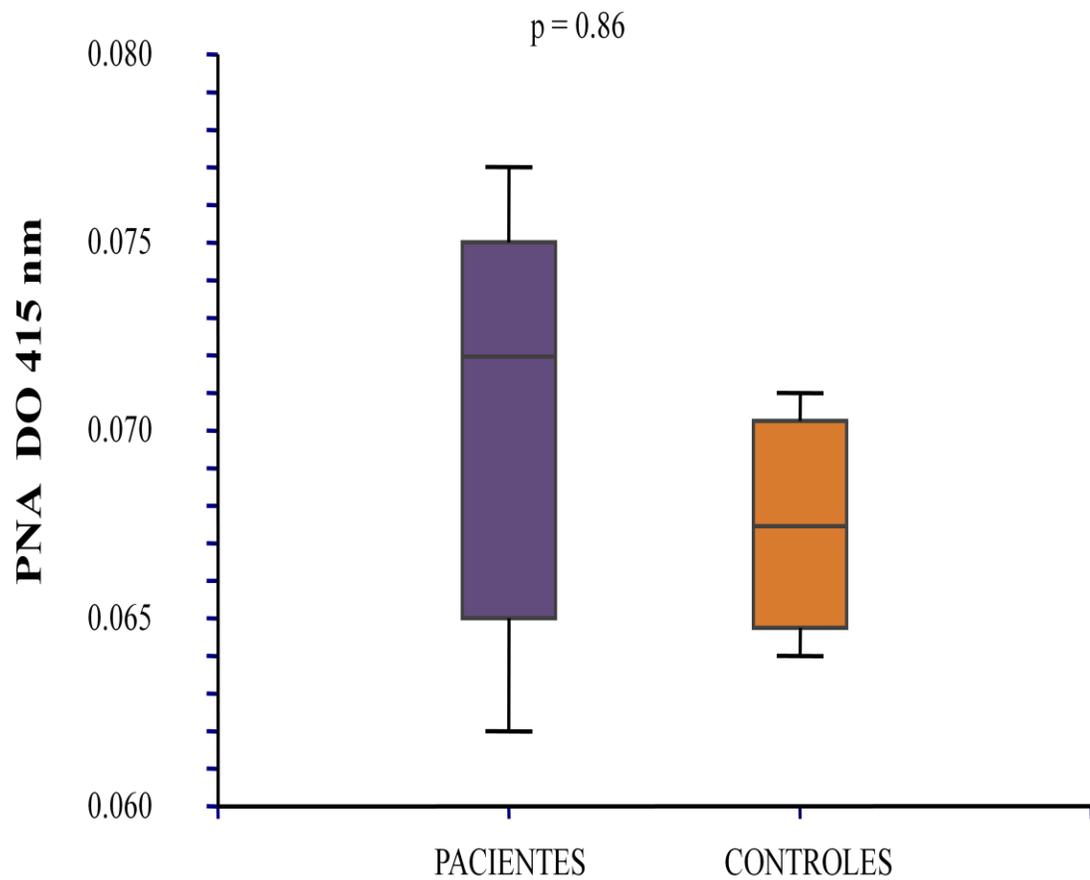


Figura 20. Interacción entre la lectina PNA y la IgG de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes y los controles no mostró diferencias significativas.

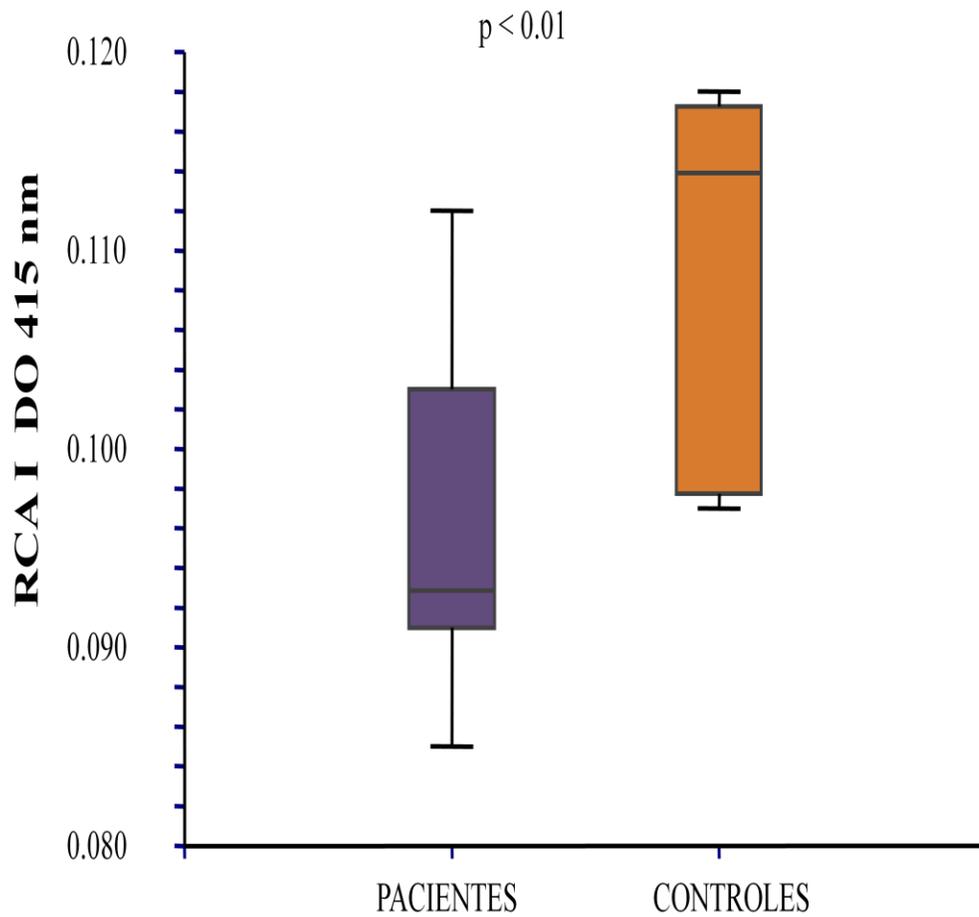


Figura 22. Interacción entre la lectina RCAI y la IgG de pacientes y controles.

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

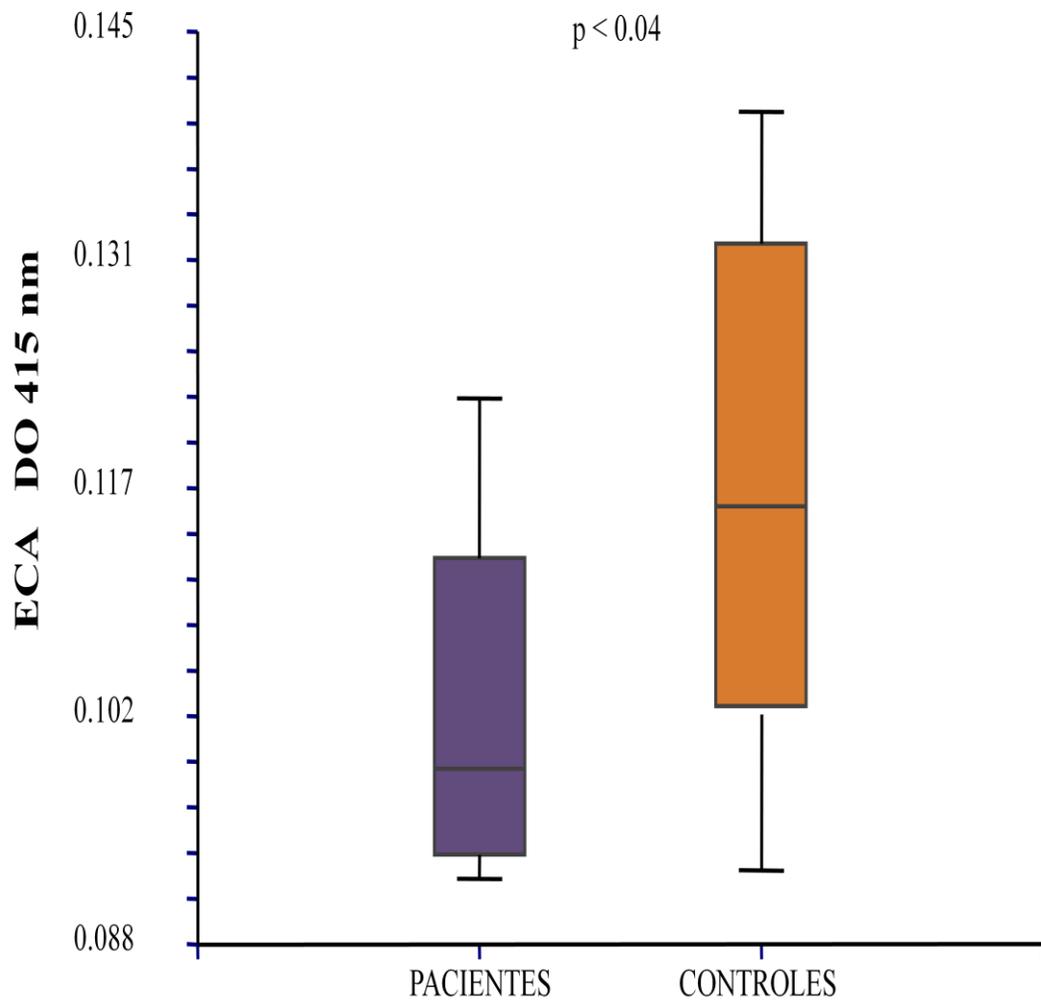


Figura 23. Interacción entre la lectina ECA y la IgG de pacientes y controles.

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

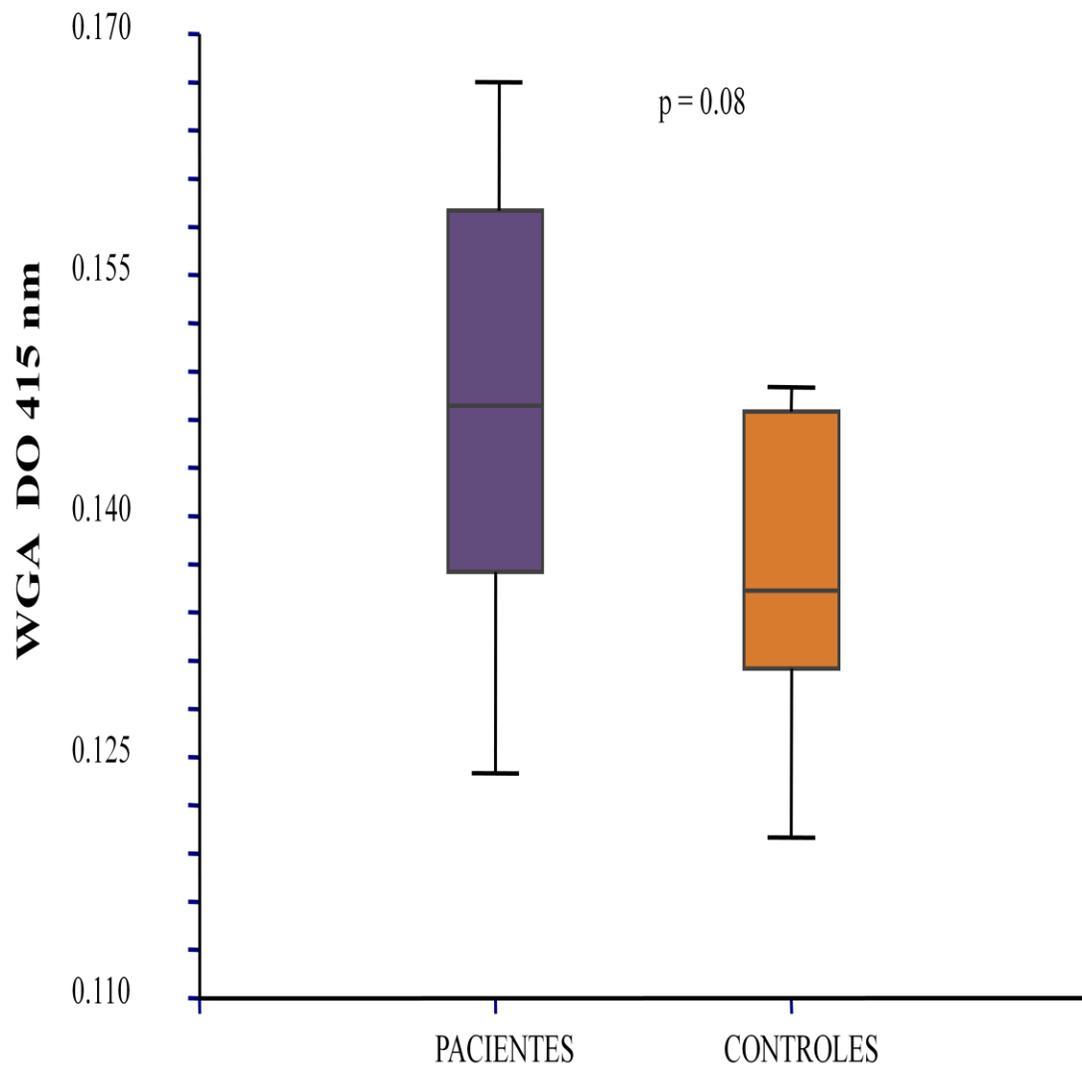


Figura 24. Interacción entre la lectina WGA y la IgG de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes y los controles no mostró diferencias significativas.

Es importante destacar que la intensidad de la señal derivada de la interacción entre la lectina y los carbohidratos es mayor cuando están en forma libre y menos intensa cuando forman parte de los oligosacáridos, por ello la densidad óptica en los ensayos con WGA es baja (Debray y col., 1981).

Por otro lado, la diferencia en la densidad óptica media emitida por la interacción de la IgG con la lectina Con A, no fue estadísticamente significativa entre los pacientes y los controles (Figura 24). 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 IgG de pacientes y controles es similar. Sin embargo, la interacción de la lectina LCA, que tiene mayor afinidad por oligosacáridos cortos que presentan un residuo de fucosa en el centro quitobiosa (Goodarzi y col., 2002), con la IgG de los pacientes generó una señal menos intensa que con la IgG de los controles. En la Figura 25, se puede observar que la media de los pacientes fue significativamente menor que la de los controles ($p < 0.02$), sugiriendo con ello que el centro quitobiosa de los oligosacáridos del grupo de pacientes, se encuentra hipofucosilado. Este resultado concuerda con los reportados por Sumar y col., 1990, quienes explican que el centro quitobiosa puede estar o no fucosilado en condiciones normales, sin embargo la pérdida de fucosa aumenta ante procesos patológicos (Sumar y col., 1990)

Las evidencias anteriores, derivadas del análisis individual de la afinidad de las lectinas SNA, MAA, ECA, RCAI, WGA y Con A hacia la IgG 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.

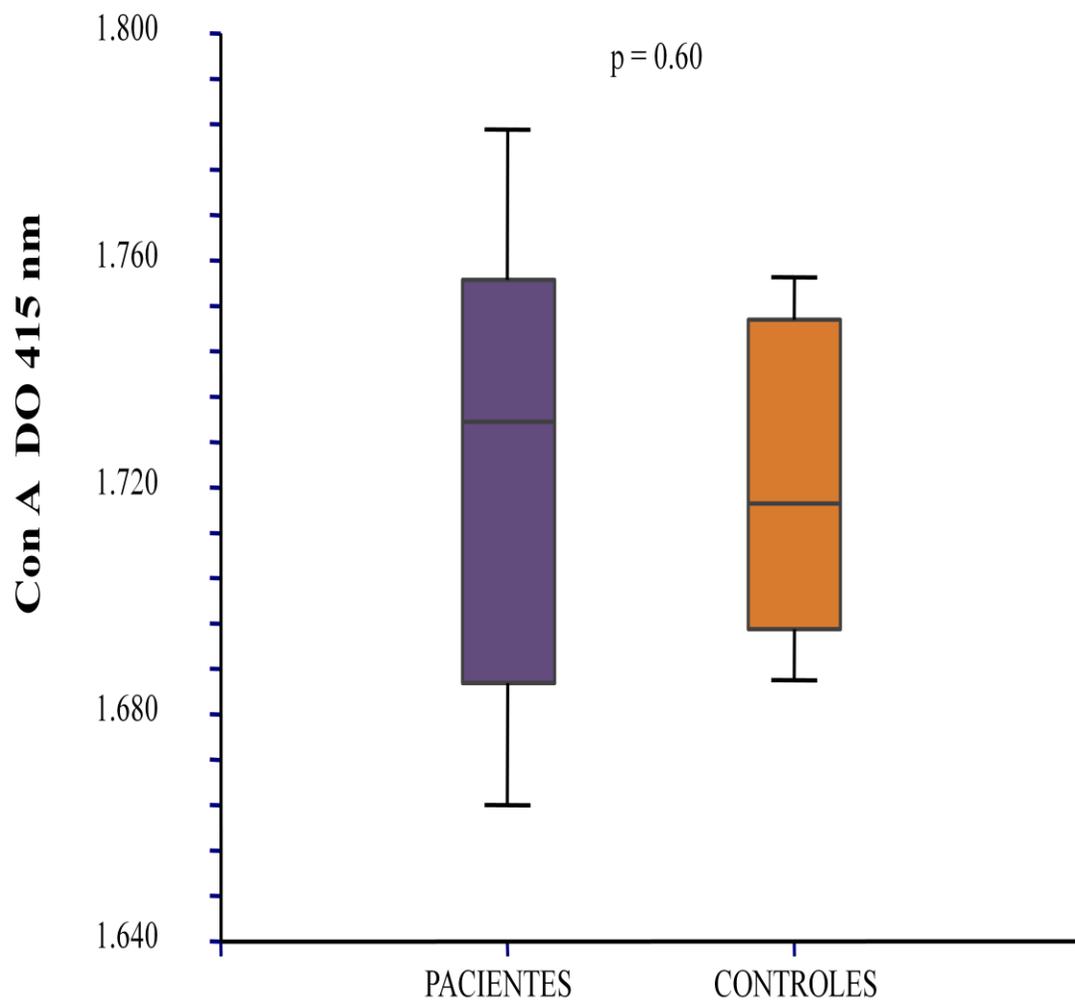


Figura 25. Interacción entre la lectina Con A y la IgG de pacientes y controles.

La densidad óptica media observada en los pacientes y los controles no mostró diferencias significativas.

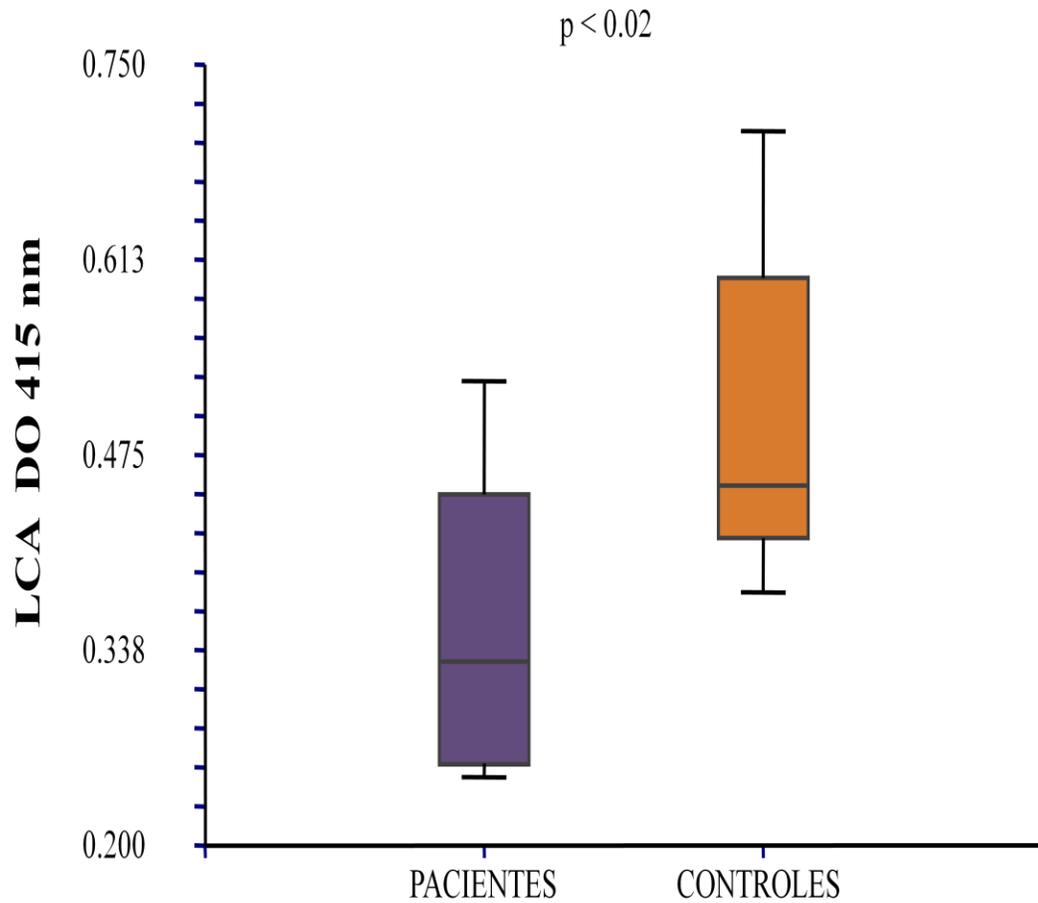


Figura 26. Interacción entre la lectina LCA y la IgG de pacientes y controles.

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

La media de la relación SNA/MAA fue significativamente menor en los pacientes que en los controles (Tabla II, Figura 26), este resultado apoyó la hipótesis de que las diferencias observadas en la IgG de los pacientes fue debida a la disminución de ácido siálico en uniones α 2-6. Las relaciones ECA/SNA, ECA/MAA, RCAI/SNA y RCAI/MAA fueron utilizadas para determinar el grado de galactosilación de la molécula (Figuras 27, 28, 29 y 30). Las relaciones ECA/MAA y RCAI/MAA no mostraron diferencias entre los grupos, lo cual concuerda con los hallazgos de las lecturas individuales de las lectinas, sugiere que no existen cambios en la sialilación en las uniones α 2-3 y reafirman que los cambios de sialilación son atribuibles a la disminución del ácido siálico ligado en α 2-6 a la IgG de los pacientes con DM2. Además, las relaciones ECA/SNA y RCAI/SNA fueron significativamente superiores en los pacientes en comparación con los controles, lo que indica que la cantidad relativa de galactosa expuesta en la IgG de los pacientes es mayor que la cantidad de ácido siálico; este hallazgo confirma la disminución de ácido siálico en la IgG de los pacientes con DM2.

Dado que la lectina RCAI reconoce a galactosa en cualquier unión de tipo beta, se obtuvo también la relación RCAI/ECA, de esta manera fue posible distinguir a los residuos de galactosa que interaccionaron con las lectinas. La relación RCAI/ECA no mostró diferencias significativas (Figura 31) entre los pacientes y los controles, lo que sugirió que los residuos de galactosa reconocidos por las lectinas se encuentran unidos a GlcNAc en uniones β 1-4 y por lo tanto están ubicados en los N-oligosacáridos de la IgG.

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

| Razón | Pacientes ^a | Controles ^b | Valor de p |
|-----------|------------------------|------------------------|------------|
| SNA/MAA | 18.634 ± 4.983 | 24.822 ± 2.514 | <0.01 |
| ECA/SNA | 0.100 ± 0.030 | 0.075 ± 0.014 | < 0.04 |
| ECA/MAA | 1.744 ± 0.188 | 1.839 ± 0.261 | =0.76 |
| RCAI/SNA | 0.095 ± 0.027 | 0.070 ± 0.010 | <0.04 |
| RCAI/MAA | 1.653 ± 0.158 | 1.737 ± 0.136 | = 0.85 |
| RCAI/ECA | 0.950 ± 0.050 | 0.953 ± 0.085 | = 0.53 |
| WGA/ECA | 1.449 ± 0.117 | 0.851 ± 0.114 | <0.01 |
| WGA/RCAI | 1.528 ± 0.133 | 0.805 ± 0.072 | <0.01 |
| WGA/SNA | 0.144 ± 0.043 | 0.088 ± 0.008 | <0.01 |
| Con A/WGA | 11.857 ± 1.057 | 12.670 ± 1.089 | = 0.09 |

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.

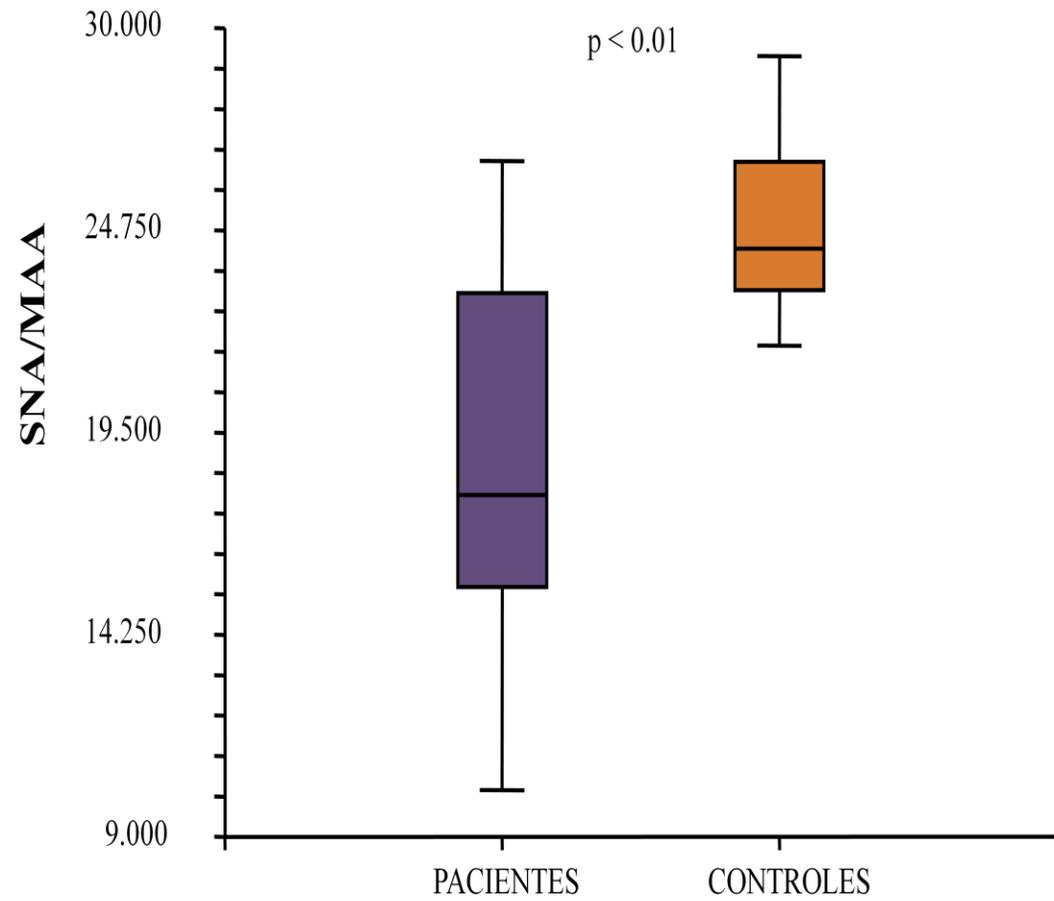


Figura 27. Relación de densidad óptica SNA/MAA entre pacientes y controles.

La media de la relación fue significativamente menor en el grupo de pacientes en comparación con los controles.

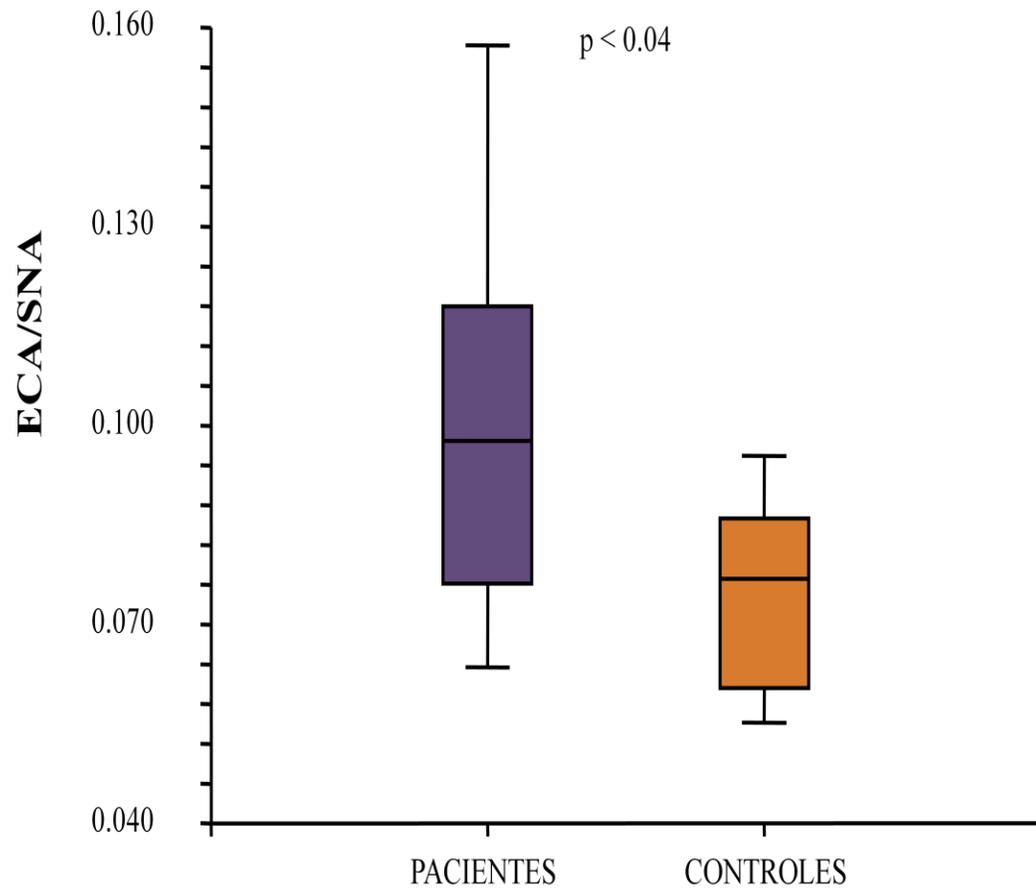


Figura 28. Relación de densidad óptica ECA/SNA entre pacientes y controles.

La media de la relación fue significativamente mayor en el grupo de pacientes en comparación con los controles.

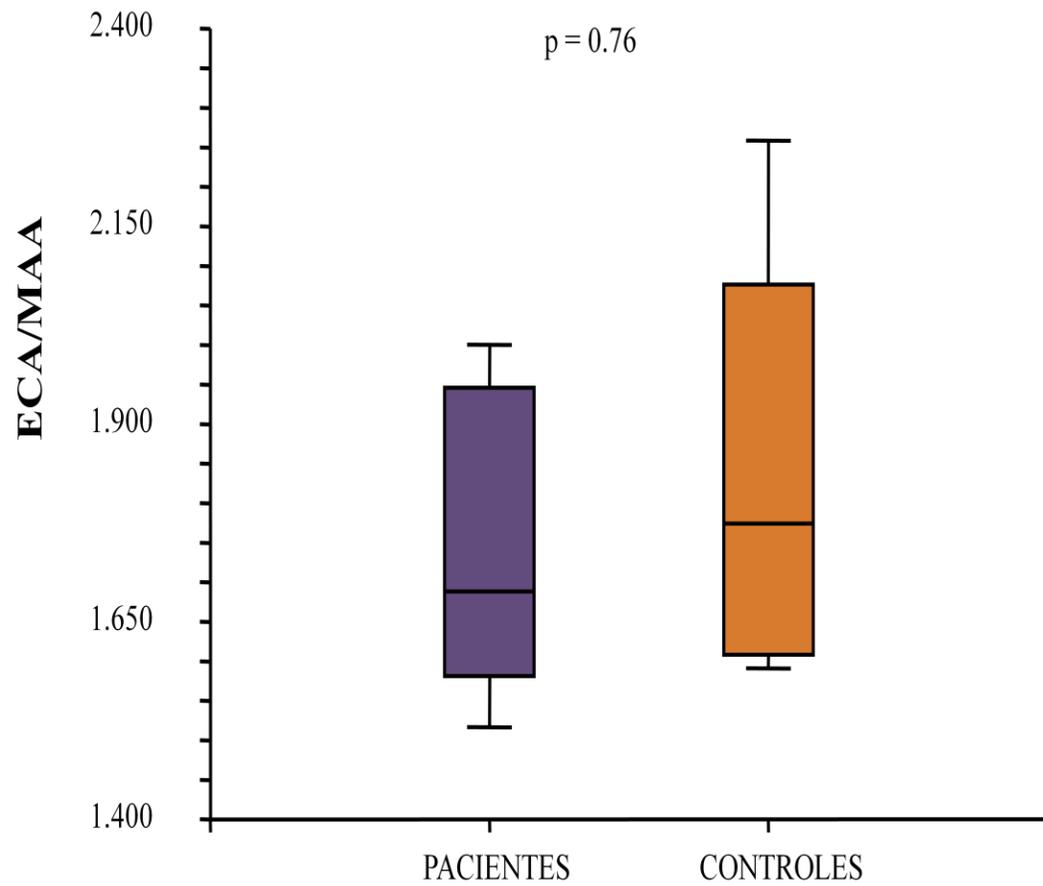


Figura 29. Relación de densidad óptica ECA/MAA entre pacientes y controles.

No se observa diferencia significativa entre las medias de la relación entre pacientes y controles.

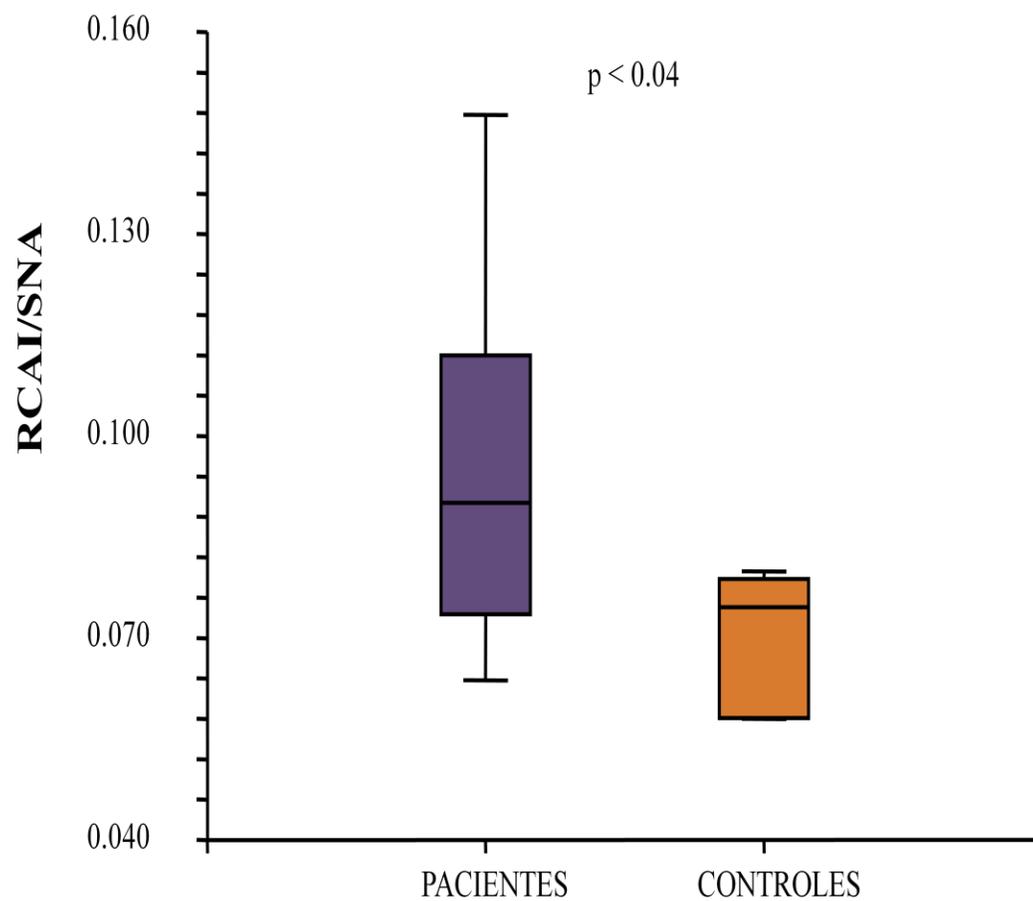


Figura 30. Relación de densidad óptica RCAI/SNA entre pacientes y controles.

La media de la relación fue significativamente mayor en el grupo de pacientes en comparación con los controles.

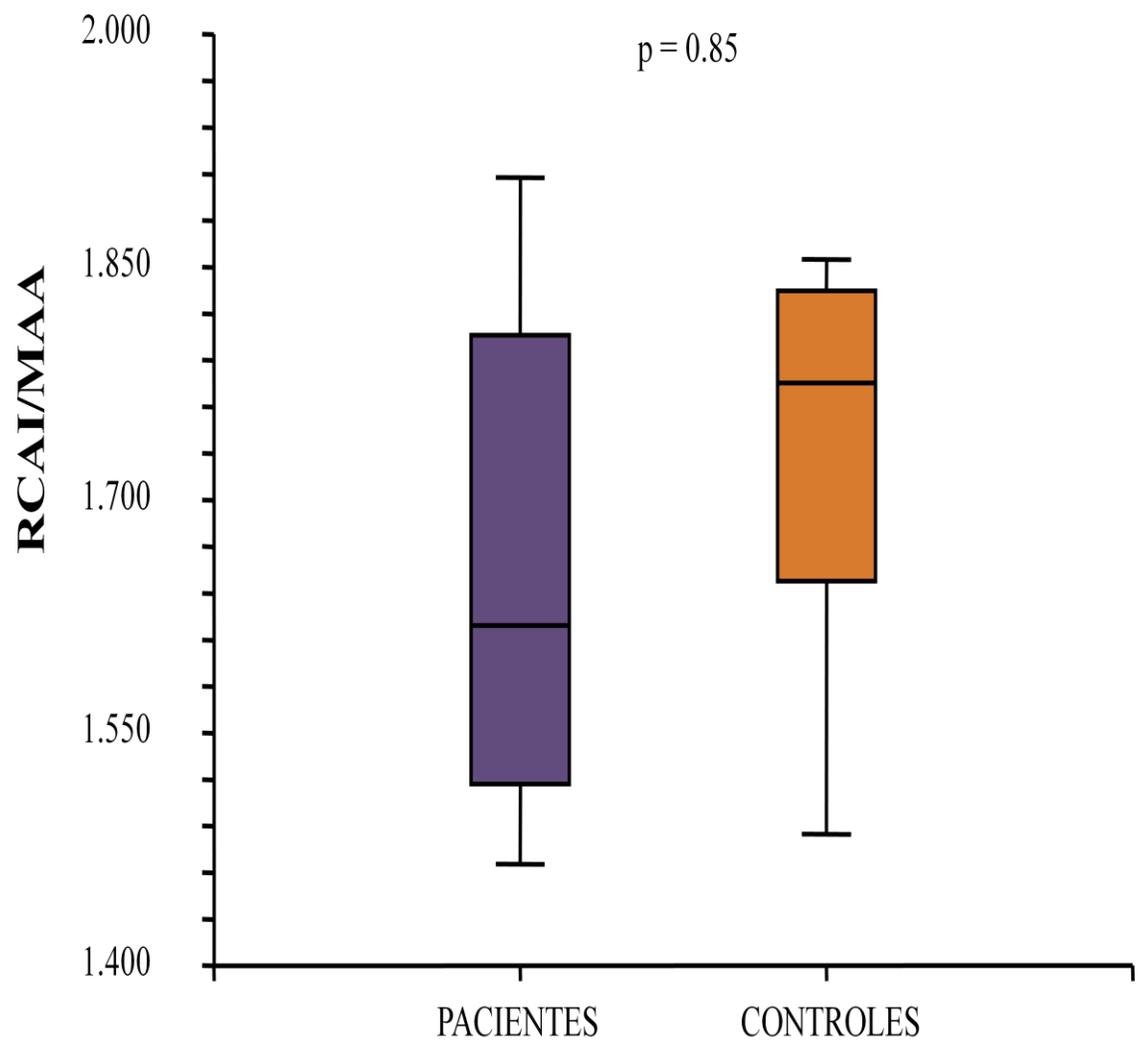


Figura 31. Relación de densidad óptica RCAI/MAA entre pacientes y controles.

No se observa diferencia significativa entre las medias de la relación entre pacientes y controles.

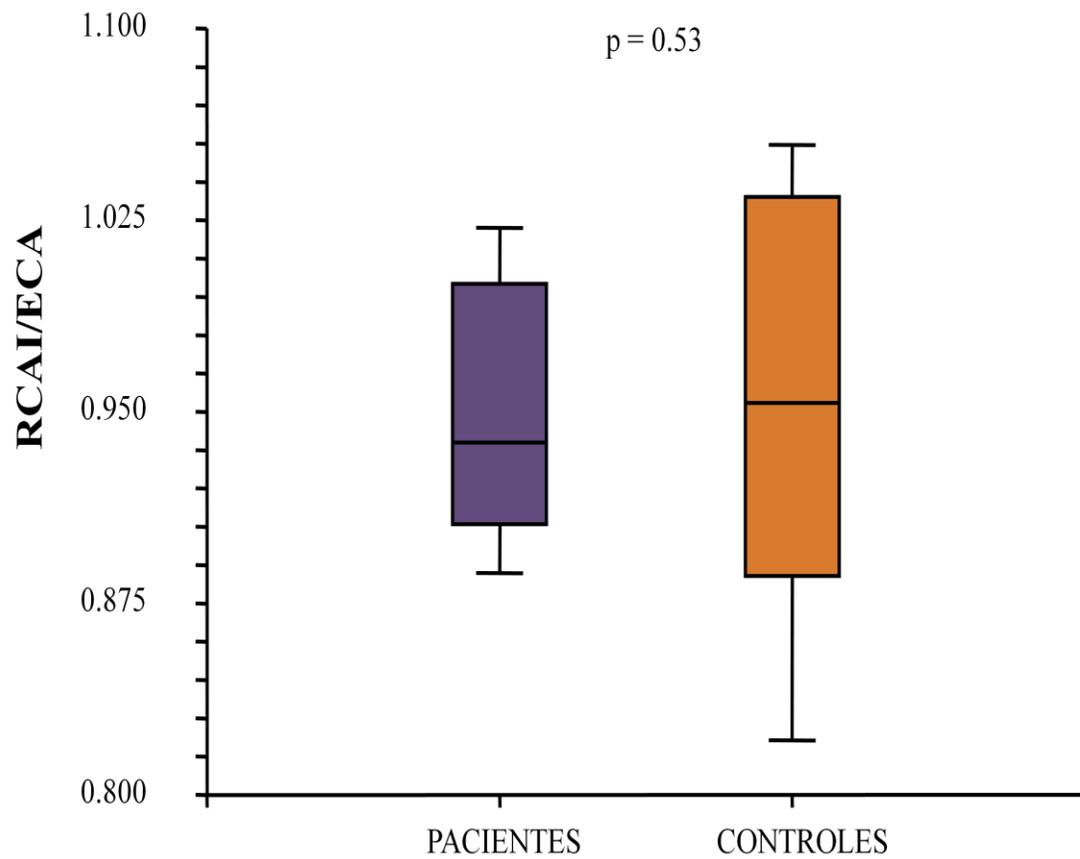


Figura 32. Relación de densidad óptica RCAI/ECA entre pacientes y controles.

No se observa diferencia significativa entre las medias de la relación entre pacientes y controles.

La disminución de la galactosilación de la IgG de los pacientes fue comprobada con las relaciones WGA/RCAI y WGA/ECA gracias a la afinidad de la lectina WGA hacia la GlcNAc. Ambas relaciones fueron significativamente mayores en los pacientes que en los controles ($p < 0.01$) (Figuras 32 y 33). Estos resultados sugieren que la señal relativa derivada de GlcNAc es mayor que la de galactosa en el grupo de los pacientes y corroboran la hipogalactosilación de la IgG de los pacientes, que contribuye a la mayor exposición del siguiente carbohidrato de la cadena oligosacárida: la GlcNAc. La relación WGA/SNA, también confirmó los resultados obtenidos anteriormente, ya que la media de la relación WGA/SNA fue significativamente mayor en el grupo de los pacientes que en el de los controles (Figura 34). De esta manera podemos inferir que la cantidad relativa de β 1-4GlcNAc (por su mayor exposición) es mayor que la cantidad de ácido siálico en el grupo de los pacientes. Por último la relación Con A/WGA permitió confirmar que no existen cambios a nivel del contenido de manosa en la estructura oligosacárida de la IgG, ya que la media de la razón no presentó diferencias significativas entre el grupo de pacientes y el de controles (Figura 35).

El conjunto de resultados individuales y de las relaciones de las densidades ópticas emitidas por la interacción entre las lectinas y el oligosacárido de la IgG de los pacientes con DM2, sugiere que la disminución de galactosa terminal (incluyendo al ácido siálico), expone al siguiente carbohidrato (GlcNAc) de la cadena oligosacárida. Esto quiere decir que las estructuras oligosacáridas predominantes en los sitios de N-glicosilación corresponden a la glicofoma IgG-G0.

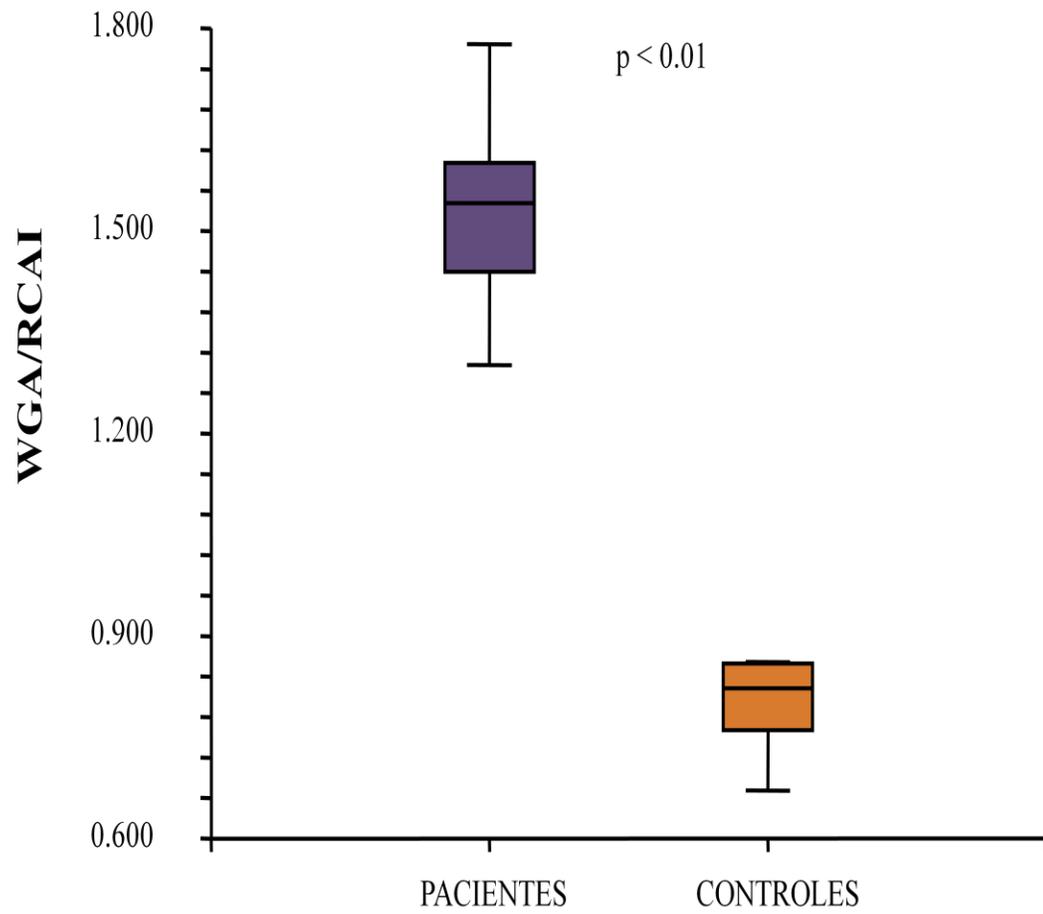


Figura 33. Relación de densidad óptica WGA/RCAI entre pacientes y controles.

La media de la relación fue significativamente mayor en el grupo de pacientes en comparación con los controles.

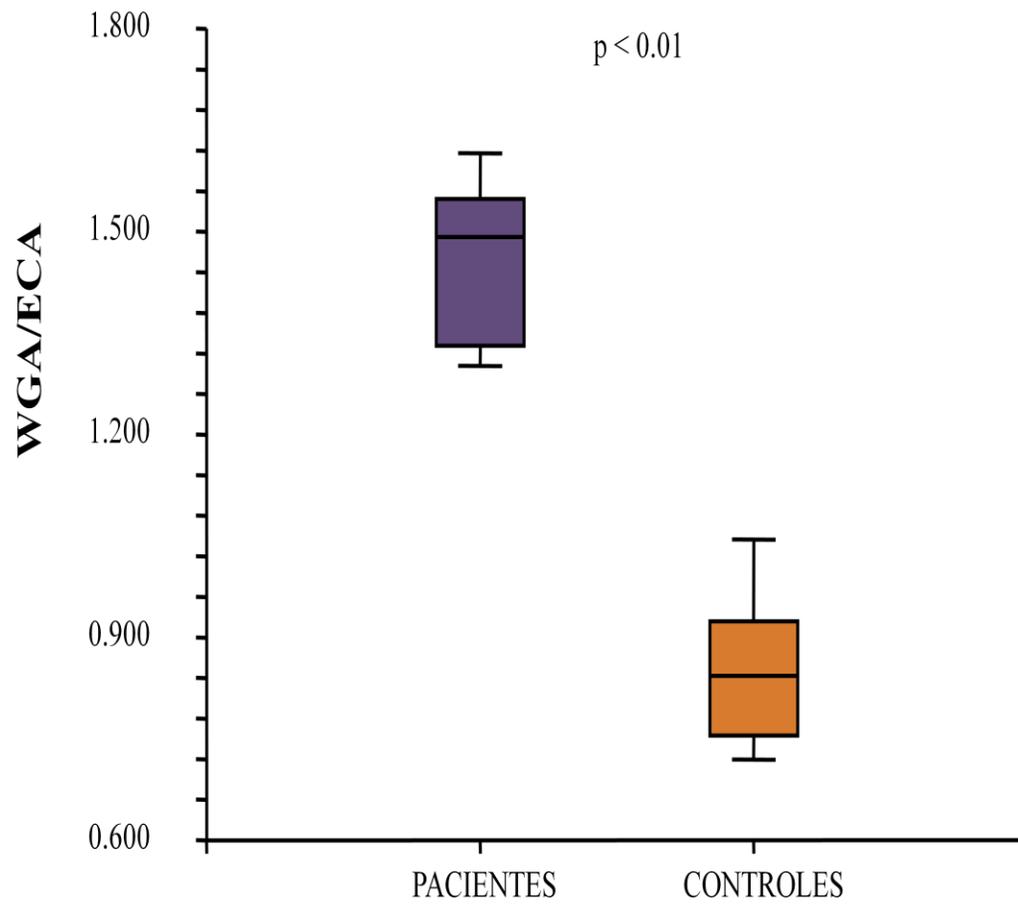


Figura 34. Relación de densidad óptica WGA/ECA entre pacientes y controles.

La media de la relación fue significativamente mayor en el grupo de pacientes en comparación con los controles.

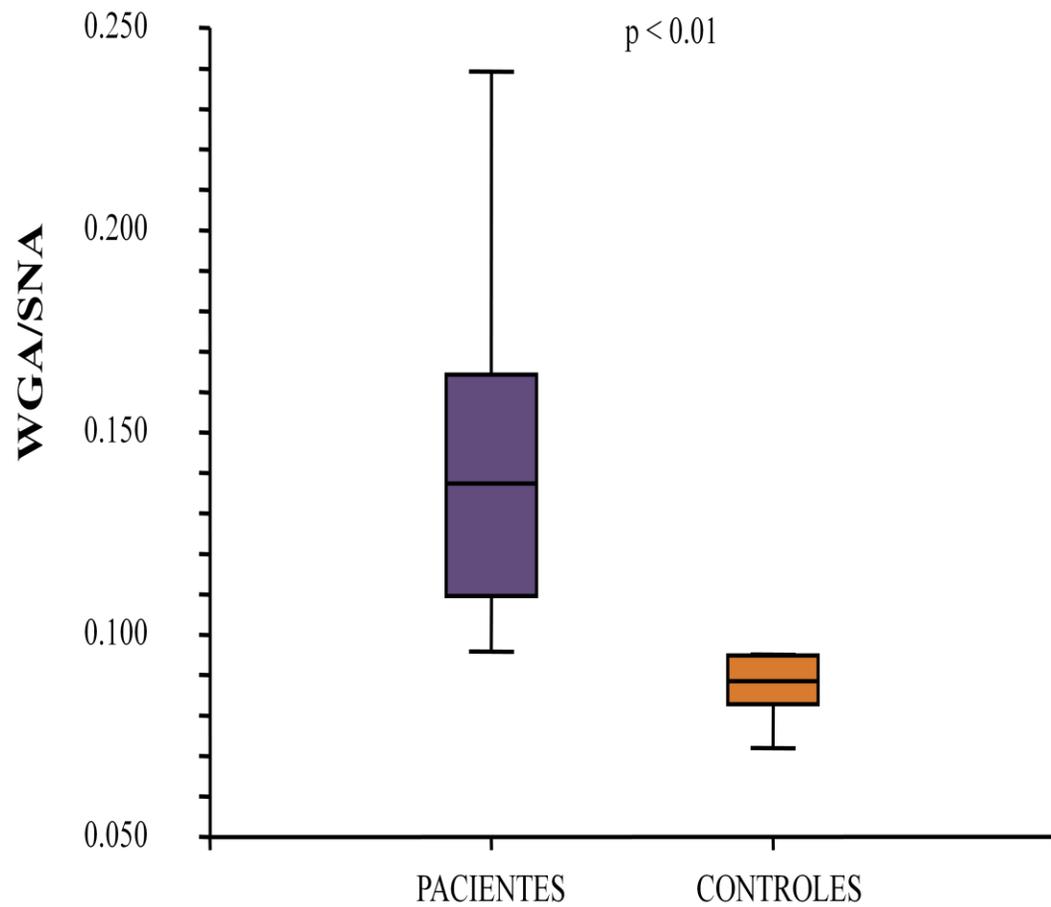


Figura 35. Relación de densidad óptica WGA/SNA entre pacientes y controles.

La media de la relación fue significativamente mayor en el grupo de pacientes en comparación con los controles.

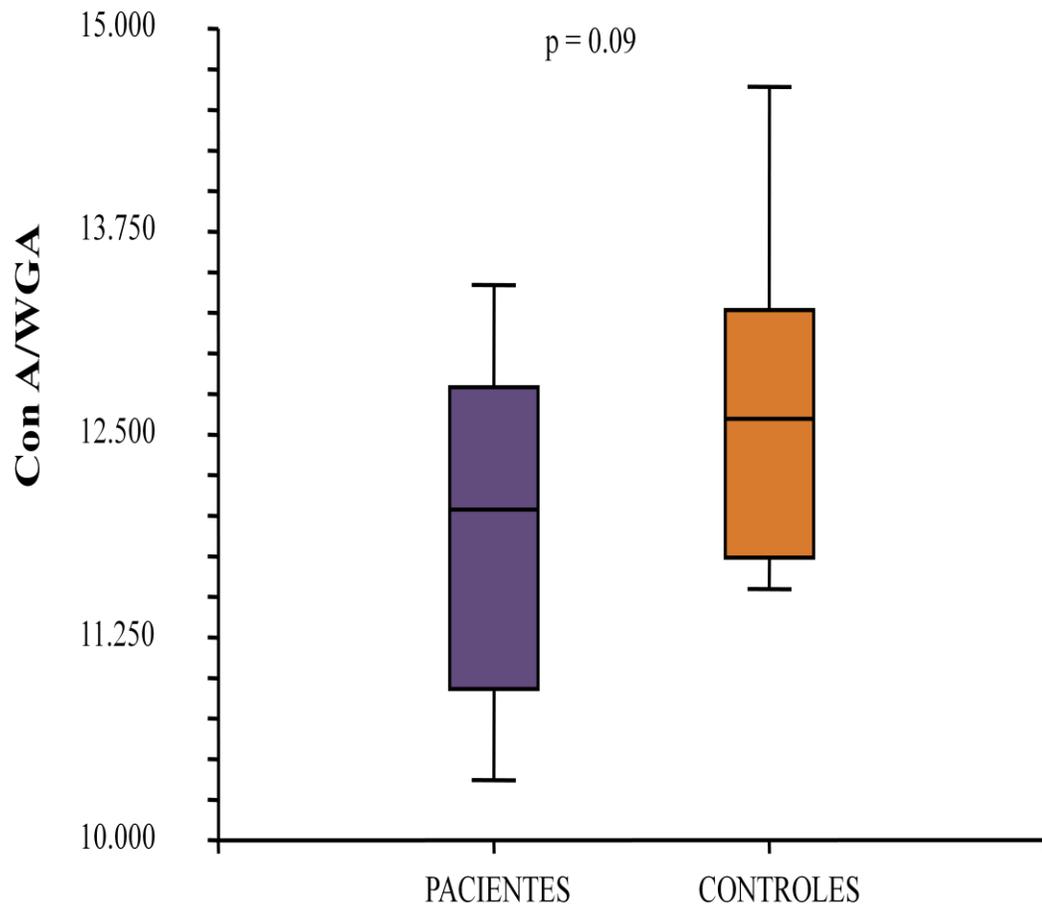


Figura 36. Relación de densidad óptica Con A/WGA entre pacientes y controles.

No se observa diferencia significativa entre las medias de la relación entre pacientes y controles.

Se sabe que la glicofoma IgG-G0 es una de las más abundantes en la IgG humana, representando el 35% del total de glicofomas (Arnold y col., 2007), sin embargo los resultados de este estudio sugieren que en sujetos con DM2, la IgG-G0 se encuentra en una proporción mucho mayor. La alteración en la relación cuantitativa de las distintas glicofomas de la IgG podría influir en la función efectora de la inmunoglobulina; algunos estudios demuestran que la lectina con afinidad a manosa (MBL) puede unirse a formas hipogalactosiladas de la IgG, activando la vía alterna del complemento. Por lo anterior, es posible especular que en los pacientes con DM2 la IgG-G0 podría contribuir a la activación inapropiada de la vía del complemento y, 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 la elevación de ácido siálico sérico en los pacientes con DM2 (Gavella y col., 2003). Adicionalmente, el incremento de las glicofomas IgG-G0 podría favorecer el aclaramiento proteico de la IgG sérica, porque estas glicofomas tienen mayor afinidad por los asialoreceptores hepáticos que las glicofomas sialiladas (Spiess, 1990).

Ahora bien, se ha observado un incremento importante de las estructuras agalactosiladas de la IgG (IgG-G0) relacionado con el envejecimiento (Rademacher y col., 1994). 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 IgG 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 G. 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. 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. El conjunto de evidencias nos deja claro que los cambios encontrados en la IgG 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

Se desconocen los mecanismos patogénicos responsables de la elevada susceptibilidad de los pacientes con diabetes a las infecciones, pero se cree que podría ser el resultado del deterioro en el sistema inmune. La inmunoglobulina G es una de las principales glicoproteínas del sistema inmune responsable de la respuesta secundaria ante un proceso infeccioso. Diversos estudios demuestran que la alteración en los oligosacáridos de la inmunoglobulina modifica su función efectora y la identificación de potenciales cambios en la glicosilación de la IgG podría explicar, al menos parcialmente, la elevada susceptibilidad y el escaso control de las infecciones en los pacientes diabéticos. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue caracterizar los cambios en la glicosilación de la IgG de un grupo de pacientes con DM2, y compararlos con los de sujetos, pareados por edad y sexo, euglicémicos, aparentemente sanos.

Para caracterizar la glicosilación de la IgG, primeramente se purificó la molécula utilizando un esquema de tres etapas cromatográficas en secuencia, de esta manera se logró un alto grado de pureza en la proteína. Posteriormente, la glicosilación terminal de la IgG se analizó utilizando una batería de lectinas de origen vegetal con afinidad específica hacia uno o un grupo de carbohidratos. El análisis brindó información sobre la disminución en la glicosilación terminal de la IgG de pacientes con DM2, la cual se demostró con las lecturas individuales de la interacción de la IgG y las lectinas, así como con las relaciones de densidad óptica entre lectinas. El análisis cuantitativo de la densidad óptica asociada con las interacciones lectina-IgG, se realizó con el método estadístico T de Student, utilizando una $p < 0.05$ para probar la significancia de los resultados. El análisis permitió demostrar que los N-oligosacáridos de la IgG sérica de los pacientes con DM2, se encontraban hiposialilados, hipogalactosilados e hipofucosilados. Estos cambios indican que la glicofoma predominante en las moléculas de IgG de los pacientes es la IgG-G0.

El conjunto de resultados sugiere que los cambios en la glicosilación de la IgG podrían afectar las funciones efectoras de la IgG, y de esta manera explicar parcialmente la elevada susceptibilidad y el escaso control de las infecciones en los pacientes con DM2. Finalmente, con los resultados de este trabajo se abre un campo en la investigación para determinar la influencia de los cambios de glicosilación de la IgG sobre sus funciones, además de profundizar en el estudio de la etiología de los cambios detectados en los oligosacáridos de esta inmunoglobulina.

BIBLIOGRAFÍA

Abrass, C. 1991. Fc receptor-mediated phagocytosis: Abnormalities associated with diabetes mellitus. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 58: 1-7.

Abrass, C., Heber, D., Lieberman, J. 1983. Circulating immune complexes in patients with diabetes mellitus. *Clinical Experimental Immunology*. 52: 164-172.

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

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

Andreasen, A., Pedersen-Skovsgaard, T., Berg, R., Svendsen, K., Feldt-Rasmussen, B., Pedersen, B., Møller, K. 2010. Type 2 diabetes mellitus is associated with impaired cytokine response and adhesion molecule expression in human endotoxemia. *Intensive Care Medicine*. 36(9): 1548-1555.

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

Arnold, J., Wormald, M., Suter, D., Radcliffe, C., Harvey, D., Dwek, R., Rudd, P., Sim, R. 2005. Human serum IgM glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*. 280(32): 29080-29087.

Ashwell, G., Harford, J. 1982. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annual Review of Biochemistry*. 51(1): 531-554.

Bond, A., Jones, M., Hay, F. 1993. Human IgG preparations isolated by ion-exchange or protein G affinity chromatography differ in their glycosylation profiles. *Journal of Immunological Methods*. 166(1): 27-33.

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.

Butler, M., Quelhas, D., Critchley, A., Carchon, H., Hebestreit, H., Hibbert, R., Vilarinho, L., Teles, E., Matthijs, G., Schollen, E. 2003. Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis. *Glycobiology*. 13(9): 601.

Byrne, B., Donohoe, G., O'Kennedy, R. 2007. Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*. 12(7-8): 319-326.

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.

De Praeter, C., Gerwig, G., Bause, E., Nuytinck, L., Vliegthart, J., Breuer, W., Kamerling, J., Espeel, M., Martin, J., De Paepe, A. 2000. A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency. *The American Journal of Human Genetics*. 66(6): 1744-1756.

De Souza, C., Araujo, E., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R., Boschero, A., Saad, M., Velloso, L. 2005. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory

response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 146(10): 4192.

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.

Del Roio- Liberatore, R., Barbosa, S., Das Graças-Alkimin, M., Bellinati- Pires, R., Florido, M., Isaac, L., Kirschfink, M., Sevciovic-Grumach, A. 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.

Deresinski, S. 1995. Infections in the diabetic patient: Strategies for the clinician. *Infectious Disease Reports*. 1: 1-12.

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.

Dwek, R. 1995. Glycobiology: "towards understanding the function of sugars." *Biochemical Journal Society Transactions*. 23: 1-25.

Emancipator, S., Mestecky, J., Lamm, M. 1999. IgA nephropathy and related diseases. *Mucosal Immunology*, ed. 3: 1579–1600.

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 (DM). *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 26(34): 259-265.
- Geisler, C., Almdal, T., Bennedsen, J., Rhodes, J., Kolendorf, K. 1982. Monocyte functions in diabetes. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*. 90(1-6): 33-37.
- Gharavi, A., Kiryluk, K., Choi, M., Li, Y., Hou, P., Xie, J., Sanna-Cherchi, S., Men, C., Julian, B., Wyatt, R. 2011. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nature Genetics*. 43(3): 179-187.
- 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.
- Hage, D. 2006. Handbook of affinity chromatography. 72(7): 127-170.
- Hajdukovic-Dragojlovc, L., Nestic, M., Cuperlovic, K. 1997. A study of human immunoglobulin (IgG and IgE) glycosylation by interactions with lectins. *Immunoregulation in Health and Disease*. 2(21): 221-233.
- 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. *Scandinavian Journal of Immunology*. 59(6): 613.
- 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.

- 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.
- 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.
- Homma, H., Tozawa, K., Yasui, T., Itoh, Y., Hayashi, Y., Kohri, K. 2006. Abnormal glycosylation of serum IgG in patients with IgA nephropathy. *Clinical and Experimental Nephrology*. 10(3): 180-185.
- 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(3): 162.
- Ishibashi, T., Kitara, Y., Harada, S., Takamoto, M., Ishibashi, T. 1980. Immunologic features of mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 29: 516-523.
- 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.
- Jefferis, R., Lund, J., Mizutani, H., Nakagawa, H., Kawazoe, Y. 1990. A comparative study of the N-linked oligosaccharide structures of human IgG subclass proteins. *Biochemistry Journal*. 268(3): 529-537.
- Jefferis, R., Pound, J., Lund, J., Goodall, M. 1994. Effector mechanisms activated by human IgG subclass antibodies: clinical and molecular aspects. *Annals of Clinical Biology*. 52(1): 57-65.

- Jennette, J. 1988. The immunohistology of IgA nephropathy. *American journal of kidney diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*. 12(5): 348.
- Jennissen, H. 2005. Hydrophobic interaction chromatography. *Wiley Online Library* 10(1038): 3922.
- Kobata, A. 1990. Function and pathology of the sugar chains of human immunoglobulin G. *Glycobiology*. 1(1): 5.
- Kohn, L., Wallace, B., Schwartz, F., McCall, K. 2005. Is type 2 diabetes an autoimmune-inflammatory disorder of the innate immune system? *Endocrinology*. 146(10): 4189.
- Lei, H., Chang, C. 2009. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. *Journal of Biomedical Science*. 16(1): 10.
- Malhotra, R., Wormald, M., Rudd, P., Fischer, P., Dwek, R., Sim, R. 1995. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*. 1(3): 237-243.
- 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.
- Mestecky, J., Tomana, M., Moldoveanu, Z., Julian, B., Suzuki, H., Matousovic, K., Renfrow, M., Novak, L., Wyatt, R., Novak, J. 2008. Role of aberrant glycosylation of IgA1 molecules in the pathogenesis of IgA nephropathy. *Kidney and Blood Pressure Research*. 31(1): 29-37.
- Mimura, Y., Ashton, P., Takahashi, N., Harvey, D., Jefferis, R. 2007. Contrasting glycosylation profiles between Fab and Fc of a human IgG protein studied by

electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Immunological Methods*. 326(1-2): 116-126.

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.

Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwel, V. 2001. Bioquímica de Harper. *Bioquímica Ilustrada. 15ª Edición. Editorial El Manual Moderno. México, DF*.

Narayan, K., Chan, J., Mohan, V. 2011. Early Identification of Type 2 Diabetes. *Diabetes care*. 34(1): 244.

Nimmerjahn, F., Anthony, R., Ravetch, J. 2007. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104(20): 8433.

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

Organización Mundial de la Salud. 2008.

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.

Parekh, R., Roitt, I., Isenberg, D., Dwek, R., Rademacher, T. 1988. Age-related galactosylation of the N-linked oligosaccharides of human serum IgG. *Journal of Experimental Medicine*. 167(5): 1731-1736.

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(7-8): 463-471.

Pickup, J. 2004. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 27(3): 813-823.

Rademacher, T., Williams, P., Dwek, R. 1994. Agalactosyl glycoforms of IgG autoantibodies are pathogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91(13): 6123.

Raju, T. 2008. Terminal sugars of Fc glycans influence antibody effector functions of IgGs. *Current Opinion in Immunology*. 20(4): 471-478.

Ramos-Clamont, G., Candia-Plata, M., Zamudio, R., Vazquez-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.

Ritchie G., Moffatt B., Sim R., Morgan B., Dwek R., Rudd P. 2002. Glycosylation and the complement system. *Chemical Reviews*. 102(2): 305-320.

Rodriguez-Segade, S., Camina, M., Paz, J. M., Rio, R. D. 1991. Abnormal serum immunoglobulin concentrations in patients with diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*. 203(2-3): 135-142.

Rudd, P., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I., Dwek, R. 2001. Glycosylation and the immune system. *Science*. 291(5512): 2370.

Scallon, B., Tam, S., McCarthy, S., Cai, A., Raju, T. 2007. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. *Molecular Immunology*. 44(7): 1524-1534.

Schneider, W., Wolter, D., McCarty, L. 1976. Alternatives for Plasma Fractionation1. *Vox Sanguinis*. 31(2): 141-151.

Shaw, J., Sicree, R., Zimmet, P. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 87(1): 4-14.

Shields, R., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L., Hong, K., Meng, Y., Weikert, S., Presta, L. 2002. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 277(30): 26733.

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.

Sumar, N., Bodman, K., Rademacher, T., Dwek, R., Williams, P., Parekh, R., Edge, J., Rook, G., Isenberg, D., Hay, F. 1990. Analysis of glycosylation changes in IgG using lectins. *Journal of Immunological Methods*. 131(1): 127-136.

Sumar, N., Isenberg, D., Bodman, K., Soltys, A., Young, A., Leak, A., Round, J., Hay, F., Roitt, I. 1991. Reduction in IgG galactose in juvenile and adult onset rheumatoid arthritis measured by a lectin binding method and its relation to rheumatoid factor. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 50(9): 607.

Suzuki, H., Moldoveanu, Z., Hall, S., Brown, R., Vu, H., Novak, L., Julian, B., Tomana, M., Wyatt, R., Edberg, J. 2008. IgA1-secreting cell lines from patients with IgA nephropathy produce aberrantly glycosylated IgA1. *The Journal of Clinical Investigation*. 118(2): 629-639.

Turner, G. 1992. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clinica Chimica Acta*. 208(3): 149-171.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J. 2009. *Essentials of Glycobiology*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press San Diego, CA.

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. 2007. *Fundamentos de bioquímica, la vida a nivel molecular*, 2 ed. Panamericana. NY.

Wang, L., Ghosh, R. 2009. Feasibility study for the fractionation of the major human immunoglobulin G subclasses using hydrophobic interaction membrane chromatography. *Analytical Chemistry*. 82(1): 452-455.

Wiederschain, G. 2009. Essentials of Glycobiology. *Biochemistry (Moscow)*. 74(9): 1056-1056.

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

Wright, C. S. 1992. Crystal structure of a wheat germ agglutinin/glycophorin-sialoglycopeptide receptor complex. Structural basis for cooperative lectin-cell binding. *Journal of Biological Chemistry*. 267(20): 14345.

Wuhrer, M., Porcelijn, L., Kapur, R., Koeleman, C., Deelder, A., De Haas, M., Vidarsson, G. 2008. Regulated glycosylation patterns of IgG during alloimmune responses against human platelet antigens. *Journal of Proteome Research*. 8(2): 450-456.

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