

UNIVERSIDAD DE SONORA

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

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

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

NORMA MARLENNE RENDÓN ALVAREZ

HERMOSILLO, SONORA.

MAYO 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 Norma Marlene Rendón Álvarez, 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 Castillón Campaña.
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la oportunidad de participar en el Programa de Maestría en Ciencias de la Salud y a la Universidad de Sonora (UNISON), por todo el apoyo brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

En particular, quiero expresar mi profundo reconocimiento a la Dra. Maria del Carmen Candia Plata, no sólo por dirigir este trabajo, sino también por la confianza depositada en mí. Agradezco infinitamente su tiempo, su paciencia y el que haya compartido conmigo sus conocimientos y sus experiencias, ya que éstas me permitieron concluir satisfactoriamente este proyecto.

Agradezco también al Dr. Enrique Bolado Martínez, al Dr. Luis Fernando López Soto y a la M.C. Lucia Guadalupe Castellón Campaña, por su tiempo, consejos y aportaciones para la mejoría de este trabajo.

A mis compañeros de Maestría, del Laboratorio de Bioquímica Clínica y a la M.C. Denisse García Villa, gracias por compartir su tiempo, conocimientos y por hacer del laboratorio un lugar en donde pude pasar innumerables horas de trabajo. Especialmente le doy las gracias a mis amigos M.C. Dámaris Pineda Orozco y M.C. Christian Israel Luján Camarillo, por sus experiencias, horas de trabajo, críticas constructivas, consejos y sobre todo por su complicidad, apoyo y amistad invaluable, no sólo durante estos últimos tres años, sino también por ser parte de mi vida profesional y personal.

Por último, aunque no menos importante, agradezco a Dios por permitirme llegar hasta donde estoy y por bendecirme con la familia que me ha dado. A mis padres Norma y Marco y a mi hermano Marco Antonio, por estar siempre conmigo, apoyándome, amándome y motivándome a ser una mejor persona tanto en el ámbito personal como profesional.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
OBJETIVOS.....	vii
Objetivo General.....	vii
Objetivos Específicos.....	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
Epidemiología, Etiología y Patogénesis de la Diabetes Mellitus Tipo 2..	3
Evidencias Clínicas de la Alteración en la Concentración de Transferrina Sérica.....	4
Microheterogeneidad de la Transferrina Sérica.....	5
Estructura y Funciones Normales de la Transferrina Humana Sérica. . . .	8
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
Diseño de Investigación.....	15
Tipo de Investigación.....	15
Muestras de Estudio.....	15

Lugar del Estudio.....	16
Reactivos y Materiales.....	16
Cuantificación de Proteínas Séricas Totales de las Muestras Seleccionadas.....	16
Aislamiento de Transferrina Sérica por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC).....	17
Estimación de la Pureza de la Transferrina por Electroforesis e Inmunodetección.....	18
Lectinoensayos para la Caracterización de la Glicosilación Terminal de Transferrina Sérica.....	18
Cuantificación de Ácido Siálico Total Sérico.....	19
Análisis de los Datos.....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
Cuantificación de Proteínas Séricas Totales.....	22
Aislamiento de Transferrina Sérica por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC).....	23
Lectinoensayos para la Caracterización de la Glicosilación Terminal de Transferrina Sérica.....	25
Cuantificación de Ácido Siálico Total Sérico.....	35
CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS.....	39

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Densidad óptica generada por la interacción de las lectinas con la transferrina sérica de los pacientes y los controles.	28
II. Relaciones de las absorbancias de las lectinas ensayadas con la transferrina sérica.	31
III. Concentración de ácido siálico total sérico en los pacientes y controles incluidos en el estudio.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Microheterogeneidad de transferrina sérica humana atribuible al diferente grado de sialilación de las cadenas de N-oligosacáridos.	7
2. Transferrina unida a hierro.	10
3. Metabolismo del hierro.	11
4. Transferrina tetrasialilada.	12
5. N-glicosilación de una proteína.	14
6. Cromatograma del aislamiento de transferrina sérica por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC)	24
7. Electroforesis, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, al 12%.	26
8. Electrotransferencia de la fracción de elución a pH 4.0, e inmunodetección de la transferrina sérica.	27
9. Interacción de la lectina SNA con la transferrina sérica.	30
10. Relación SNA/MAA.	32
11. N-oligosacárido biantenarico disialilado de la transferrina sérica.	34
12. Concentración de ácido siálico total sérico en el grupo de pacientes con DM2 y el grupo de controles.	37

OBJETIVOS

Objetivo General

Demostrar que la transferrina sérica de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se encuentra hiposialilada, en relación con la transferrina sérica de sujetos aparentemente sanos.

Objetivos Específicos

1. Aislar la transferrina sérica de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y de los sujetos euglicémicos aparentemente sanos, con el fin de tener a la proteína significativamente pura y realizar el análisis de glicosilación terminal.
2. Determinar la afinidad de la transferrina sérica de los pacientes y controles hacia un grupo de lectinas vegetales, con el fin de estimar la glicosilación terminal de la glicoproteína.
3. Comparar estadísticamente la afinidad de la transferrina sérica de los pacientes y controles por las lectinas vegetales para estimar las diferencias de glicosilación terminal.

RESUMEN

La diabetes mellitus 2 (DM2), es un síndrome plurimetabólico de muy alta prevalencia mundial. Su desarrollo está asociado con el estilo de vida sedentario y la obesidad, pero la alta prevalencia de DM2 se explica también por la predisposición genética de la población a esta enfermedad. La principal característica de la DM2 es la hiperglicemia crónica, la cual es la principal responsable de diversas complicaciones metabólicas que conllevan a diversos daños orgánicos, los cuales son exacerbados por el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica.

El hierro libre, que es capaz de estimular la producción de radicales libres, contribuye al estrés oxidativo, por lo que uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante es el secuestro de este metal por la transferrina (Tf), una proteína sérica transportadora de hierro. Se ha observado que la concentración de transferrina sérica en los pacientes con DM2 es menor que la de personas sanas, pero se desconoce el origen de la hipotransferrinemia, por lo que una explicación alternativa de los niveles séricos de transferrina podría ser la pérdida de los carbohidratos terminales de su estructura. De la misma forma que ocurre cuando cualquier otra glicoproteína sérica pierde ácido siálico, la transferrina con poco siálico podría ser rápidamente aclarada por el hígado. Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue demostrar que la transferrina sérica de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se encuentra hiposialilada, en relación con la transferrina sérica de sujetos euglicémicos, aparentemente sanos, pareados por sexo y edad con el grupo de pacientes.

Se realizó un muestreo no probabilístico, por conveniencia, para conformar un grupo de nueve pacientes con DM2 y un grupo control de siete sujetos euglicémicos aparentemente sanos. El aislamiento de la transferrina se realizó por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés), utilizando una matriz de Sefarosa 4B-iminodiacetato-níquel, la transferrina se separó del adsorbente en

la última fase de la elución a pH 4.0. La elevada pureza de la fracción de Tf de la fracción de elución a pH 4.0 fue comprobada por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras e inmunodetección.

La estimación de la glicosilación terminal de la Tf aislada, fue realizada mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a lectinas (ELLA, por sus siglas en inglés), 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), *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, ECA, Con A, y WGA) y las relaciones entre lectinas (SNA/MAA, SNA/PNA, MAA/PNA, ECA/SNA Y ECA/MAA), sugieren que la Tf de los pacientes está hipersialilada a expensas del predominio de glicofomas tetra y pentasialiladas. La hipersialilación de la Tf indica que el aumento del aclaramiento hepático de la molécula no es la causa de la reducción en su concentración plasmática.

Finalmente, en el grupo de los pacientes también se demostró la elevación de la concentración sérica de ácido siálico total, lo que sugiere que la hipersialilación de la Tf de los pacientes, podría contribuir a la elevación del ácido siálico total sérico.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus 2 (DM2), es un síndrome plurimetabólico de muy alta prevalencia mundial, que afecta a más del 8% de la población adulta mexicana y es la causa de aproximadamente 2,9 millones de muertes en nuestro país (OMS, 2010). Su desarrollo está asociado con el estilo de vida sedentario y la obesidad, pero la alta prevalencia de DM2 se explica también por la predisposición genética de la población a esta enfermedad (ADA, 2010).

La principal característica de la DM2 es la hiperglicemia crónica, que no produce manifestaciones clínicas al iniciar la enfermedad pero que al cabo de los años es la principal responsable de diversas complicaciones metabólicas que dañan órganos como los ojos (retinopatía y cataratas), cerebro (neuropatía diabética), riñones (nefropatía diabética) y corazón (Cylwik y col., 2006; Klein, 1995; Laakso, 1999; Quinn, 2001; Van Dam y col., 1995). Las complicaciones cardiovasculares y renales de la diabetes, son las principales responsables de la elevada tasa de mortalidad entre los pacientes con DM2 (Kanwar y col., 2008; Laakso, 2001).

En la DM2, los daños orgánicos provocados por la hiperglicemia son exacerbados por el estrés oxidativo y la peroxidación lipídica (Giugliano y col., 1996; Memisogullari y col., 2003). El hierro libre, que es capaz de estimular la producción de radicales libres, contribuye al estrés oxidativo, por lo que uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante es el secuestro de este metal por la transferrina, una proteína sérica transportadora de hierro (Van Campenhout y col., 2003). Sin embargo, los pacientes con DM2 suelen tener una elevada tasa de glicación de la transferrina, reduciendo con ello su afinidad por el hierro y aumentando los efectos pro-oxidantes del metal (Fujimoto y col., 1995; Thomas y col., 2004).

Por otro lado, se ha observado que la concentración de transferrina sérica en los pacientes con DM2 es menor que la de personas sanas, de ahí que esta proteína sea considerada un marcador negativo de fase aguda (Memisogullari y Bakan, 2004; Ritchie y col., 1999). Pero aunque su utilidad clínica es indiscutible, se desconoce el origen de la hipotransferrinemia en los pacientes con DM2 (Gomme y col., 2005). Es posible que la excreción urinaria de transferrina sea una de las causas de la disminución de la proteína en el suero, porque se detecta transferrina en la orina de los pacientes con DM2 aún antes de presentarse microalbuminuria clínica (Worthley y col., 2001). Otra posible causa de la hipotransferrinemia podría ser la pérdida de carbohidratos terminales en la proteína. La transferrina es una proteína N-glicosilada sintetizada y metabolizada principalmente por los hepatocitos (Arefanian y Djalali, 2002), que es aclarada de la misma forma que ocurre cuando cualquier otra glicoproteína sérica pierde ácido siálico (un carbohidrato ubicado en la porción terminal de los oligosacáridos ligados a las glicoproteínas (Arndt, 2001; Cylwik y col., 2006; Sönmez y col., 2000; Vázquez-Moreno y col., 2001). Esta última hipótesis fue evaluada en el presente proyecto y, por lo tanto, el objetivo fue demostrar que la transferrina sérica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se encuentra hiposialilada, en relación con la transferrina sérica de sujetos euglicémicos, aparentemente sanos.

ANTECEDENTES

Epidemiología, Etiología y Patogénesis de la Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un síndrome plurimetabólico multifactorial caracterizado por hiperglicemia crónica (Alberti y col., 1998). La DM2 es una de las enfermedades con mayor tasa de morbilidad y mortalidad en el mundo. Así mismo, la incidencia de este padecimiento ha aumentado rápidamente alcanzando proporciones endémicas (Dabelea y col., 1998; Hanson y col., 2002; Schulz y col., 2006). Se ha estimado que 230 millones de personas, a nivel mundial, sufren de diabetes y que en el año 2030 habrá alrededor de 366 millones de pacientes con esa afección (WHO, 2010; Wild y col., 2004; Zimmet, 2000). México ocupa el undécimo lugar a escala mundial y el segundo en América latina, sólo rebasado por Brasil (WHO, 2010; Wild y col., 2004). En Sonora, a partir del año 2000, la DM2 2 afecta hasta el 16% de los adultos mayores de 30 años en zonas urbanas, duplicando la prevalencia nacional media de 8.2%. (Álvarez-Félix y col., 2006; Vázquez-Martínez y col., 2006).

La etiología de la DM2 se vincula con factores genéticos altamente heterogéneos, que pueden afectar la síntesis, secreción y/o acción de la insulina (Aitman y Todd, 1995; Davidson, 1995; Hanson y col., 1995; Klemm y Paschke, 2000; Murakami y Shima, 1995), o los procesos metabólicos de asimilación de la glucosa. Además, otros factores relacionados con el origen de la enfermedad están vinculados con el estilo de vida; entre ellos, los componentes principales son la adiposidad visceral y el sedentarismo (Fujimoto y col., 1995; Heilbronn y col., 2004).

En la evolución de la DM2, se presentan cambios bioquímicos y metabólicos que contribuyen al desarrollo de las complicaciones micro y macrovasculares de la diabetes (Alberti y col., 1998; Klein, 1995; Laakso, 1999). El principal factor de riesgo de las complicaciones microvasculares es la hiperglicemia (ADA, 2010), pero aún cuando las

evidencias sugieren que el control glicémico está estrechamente relacionado con la magnitud de las alteraciones macrovasculares, en este caso no está bien definida la relación patogénica (Laakso, 2001; Zimmet, 2000). La hiperglicemia puede causar aterosclerosis por varios mecanismos (Berliner y col., 1995), como el estrés oxidativo y carbonílico que incrementan las tasas de glicación y/o peroxidación de lípidos y proteínas así como la formación de productos finales de glicación avanzada (AGE's, por sus siglas en inglés.(Esper y col., 2008; McCance y col., 1993; Nourooz-Zadeh y col., 1995; Vivekanadan-Giri y col., 2008; Wolff y col., 1991) El fierro libre, que es capaz de estimular la producción de radicales libres, contribuye al estrés oxidativo, por lo que uno de los principales mecanismos de defensa antioxidante es el secuestro de este metal por la transferrina, una proteína sérica transportadora de fierro (Gomme y col., 2005; Van Campenhout y col., 2003; Wolff y col., 1991). Sin embargo, los pacientes con DM2 suelen tener una elevada tasa de glicación de la transferrina, reduciendo con ello su afinidad por el fierro y aumentando los efectos pro-oxidantes del metal (Ahmed, 2005; Memisogullari y Bakan, 2004). Es por ello que cada día cobra más auge el estudio de esta proteína como marcador de riesgo de complicaciones (Fumeron y col., 2006). Pero para descifrar la relevancia clínica de la transferrina, es necesario avanzar en su caracterización bioquímica.

Evidencias Clínicas de la Alteración en la Concentración de Transferrina Sérica

La transferrina ha sido objeto de estudio de varios grupos de investigadores durante los últimos años, gracias a la controversia generada por la posibilidad de que su disminución en el suero de pacientes diabéticos sea un factor de riesgo de complicaciones de la diabetes (Kemp y col., 1984; Memisogullari y Bakan, 2004). Se ha observado que la concentración de transferrina sérica en los pacientes con DM2 es menor que la de personas sanas, de ahí que esta proteína sea considerada como un marcador negativo de fase aguda (Memisogullari y Bakan, 2004; Ritchie y col., 1999).

Desde la década de los 90's, se sabe que hay una elevación significativa en la excreción urinaria de transferrina en pacientes con diabetes (Kazumi y col., 1999; O'Donnell y col., 1991), así como de otras proteínas como la IgG y la ceruloplasmina, que podrían predecir el desarrollo de microalbuminuria en pacientes con DM2, proporcionando métodos adicionales para el descubrimiento temprano de nefropatía (Narita y col., 2004), debido a que su excreción urinaria aumenta antes de presentarse microalbuminuria clínica (Worthley y col., 2001).

Por otro lado, la transferrina es una proteína sérica N-glicosilada que es aclarada del torrente circulatorio cuando sus oligosacáridos pierden una cantidad importante del ácido siálico (un carbohidrato ubicado en la porción terminal de los oligosacáridos). Se ha reportado que existe una correlación negativa entre los niveles de ácido siálico sérico y la concentración de transferrina sérica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Memisogullari y Bakan, 2004), por lo que una explicación alternativa de los niveles séricos de transferrina podría ser la pérdida de los carbohidratos terminales de su estructura. De la misma forma que ocurre cuando cualquier otra glicoproteína sérica pierde ácido siálico, la transferrina con poco siálico podría ser rápidamente aclarada por el hígado (Cylwik y col., 2006).

Microheterogeneidad de la Transferrina Sérica

Una glicoproteína en particular puede presentar diferentes formas que difieren en la estructura de una o más unidades en sus oligosacáridos. Esta microheterogeneidad puede ser tan sutil como los cambios estructurales asociados con una sola unidad monomérica de los oligosacáridos (Jong y col., 1995; McNaught y Wilkinson, 1997). Sin embargo, no todos los cambios en la estructura de los oligosacáridos son compatibles con la preservación de las funciones nativas de las glicoproteínas de las que

forman parte. Por ejemplo, la pérdida significativa de ácido siálico provoca el aclaramiento de la mayoría de las glicoproteínas que la experimentan.

La transferrina es la proteína transportadora de hierro más importante, es sintetizada principalmente en los hepatocitos y está conformada por tres dominios subestructurales, con una sola cadena polipeptídica, dos sitios independientes para la unión al metal (en el dominio N-terminal y en el C-terminal) y dos N-oligosacáridos de tipo complejo en el dominio C-terminal, en las posiciones 413 y 611 (Arndt, 2001).

Los dos N-oligosacáridos pueden presentarse como estructuras bi-, tri- y tetra-antennarias (Van Noort y col., 1994). Cada antena contiene una molécula de ácido siálico terminal (cargado negativamente). Debido a esto, existen diferentes isoformas de transferrina en el suero, que van desde la asialo-transferrina y la monosialo-transferrina, hasta la octasialo-transferrina (Van Noort y col., 1994).

De la concentración total de transferrina en suero, menos del 1.5% pertenece a heptasialo-transferrina (Tf), entre 1 y 3% a hexasialo-Tf, del 12 al 18% a pentasialo-Tf, del 4.5 al 9% a trisialo-Tf, menos del 2.5% a disialo-Tf y la más abundante, que se encuentra del 64 al 80%, corresponde a la tetrasialo-Tf. Las isoformas asialo-, monosialo- y octasialo-Tf, no son detectables o representativas, encontrándose en menor porcentaje, menos del 0.5% (asialo-Tf) y menos del 0.9% (monosialo-Tf), respectivamente, del total de la molécula de Tf bajo condiciones no patológicas (ver Figura 1; Arndt, 2001; Mårtensson y col., 1997).

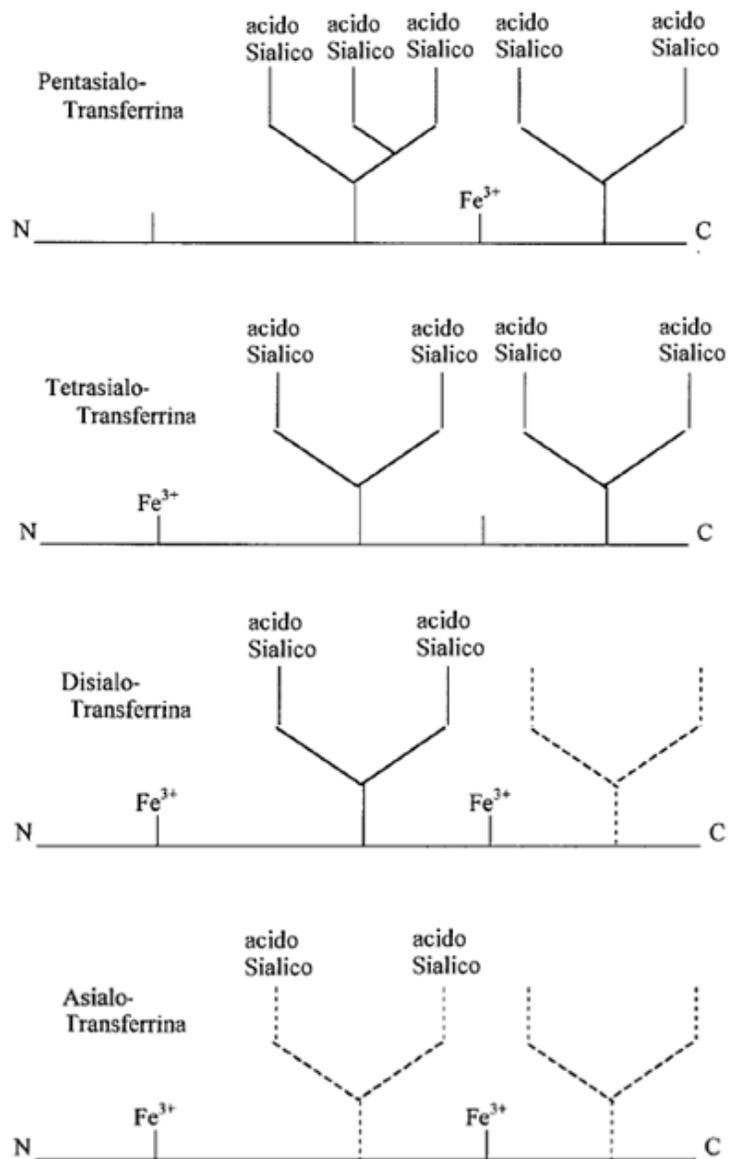


Figura 1. Microheterogeneidad de transferrina sérica humana atribuible al diferente grado de sialilación de las cadenas de N-oligosacáridos.

La isoforma más abundante en personas sanas, corresponde a la tetrasialo-Tf (segunda figura de arriba hacia abajo).

Modificado de Arndt, 2001.

El punto isoeléctrico (pI) de cada molécula de Tf decrece entre 0.1 y 0.2 unidades de pH con cada residuo de ácido siálico terminal unido a la cadena del N-oligosacárido, es decir, el pI para la isoforma más abundante, tetrasialo-Tf, es de 5.4, por lo que para las isoformas de menor concentración: disialo-, trisialo- y pentasialo-Tf es de 5.7, 5.6 y 5.2 respectivamente (Wuyts y col., 2001).

Stibler y Kjellin fueron los primeros en reportar la presencia de isoformas de Tf con pI >5.7 en el líquido cerebroespinal y en el suero de pacientes alcohólicos. Estas isoformas, con una vida media aproximada de 14 días, se presentaban en altas concentraciones en el suero de los pacientes con alcoholismo activo, pero desaparecían después de un periodo de abstinencia importante (Stibler, 1991; Stibler y col., 1978; Stibler y col., 1979). Actualmente este grupo de isoformas, que incluyen la asialo-Tf, monosialo-Tf y disialo-Tf, se conocen en conjunto como Transferrina Deficiente en Carbohidratos (CDT, por sus siglas en inglés (Coddeville y col., 1998; Sanz-Nebot y col., 2003; Stibler, 1991). En el caso de la DM2, no se sabe si la reducción de la transferrina está asociada con la disminución de la transferrina altamente sialilada, especialmente debido a que en los pacientes el porcentaje de CDT está significativamente bajo y correlaciona negativamente con la concentración de SA (Cylwik y col., 2006).

Estructura y Funciones Normales de la Transferrina Humana Sérica

La transferrina sérica es una glicoproteína, formada por una única cadena polipeptídica de 679 aminoácidos, con una masa molecular de 79.5 kDa. Consta de dos lóbulos de similar estructura interna e independientes para la fijación de Fe^{3+} , el lóbulo N-terminal y el C-terminal, cada uno está plegado formando dos dominios a los que se une de manera reversible el hierro férrico. Los aminoácidos que unen al ión de hierro férrico son los mismos para los dos lóbulos: dos tirosinas (Y), un ácido aspártico (D),

una histidina (H) y un anión que es usualmente carbonato (CO_3^{2-}) (ver Figura 2; Mckenzie, 2000).

La principal función de la Tf es el transporte de fierro en la sangre. La transferrina se une específicamente al Fe^{+3} , formando el complejo Tf- Fe^{+3} que circula libremente por el plasma transportando el metal hacia las moléculas de almacenamiento, como la ferritina o la hemosiderina (Bernadette, 2007.). El complejo Fe^{+3} -Tf también llega a la médula ósea, en donde el metal es captado por células precursoras eritrocitarias, gracias a la endocitosis mediada por receptores, para su uso en la síntesis de hemoglobina (el fierro forma parte del grupo hem de la hemoglobina; ver Figura 3). Su concentración en suero es de 2.22 – 3.70 g/L y tiene una vida media de alrededor de 7 días (Tortora y Grabowski, 2002).

La parte glucosídica de la Tf, la constituyen dos cadenas de oligosacáridos complejas N-enlazadas a los residuos de asparagina ($\text{Asn}_{413, 611}$) del dominio C-terminal, las cuales varían en su grado de ramificación, presentando estructuras con dos ó tres ramificaciones externas o antenas. Cada antena puede o no terminar con un residuo de ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) cargado negativamente. El ácido siálico contribuye a la carga total de la glicoproteína (ver Figura 4; Deschamps y col., 2003).

El proceso de N-glicosilación de la transferrina es similar al de otras glicoproteínas séricas, por lo que se lleva a cabo sobre residuos de asparagina (Asn). La primera etapa inicia en el retículo endoplásmico, con la intervención de un portador lipídico llamado dolicol, sobre el que se sintetiza un oligosacárido precursor que contiene nueve residuos de manosa (Man), tres residuos de glucosa (Glc) y dos residuos de N-acetil glucosamina (GlcNAc) ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$).

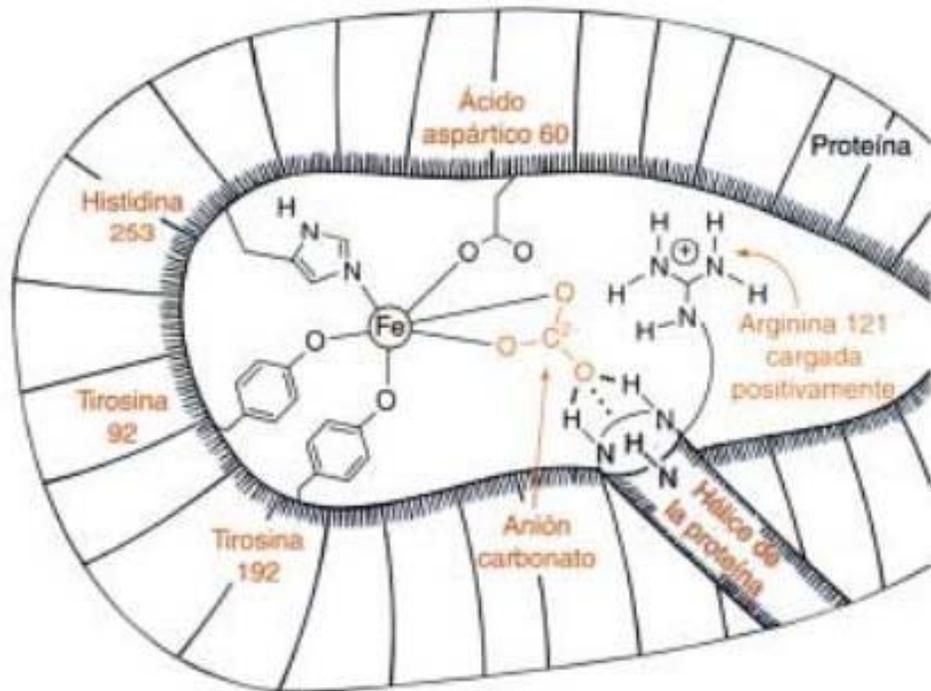


Figura 2. Transferrina unida a hierro.

Los dos puntos de la transferrina, en los que se une el hierro están localizados en la base de una hendidura de la proteína, como se muestra esquemáticamente en esta figura. El hierro (⁺³) se une a un átomo de N del aminoácido histidina y a tres átomos de oxígeno de la tirosina y del ácido aspártico. La quinta y sexta posición de coordinación del metal están ocupadas por átomos de oxígeno del anión carbonato (CO₃⁻²), que a su vez está anclado por interacciones electrostáticas con el aminoácido arginina, cargado positivamente, y mediante puentes de H al tramo en hélice de la proteína.

Modificado de Baker y col., 1990.

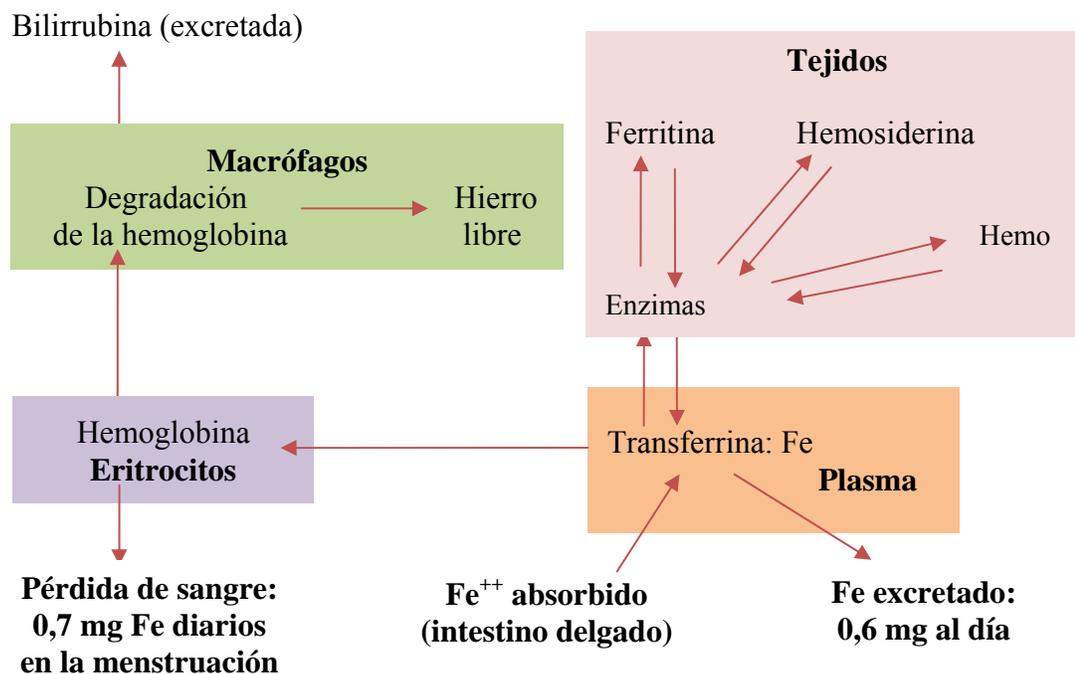


Figura 3. Metabolismo del Hierro.

Cuando el hierro se absorbe del intestino delgado, se combina inmediatamente en el plasma sanguíneo con la apotransferrina para formar transferrina que después se transporta al plasma. En el citoplasma celular el hierro se combina con la apoferritina, para formar ferritina, una proteína de almacenamiento de hierro. Cuando la cantidad de hierro disminuye, parte del hierro de la reserva ferritina se libera y se transporta en forma de transferrina hacia zonas donde se necesita. La transferrina se une fuertemente a receptores de las membranas celulares de los eritroblastos en la médula ósea para la formación de hemoglobina nueva.

Adaptado de Guyton y Hall, 2006.

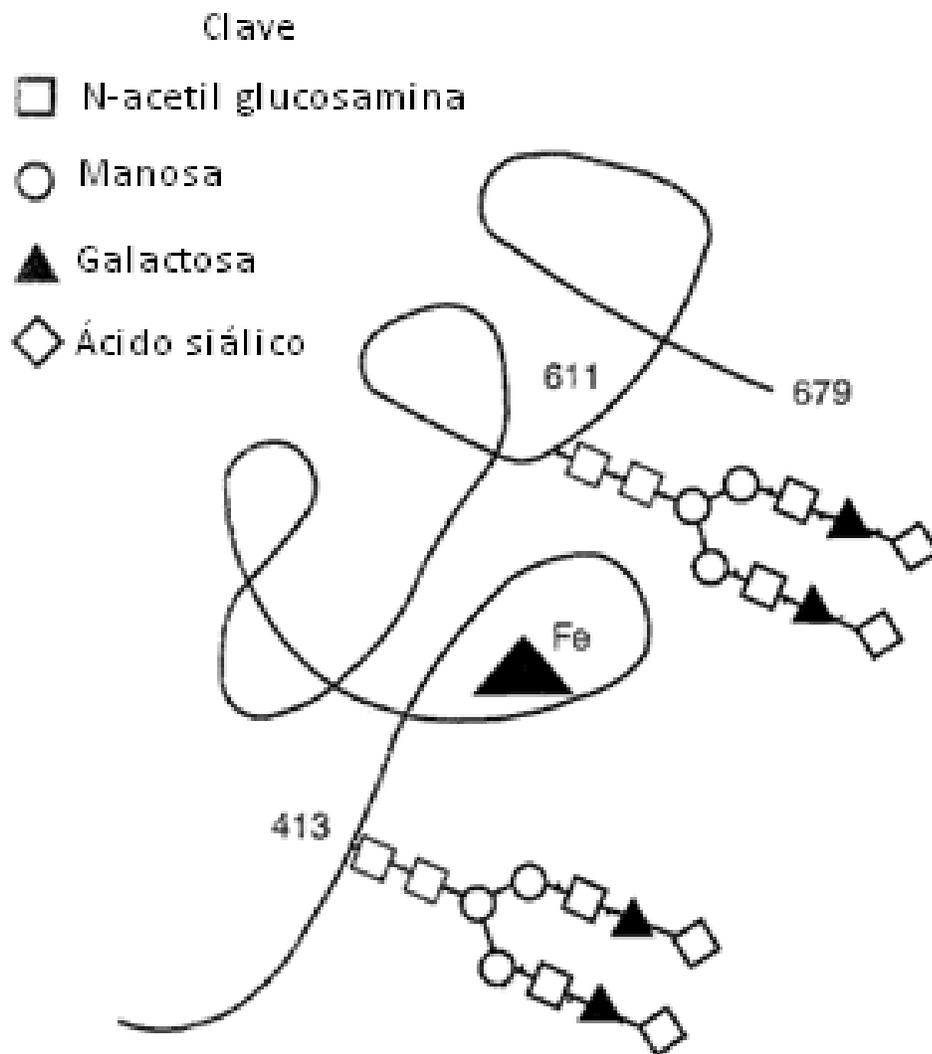


Figura 4. Transferrina tetrasialilada.

Se muestra una glicoforma de la transferrina con cuatro residuos terminales de ácido siálico.

Modificado de Lourin, 1996.

Una vez terminada la síntesis del oligosacárido precursor, éste es transferido a la proteína naciente, y unido covalentemente al átomo de nitrógeno (N-) de la cadena lateral del residuo de asparagina (Asn). En la segunda etapa de procesamiento, que continúa en el RE, el N-glicano es recortado por la acción de glicosidasas y manosidasas, enzimas que eliminan unidades de Glc y Man, respectivamente, lo que permite la modificación del posterior del oligosacárido con diversos carbohidratos, mediante la adición de GlcNAc, galactosa, fucosa y ácido siálico, que se agregan gracias a la acción sucesiva de diferentes familias de glicotransferasas (GT) que transfieren distintos tipos de carbohidratos al glicano en procesamiento; esta última etapa, se lleva a cabo en el aparato de Golgi (ver Figura 5; Martínez-Duncker y col., 2008; Voet y col., 2007).

Mediante el estudio de diversas enfermedades crónicas (Arnold y col., 2008; Campbell y col., 2001; Carchon y col., 2004; Ceciliani y Pocacqua, 2007; Higai y col., 2003; Orntoft y Vestergaard, 1999; Van Rensburg y col., 2000; Vázquez-Moreno y col., 2001), se ha demostrado que las etapas postraduccionales de la N-glicosilación son altamente sensibles a las variaciones metabólicas celulares. Por esta razón, cabe esperar que los N-oligosacáridos de glicoproteínas como la Tf, de los pacientes con una enfermedad plurimetabólica crónica como la DM2, sean susceptibles a modificaciones terminales. Esta hipótesis es congruente con la observación de que los pacientes con DM2 presentan una concentración reducida de transferrina sérica. Se desconoce el origen de la hipotransferrinemia, pero las alteraciones en su glicosilación podrían explicarla.

Por lo anterior, el objetivo de este proyecto fue demostrar que la transferrina sérica de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se encuentra hiposialilada, en relación con la transferrina sérica de sujetos aparentemente sanos.

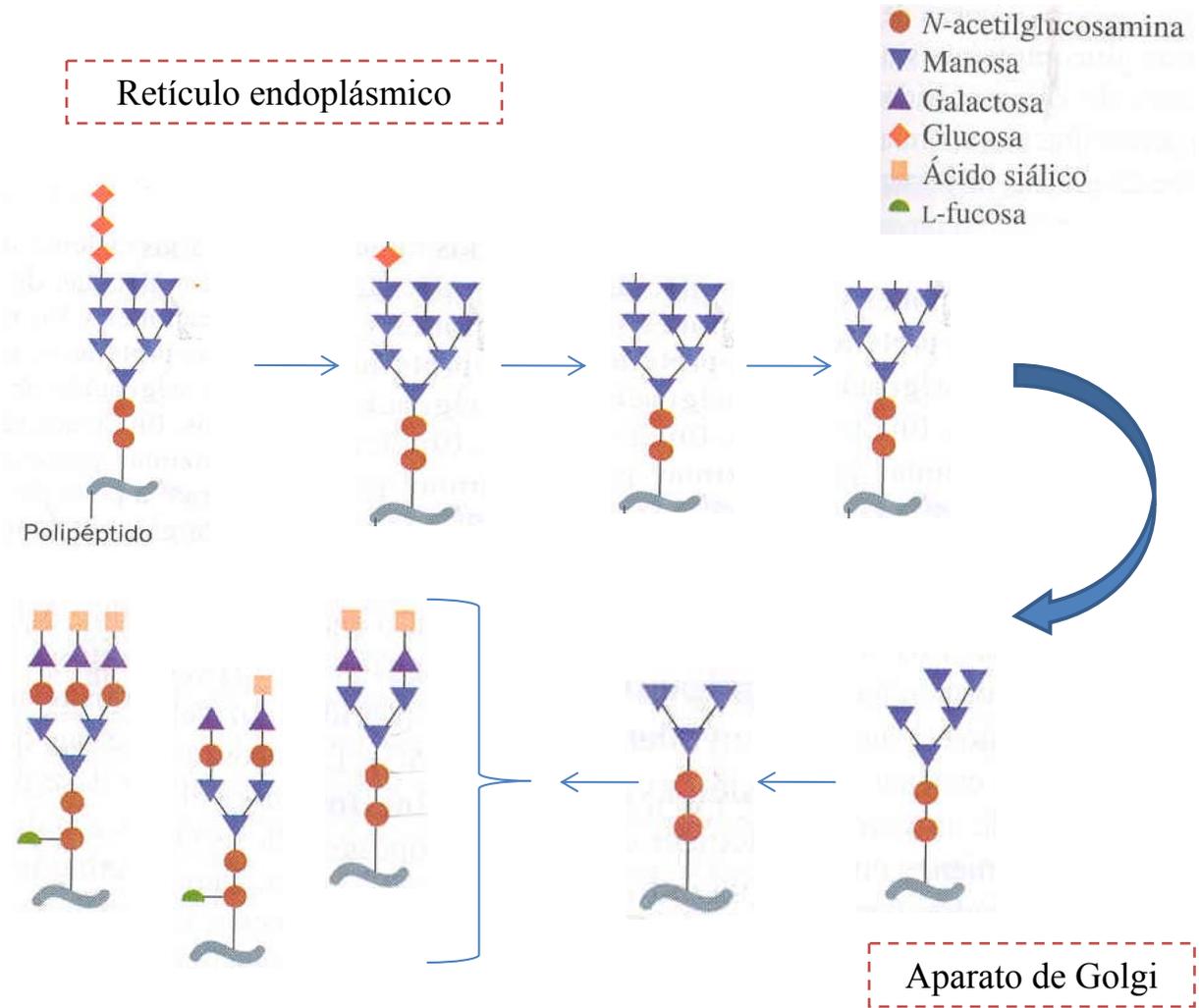


Figura 5. N-glicosilación de una proteína.

Modificado de Voet y col., 2007.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de Investigación

Tipo de Investigación

Se trata de un estudio transversal, observacional y analítico. Este tipo de estudio identifica a personas con una enfermedad y los compara con un grupo control apropiado que no tenga la enfermedad. Se estudian simultáneamente una o más variables mediante las que se pueda estimar los eventos relacionados con la enfermedad de la población de pacientes bien definida, en un momento determinado, pero no permite conocer la secuencia temporal de los acontecimientos (Pagano y Gauvreau, 2001).

Muestras de Estudio

Transferrina aislada de nueve muestras séricas de pacientes con DM2 y de siete muestras séricas de sujetos aparentemente sanos, normoglicémicos, pareados por sexo y edad con el grupo de pacientes. 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, alcoholismo, anemias, infecciones urinarias, 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.

Lugar del Estudio

Laboratorio de Bioquímica Clínica del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora.

Reactivos y Materiales

La Sefarosa 4B utilizada para la síntesis de la Sefarosa-iminodiacetato (Vázquez-Moreno y col., 1992) fue adquirida de Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). Las lectinas biotinizadas, *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA), *Erythrina cristagalli* (ECA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Wheat germ* agglutinin (WGA), *Canavalia ensiformis* (Con A) y *Lens culinaris* (LCA) fueron obtenidas de Oxford GlycoSystems (NY, USA). Todos los antisueros, además de los reactivos de grado analítico fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 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 del grupo de pacientes diabéticos y del grupo control, 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 (Espectrofotometro AquaMate, Thermo Corp., USA) (Aitken y Learmonth, 1996; Stoscheck, 1990)

Aislamiento de Transferrina Sérica por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC)

Para el aislamiento de transferrina sérica, el suero de las 16 muestras sanguíneas fue fraccionado por un esquema cromatográfico de una etapa, utilizando cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, a temperatura ambiente. El adsorbente utilizado fue Sefarosa 4B-iminodiacetato (Vázquez-Moreno y Candia-Plata, 1996), cargado con $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 50 mM. La matriz fue equilibrada con 2 volúmenes de una solución de NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 6.5, 5.5, 4.0 y con 4 volúmenes de la misma solución, pero a pH de 7.6. El volumen de la cama cromatográfica con el gel ya equilibrado fue de 10.6 mL. Se aplicó 1 mL (69 – 78 mg de proteína por mL) de suero humano (problema o control), a la fase estacionaria, a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min, previamente ajustado con NaCl 2 M/MOPS 10 mM, pH 7.6, condiciones bajo las cuales se ha demostrado que se produce la adsorción principal de las inmunoglobulinas séricas (Vázquez-Moreno y Candia-Plata, 1996). Las proteínas no adsorbidas a la matriz fueron eliminadas lavando la columna con NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 7.6. La elución de las proteínas adsorbidas se promovió por la acidificación discontinua de la fase móvil con NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 6.5, 5.5 y 4.0. Cada fracción eluida fue rápidamente neutralizada con Trizma base 100 mM, pH 8.0. La transferrina se separó del adsorbente en la última fase de la elución a pH 4.0. El aislamiento de transferrina fue monitoreado espectrofotométricamente a 280 nm. Las proteínas remanentes se liberaron de la matriz con una solución de guanidina-HCl 6 M, pH 7.6. La transferrina se dializó contra MOPS 10 mM, pH 7.2.

Estimación de la Pureza de la Transferrina por Electroforesis e Inmunodetección

La pureza de la transferrina fue probada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con geles de poliacrilamida al 12%, en una cámara vertical a 90 volts constantes (Bio-Rad, USA), seguida de la electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa a 120 mA constantes y 12 volts (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell), 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%, durante la noche a temperatura ambiente (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 se utilizó como antisuero primario a la IgG anti-transferrina humana, desarrollada en cabra (The Binding Site), en dilución 1:800 por 30 minutos a TA y como antisuero secundario Anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa (Sigma-Aldrich), en dilución 1:1,000 por 30 minutos a TA. Después de cada incubación, la membrana se lavó 3 veces con PBS 20 mM pH 7.2 -Tween 20 al 0.05% por 5 minutos en agitación constante. Finalmente, como revelador de la reacción se utilizó a la Diaminobenzidina (DAB-Urea H₂O₂/HCl, de Sigma-Aldrich., USA),

Lectinoensayos para la Caracterización de la Glicosilación Terminal de Transferrina Sérica

Para estimar la afinidad de la transferrina sérica de pacientes y controles hacia las lectinas vegetales seleccionadas, se utilizó un ensayo inmunoabsorbente ligado a lectinas (ELLA, por sus siglas en inglés). Se realizaron diluciones de la transferrina de pacientes y controles, hasta tener una concentración final de 10 µg/mL en tampón de carbonatos, pH 9.6. Posteriormente, los pocillos de ocho placas de poliestireno, Immuno 96 MicroWell (NUNC, Thermo Corp., USA) fueron recubiertos con 100 µL de los sueros diluidos (1 µg de transferrina) e incubados por 12 h a 4°C con el fin de inmovilizar a la

proteína. Después, se realizaron cuatro lavados de cada una de las placas, con una solución Tris-HCl 0.05 mol/L, NaCl 0.15mol/L y Tween 20 al 0.05% (TBST) y posteriormente fueron bloqueadas 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 Tris-HCl 0.05 mol/L, pH 7.5, conteniendo CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 150 mM y Tween 20 0.1%. Posteriormente, los pozos de las placas se incubaron con 100 µL de cada una de las siguientes lectinas biotiniladas: *Sambucus nigra* (SNA), *Maackia amurensis* (MAA), *Erythrina cristagalli* (ECA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Wheat germ agglutinin* (WGA), *Canavalia ensiformis* (Con A) y *Lens culinaris* (LCA), obtenidas de Oxford GlycoSystems (NY, USA), con una concentración de 1 µg/mL en TBS, pH 7.5 por 1 h a 37°C. Después de realizar cuatro lavados con TBST, pH 7.5, las placas se incubaron con ExtrAvidin-peroxidasa (Sigma-Aldrich., USA), con una dilución 1:1,000 en TBS, pH 7.5, por 1 h a TA. Por último, se realizaron cuatro lavados con TBS, pH 7.5 y se utilizaron tabletas de O- fenilendiamina (Sigma-aldrich., USA) para revelar la interacción de las lectinas con los oligosacáridos de la proteína. La lectura se realizó después de transcurridos 30 minutos a 415 nm en un lector de Microplacas Benchmark [Bio-Rad., Japón, modificado de (Goodarzi y col., 2002; Gornik y Lauc, 2007)].

Cuantificación de Acido Siálico Total Sérico

Se realizó por medio del ensayo colorimétrico de la casa comercial Roche® (Mannheim, Alemania). Esta técnica se basa en la liberación del AS (AcNeu) de los glicoconjugados, por la acción de una neuramidasa. En presencia de la AcNeu-aldosa, el AcNeu es convertido a N-acetilmanosamina y piruvato, el piruvato es oxidado (por la piruvato oxidasa) a acetil fosfato, CO₂ y peróxido de hidrógeno, en presencia de MgCl₂, flavina adenina dinucleótido (FAD) y tiamina pirofosfato (TPP). El peróxido de hidrógeno formado (que es equivalente al AcNeu libre) es reducido por la peroxidasa

(POD), en presencia de 4-aminoantipirina (Ha-AAP) y N-etil-N-2-hidroxi-3-toluidina (EHTM), dando un compuesto colorido (rojo) que absorbe a 550 nm.

Análisis de los Datos

El análisis estadístico de los resultados cuantitativos se realizó con el programa NCSS 2001 (Hintze, 2001). El significado de las diferencias de las medias de las absorbancias obtenidas en los ensayos con lectinas entre los pacientes diabéticos y los controles fue estimado por la prueba de T de Student, la cual compara dos grupos independientes con varianza semejante y evalúa la hipótesis nula de que las medias de dos poblaciones son idénticas (Pagano y Gauvreau, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La transferrina es una glicoproteína sérica involucrada en el transporte del hierro, que actúa como una proteína antioxidante evitando que el hierro se encuentre libre y con ello la producción en exceso de radicales hidroxilo que podrían causar peroxidación de las membranas lipídicas y otros constituyentes celulares (Crichton y col., 2002; Fujimoto y col., 1995). La transferrina es considerada como un marcador negativo de fase aguda (Ritchie y col., 1999).

Se ha observado que los pacientes con DM2 presentan hipotransferrinemia (Gomme y col., 2005) pero hasta el momento no se cuenta con una explicación etiológica de este fenómeno. La presencia de transferrina en la orina de los pacientes con DM2, incluso antes de presentarse microalbuminuria, podría ser una posible explicación de los niveles bajos de transferrina en suero (Narita y col., 2004), pero otras posibles causas podrían involucrar la reducción de la síntesis hepática de la proteína, así como el aumento de su aclaramiento plasmático. De este último aspecto, se sabe que la pérdida de ácido siálico terminal en las cadenas de glicanos de las glicoproteínas séricas podría promover su remoción por acción de los asialoreceptores hepáticos, los cuales se encargan de reconocer glicoproteínas que han perdido ácido siálico y por lo tanto de regular su vida media en circulación (Hansen y col., 1994). En los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, se han notificado cambios en la glicosilación terminal de algunas de las proteínas séricas (Arnold y col., 2007; Vázquez-Moreno y col., 2001), por lo que podría esperarse que la potencial pérdida de ácido siálico de la transferrina pudiera motivar su remoción sanguínea.

La transferrina es una glicoproteína que exhibe un alto grado de microheterogeneidad en sus oligosacáridos terminales (Jong y col., 1995). Se conocen alrededor de ocho isoformas de la transferrina, que se diferencian entre sí por su masa molecular, punto isoeléctrico y número de residuos de ácido siálico terminal. La

isoforma más abundante en el suero humano normal, es la transferrina tetrasialidada (64 - 80%, con cuatro residuos de ácido siálico terminal en la cadena de oligosacáridos). Esta isoforma tiene una masa molecular de alrededor de 79, 561 Da (Lacey y col., 2001), similar a la que presentó la transferrina sérica de los sujetos euglicémicos, aislada en el presente trabajo.

Las implicaciones fisiológicas de la diversidad bioquímica en la glicosilación terminal de las glicoproteínas séricas de los pacientes sanos no están claras. Mucho menos lo están los cambios de glicosilación terminal que se han detectado en enfermedades crónicas como el alcoholismo, Alzheimer y enfermedades coronarias (Arndt, 2001; Fleming y Mundt, 2004; Van Rensburg y col., 2000) y hasta el momento no existen reportes de la glicosilación terminal de la transferrina sérica que puedan, al menos parcialmente, explicar la hipotransferrinemia tan común en los pacientes con DM2. (Crook y col., 1993b; Gomme y col., 2005; Ritchie y col., 1999).

Este es, hasta donde sabemos, el primer estudio de caracterización de la glicosilación terminal de la transferrina sérica de pacientes con DM2. El estudio inició con el aislamiento de la transferrina sérica de nueve pacientes con DM2 y de siete sujetos, euglicémicos, aparentemente sanos. Se ha demostrado que la glicosilación terminal de las glicoproteínas séricas es afectada fuertemente por la edad; por ello, los grupos de sujetos fueron pareados por su edad ($p = 0.24$), siendo de 68 años (± 8.9) en el grupo de pacientes y de 62 años (± 11) en el grupo control.

Cuantificación de Proteínas Séricas Totales

La cantidad promedio de proteínas totales en las muestras séricas de los pacientes, estimada espectrofotométricamente a 280 nm, fue de 68.04 ± 8.50 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 transferrina purificada, siendo ésta mayor en el caso de los pacientes.

Aislamiento de Transferrina Sérica por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC)

El aislamiento de la transferrina de las 16 muestras séricas se realizó por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés). Este tipo de cromatografía fue desarrollada por Porath y col., en 1975, ya que fueron los primeros en demostrar que las proteínas se podían separar de muestras biológicas, gracias a su afinidad por metales inmovilizados a un agente quelante unido covalentemente a una matriz inerte. Los metales más utilizados en IMAC son los de transición (Zn^{+2} , Cu^{+2} , o Ni^{+2}) mientras que los agentes quelantes incluyen al iminodiacetato (IDA por sus siglas en inglés), dipicolamina y tris-2-aminoetilamina, entre otros. Las proteínas se unen al metal principalmente por medio de los residuos de histidina, por lo que su elución es promovida por la simple disminución del pH o por la adición de imidazol (Porath, 1988).

Para el aislamiento de la Tf sérica, se sintetizó el adsorbente Sefarosa 4B-iminodiacetato-níquel, con 10.6 mL de volumen de cama, al que se le aplicó, en promedio, 1 mL de suero por corrida cromatográfica. En el cromatograma típico (ver Figura 6), se observó un primer pico correspondiente a la fracción de lavado (NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 7.6). Los siguientes picos, correspondieron a las fracciones de elución obtenidas por la acidificación discontinua de la fase móvil, con NaCl 1 M/MOPS 10 mM, a pH, 6.5, 5.5 y 4.0, respectivamente.

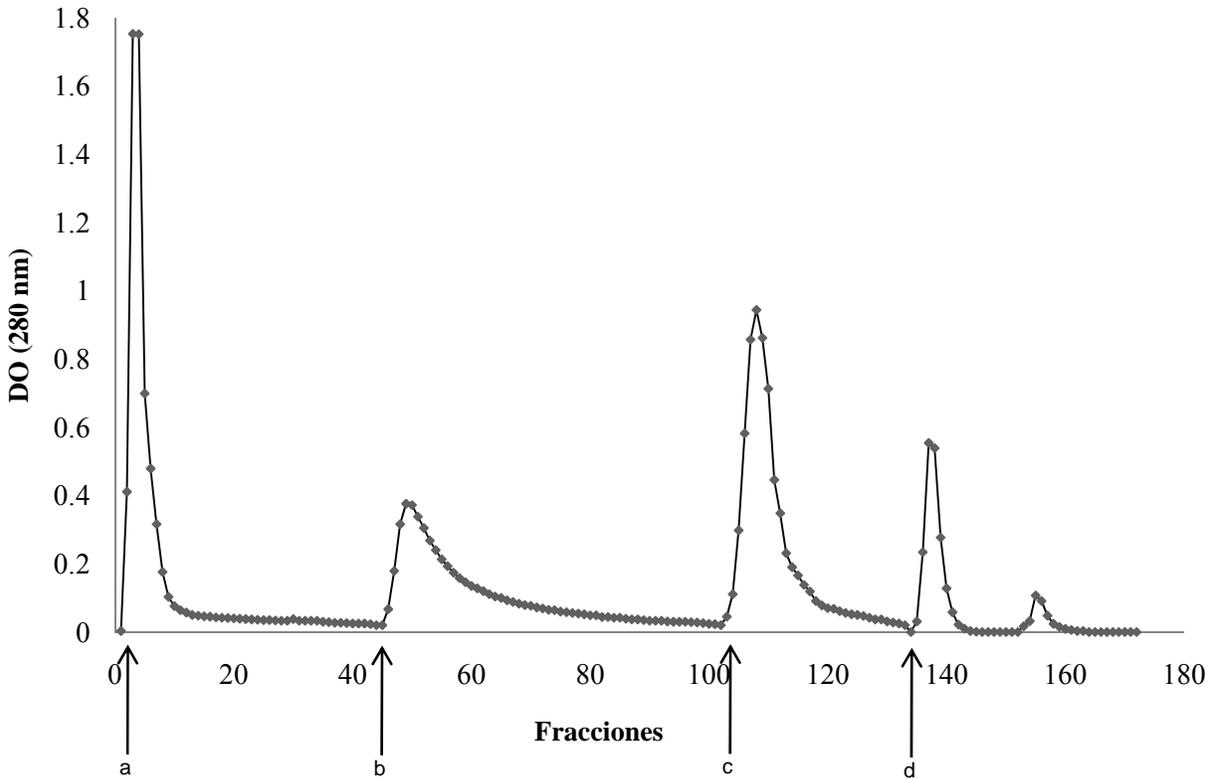


Figura 6. Cromatograma del aislamiento de transferrina sérica por Cromatografía de Afinidad con Metales Inmovilizados (IMAC).

Se cargó 1 mL de suero total a la columna Sefarosa-iminodiacetato-níquel. La solución proteica fue aplicada y lavada con NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 7.6 (a). La primera fracción de elución se obtuvo con NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 6.5 (b), seguida de la segunda fracción de elución con el mismo amortiguador pero a pH de 5.5 (c) y una tercera fracción de elución a pH de 4.0 (d) donde se recuperó a la transferrina sérica.

En la figura 7, se muestran las fracciones del esquema cromatográfico completo, analizadas por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras, y teñidas con azul de Coomassie. La Tf fue aislada con una pureza superior al 85%, en la última fase de la elución cromatográfica (a pH 4.0), en la que se recuperaron en promedio 2.26 mg (\pm 0.66) de proteína por corrida cromatográfica. La masa de la banda correspondiente a la transferrina estimada por SDS-PAGE, fue de 79.5 kDa.

La electrotransferencia de un gel en el que se separaron los componentes de la fracción de elución a pH 4.0, desde 4 hasta 0.625 μ g de proteína, mostró que el antisuero primario IgG anti-Tf humana, detectó específicamente la banda de 79.5 kDa en todos los pozos (ver Figura 8). La banda de 79.5 kDa de un gel homólogo (con aproximadamente 7 μ g de proteína) fue recortada y enviada al Consorcio Proteómico de Arizona, en la Universidad de Arizona, USA, en donde fue digerida e identificada como transferrina sérica (Tf), por LC-MS/MS (del inglés, Liquid Chromatography-Mass Spectrometry).

Lectinoensayos para la Caracterización de la Glicosilación Terminal de Transferrina Sérica

Para estudiar las posibles diferencias en la glicosilación de la Tf, de pacientes diabéticos y de controles, se usaron siete lectinas de origen vegetal con una especificidad conocida a carbohidratos. (De Hoff y col., 2009; Debray y col., 2005; Rüdiger y Gabius, 2001; Sharon y Lis, 2007; Sumar y col., 1990; Turner, 1992)

Los resultados de los ensayos individuales, que se presentan en la Tabla I, mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) exclusivamente en el contenido de α (2-6) ácido siálico de la transferrina sérica de los pacientes diabéticos y los controles.

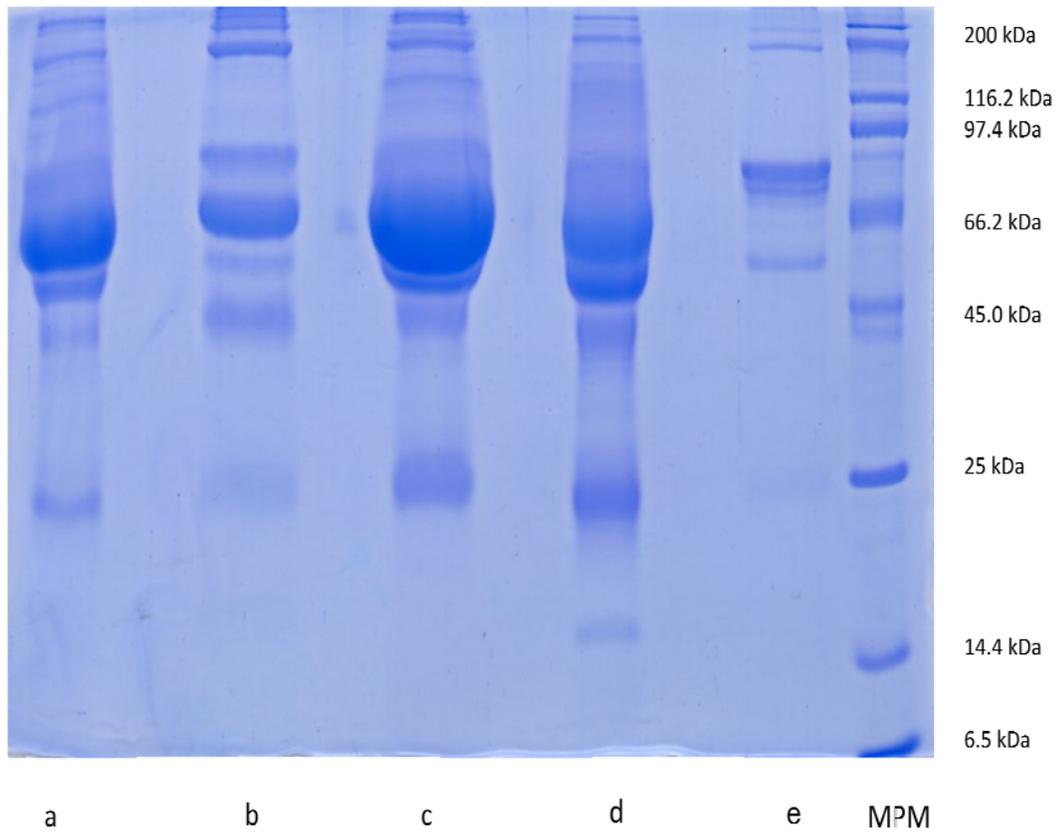


Figura 7. Electroforesis, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, al 12%.

Se muestra el esquema completo de fracciones proteicas obtenidas con la cromatografía con metal inmovilizado. Se muestra el suero total (a), la fracción de lavado con NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 7.6 (b), y las tres fracciones de elución: la elución con NaCl 1 M/MOPS 10 mM, pH 6.5 (c), a pH 5.5 (d), y la fracción a pH 4.0 donde se recupera la fracción de transferrina, 79 kDa (e) y mezcla de proteínas con masa conocida (Broad Range MPM, Bio- ad, USA).

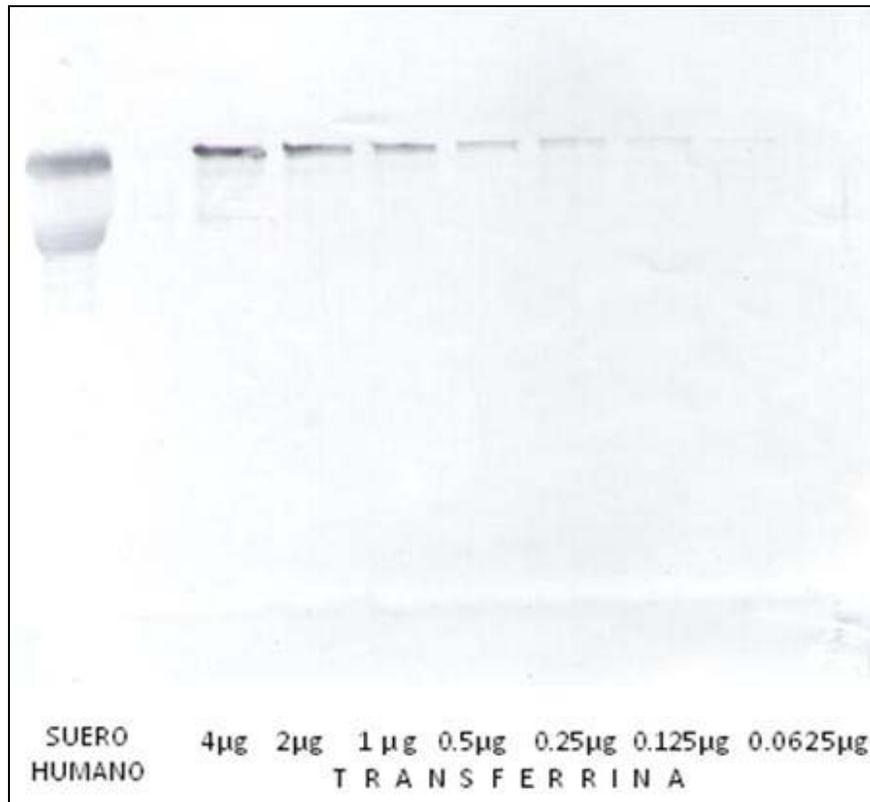


Figura 8. Electrotransferencia de la fracción de elución a pH 4.0, e inmunodetección de la transferrina sérica.

La cantidad de proteína proveniente de la fracción de elución a pH 4.0, fue decreciente (desde 4 μg hasta 0.0625 μg). La banda correspondiente a la transferrina fue inmunodetectada con IgG anti-Tf humana, desarrollado en cabra, usando anti-IgG de cabra marcada con peroxidasa como antisuero secundario y diaminobenzidina como revelador.

Tabla I. Densidad óptica generada por la interacción de las lectinas con la transferrina sérica de los pacientes y los controles.

	Pacientes^a	Controles^b	<i>p</i> < 0.05
SNA	1.60 (\pm 0.05)	1.52 (\pm 0.04)	0.01
MAA	0.11 (\pm 0.004)	0.11 (\pm 0.005)	0.18
ECA	0.09 (\pm 0.01)	0.10 (\pm 0.01)	0.26
PNA	0.06 (\pm 0.004)	0.06 (\pm 0.003)	0.26
WGA	0.53 (\pm 0.09)	0.53 (\pm 0.08)	0.91
Con A	1.61 (\pm 0.04)	1.58 (\pm 0.06)	0.21
LCA	1.04 (\pm 0.06)	1.06 (\pm 0.12)	0.61

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar (DE).

^a Nueve sujetos conformaron este grupo.

^b Siete sujetos conformaron este grupo.

Debido a que SNA es una lectina que reconoce la presencia de ácido siálico $\alpha(2-6)$ ligado a galactosa o a N-acetilgalactosamina en los oligosacáridos N-ligados (Debray y col., 2005; Varki y col., 2009), la mayor interacción entre la Tf de los pacientes y la lectina SNA (ver Figura 9), indica que la Tf de los pacientes tiene mayor contenido de ácido siálico terminal en unión $\alpha(2-6)$, que la Tf de los controles.

Las medias de las absorbancias individuales generadas por la interacción de MAA (que mostraría cambios potenciales en el contenido de ácido siálico ligado en $\alpha(2-3)$ a galactosa), PNA (afín al disacárido Gal $\beta(1-4)$ -GlcNAc, y ECA (que reconoce Gal $\beta(1-3)$ -GalNAc), con la Tf de ambos grupos no fueron estadísticamente diferentes ($p > 0.05$) (Tabla 1). Tampoco se observaron diferencias significativas (Tabla 1) en las señales generadas por la interacción de la Tf de los pacientes y los controles, con la lectina Con A, que presenta un alto grado de afinidad por las oligomanosas de los N-glicanos bi-antenarios de tipo complejo, pero no de los tri o tetra-antenarios; la lectina LCA, que presenta elevada afinidad por el centro quitobiosa fucosilado (Varki y col., 2009), ni con la lectina WGA que presenta afinidad por la N-acetilglucosamina, que se incrementa cuando estos residuos están sialilados (Debray y col., 2005; Wright, 1992). En conjunto, estos resultados sugieren que no hay cambios en la estructura central de los oligosacáridos de la Tf de los pacientes con respecto a la de los controles.

Para conocer el contenido relativo de ácido siálico ligado en $\alpha(2-6)$ y $\alpha(2-3)$ en los oligosacáridos de la Tf de pacientes y controles, se obtuvieron y compararon las relaciones SNA/MAA, SNA/PNA y MAA/PNA (Tabla II). Así, la relación SNA/MAA obtenida con la Tf de los pacientes fue significativamente mayor que la obtenida con la Tf de los controles ($p < 0.05$) (ver Figura 10), mientras que no se detectó una diferencia significativa en las relaciones SNA/PNA y MAA/PNA (Tabla II).

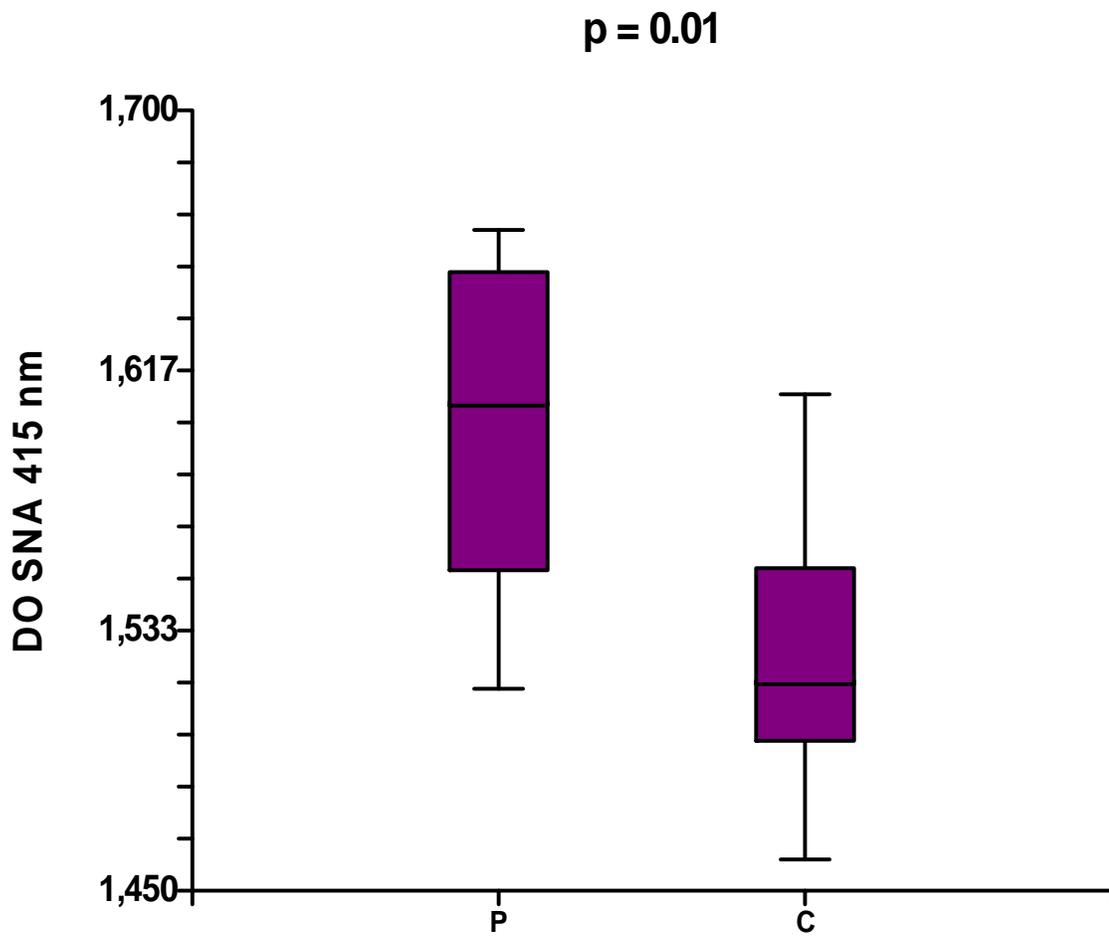


Figura 9. Interacción de la lectina SNA con la transferrina sérica.

La interacción de la SNA con la Tf de pacientes fue significativamente mayor que con la de los controles. La línea central indica la media de cada grupo.

Tabla II. Relaciones de las absorbancias de las lectinas ensayadas con la transferrina sérica.

	Pacientes^a	Controles^b	<i>p</i> < 0.05
SNA/MAA	14.7 (\pm 0.79)	13.6 (\pm 0.72)	0.01
SNA/PNA	24.4 (\pm 1.85)	23.6 (\pm 1.39)	0.40
MAA/PNA	1.66 (\pm 0.06)	1.65 (\pm 0.06)	0.77
ECA/SNA	0.05 (\pm 0.009)	0.06 (\pm 0.01)	0.11
ECA/MAA	0.83 (\pm 0.13)	0.77 (\pm 0.10)	0.36

Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar (DE).

^a Nueve sujetos conformaron este grupo.

^b Siete sujetos conformaron este grupo.

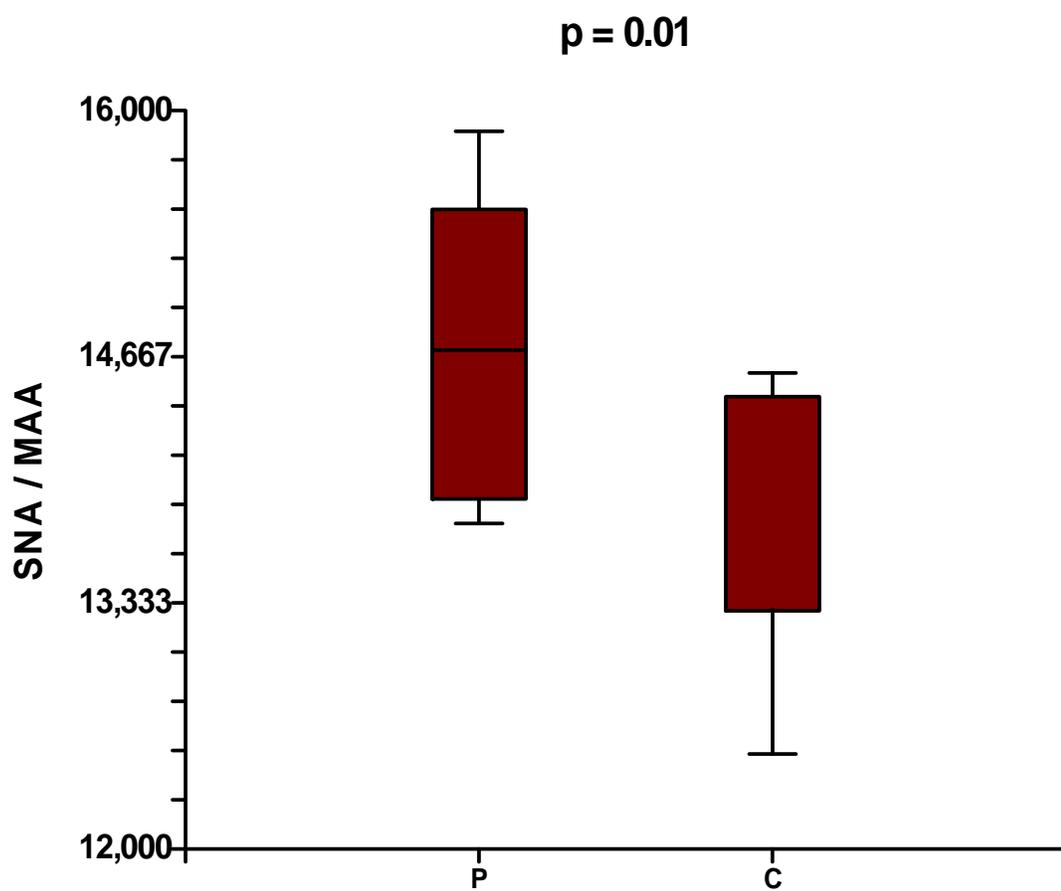


Figura 10. Relación SNA/MAA.

La interacción de SNA con la transferrina sérica de los pacientes diabéticos fue significativamente mayor que con la de los controles. La línea central indica la media de cada grupo.

Estos resultados sugieren que la Tf de los pacientes diabéticos está principalmente conformada por glicoformas altamente sialiladas (Coddeville y col., 1998; Deschamps y col., 2003; Fleming y Mundt, 2004; Gornik y Lauc, 2007; Lacey y col., 2001), en comparación con la Tf de los controles. Se sabe que las glicoformas de la Tf más abundantes en sujetos aparentemente sanos corresponden a la Tf tetrasialilada (Arndt, 2001) con dos sitios de N-glicosilación conservados ocupados por oligosacáridos disialilados (ver Figura 11). Además, no hay una razón para explicar los resultados en función de la disminución de ácido siálico en la Tf de los sujetos controles (euglicémicos, aparentemente sanos), porque no participaron en el estudio personas con patologías asociadas con la prevalencia de isoformas de Tf desialiladas (como el alcoholismo). Por esta razón, es probable que los resultados de los lectinoensayos obedezcan al predominio de glicoformas de Tf hipersialiladas en los pacientes diabéticos (tetra y pentasialotransferrina).

La relación ECA/MAA (Tabla II), no fue significativamente diferente ($p > 0.05$) entre los pacientes y los controles, lo que reafirma la hipótesis de que los cambios de sialilación son atribuibles al aumento del ácido siálico ligado en $\alpha 2-6$ a la Tf de los pacientes con DM2. Además, la relación ECA/SNA no fue significativamente superior en los controles, lo que indica que la cantidad relativa de galactosa expuesta en la Tf de los pacientes es similar a la de los controles y sugiere que la elevada señal originada por la interacción individual de la Tf de los pacientes y la lectina SNA es originada por el aumento de poblaciones de Tf altamente sialiladas.

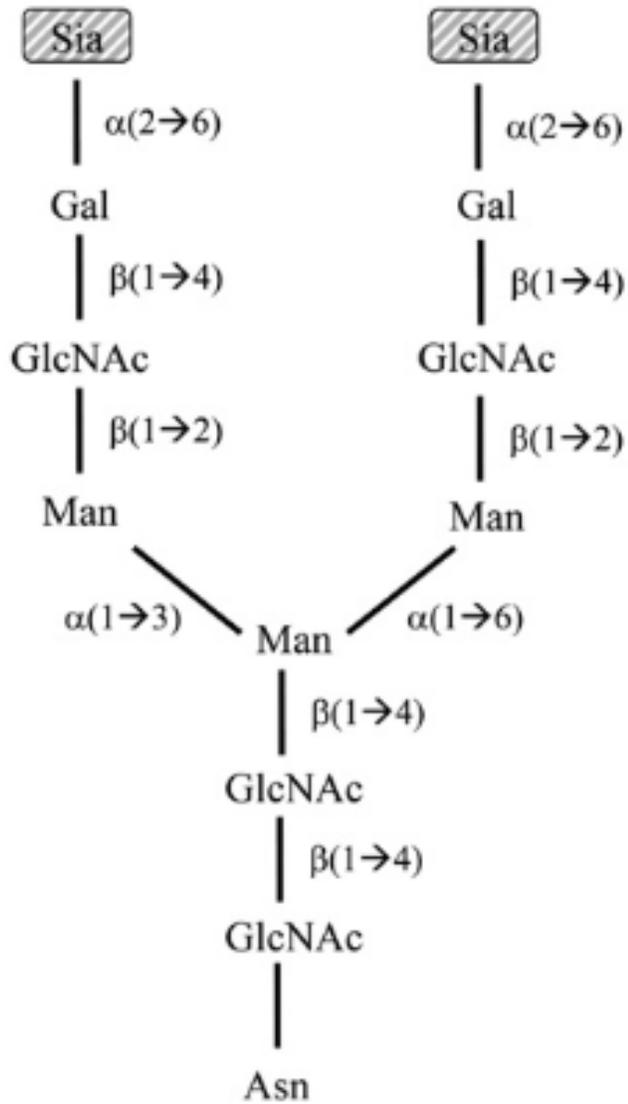


Figura 11. N-oligosacárido biantenarío disialilado de la transferrina sérica.

Se muestra al oligosacárido bi-antenarío más abundante en la transferrina sérica.

Finalmente, es importante destacar que es común observar que la concentración de ácido siálico total sérico se encuentre elevada en los pacientes con cuadros inflamatorios crónicos, enfermedad cardiovascular, tumores, alcoholismo y diabetes mellitus (Crook y col., 1996; Crook y col., 1993a; Festa y col., 2000; Ozben y col., 1995; Schmidt y col., 1999; Sillanaukee y col., 1999). Asimismo, se ha reportado el aumento en la concentración de ácido siálico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con complicaciones microvasculares, en correlación negativa con los niveles de transferrina deficiente en carbohidratos (Cylwik y col., 2006). Por estas razones, en el presente trabajo se determinó y comparó la concentración de ácido siálico total sérico de los pacientes diabéticos con respecto a la de los controles.

Cuantificación de Ácido Siálico Total Sérico

Al comparar los resultados de la estimación colorimétrica del ácido siálico total en ambos grupos, se pudo observar el aumento del ácido siálico sérico en los pacientes con DM2 (ver Tabla III y Figura 12). Esto permite suponer que la hipersialilación de la Tf de los pacientes, contribuye de algún modo a la elevación del ácido siálico total sérico; sin embargo, será necesario comprobar esta hipótesis en un estudio posterior, mediante un diseño pre-experimental *ad hoc*.

Por último, los resultados anteriores permiten descartar la hipótesis de que la hipotransferrinemia de los pacientes con DM2 obedece a la pérdida de ácido siálico terminal y al subsecuente aclaramiento sanguíneo de la proteína. También dejan un campo abierto para la comparación de la Tf sérica y la excretada en orina, ya que se ha comprobado que la carga fuertemente negativa de las moléculas hipersialiladas constituye un impedimento para su excreción urinaria. En consecuencia, es probable que la Tf sérica sea una glicofoma distinta a la urinaria.

Tabla III. Concentración de ácido siálico total sérico en los pacientes y controles incluidos en el estudio.

	Pacientes^a	Controles^b	<i>p</i> < 0.05
Ácido Siálico	74,5 (± 13,31)	41 (± 10,35)	< 0.01

Los valores están expresados como la media (mg/dL) ± desviación estándar (DE).

Valor de referencia normal para el ácido siálico: < 60 mg/dL.

^a Nueve sujetos conforman este grupo.

^b Siete sujetos conforman este grupo.

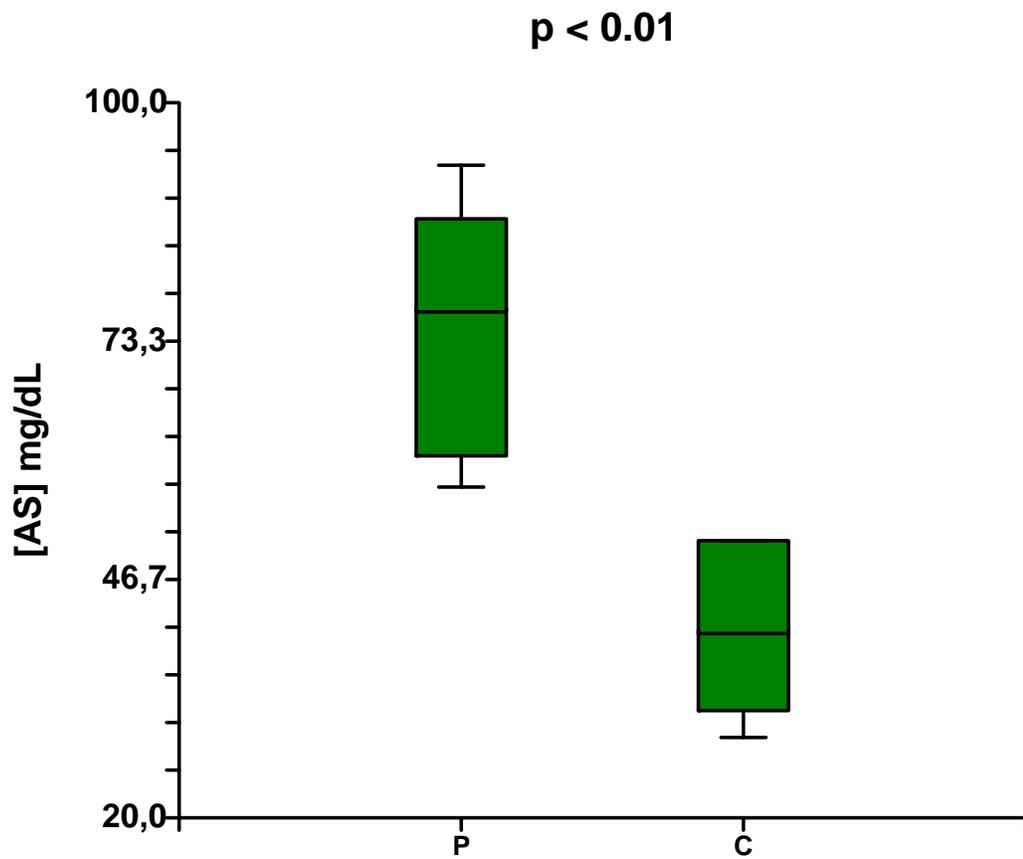


Figura 12. Concentración de ácido siálico total sérico en el grupo de pacientes con DM2 y el grupo de controles.

La media de concentración de ácido siálico en los pacientes diabéticos fue significativamente mayor a la media del grupo control ($p < 0.01$).

CONCLUSIONES

En los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), es común observar la disminución de la concentración de transferrina sérica (Memisogullari y Bakan, 2004; Van Campenhout y col., 2003) así como un incremento en su excreción urinaria (Ghiggeri y col., 1985; Kazumi y col., 1999; Morgan, 1981; Narita y col., 2004; Pérez, 2006). El origen de estos fenómenos es desconocido, pero parte de la explicación podría radicar en los posibles cambios en la glicosilación terminal de la proteína.

En este trabajo se estimaron los cambios en la glicosilación terminal de la transferrina sérica (Tf) de un grupo de pacientes con DM2, con relación a la glicosilación de la Tf de sujetos euglicémicos, aparentemente sanos (grupo control). Los resultados de los ensayos de afinidad a lectinas realizados para estimar tales diferencias, indicaron que la Tf de los pacientes está hipersialilada a expensas del predominio de glicofomas tetra y pentasialiladas. La hipersialilación de la Tf sugiere que el aumento del aclaramiento hepático de la molécula no es la causa de la reducción en su concentración plasmática. También sugiere que la Tf que se excreta por la orina es una glicofoma distinta a la sérica hipersialilada.

Finalmente, en el grupo de los pacientes también se demostró la elevación de la concentración sérica de ácido siálico total, lo que sugiere que la hipersialilación de la Tf de los pacientes, podría contribuir a la elevación del ácido siálico total sérico; será necesario comprobar esta hipótesis en un estudio posterior, mediante un diseño pre-experimental *ad hoc*.

REFERENCIAS

ADA. (2010). American Diabetes Association. 2010, recuperado el 10 de diciembre de 2010, de <http://www.diabetes.org/>.

Ahmed, N. 2005. Advanced glycation endproducts: role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67(1): 3-21.

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

Aitman, T., Todd, J. 1995. Molecular genetics of diabetes mellitus. *Baillière's clinical endocrinology and metabolism*, 9(3): 631-656.

Alberti, K., Zimmet, P., Consultation, W. 1998. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, 15(7): 539-553.

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

Arefanian, H., Djalali, M. 2002. A New Protocol for Isolation and Purification of Transferrin from Human Serum. *Iranian Journal of Public Health*, 31(1-2): 15-18.

Arndt, T. 2001. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical Chemistry*, 47(1): 13-27.

Arnold, J.N., Saldova, R., Hamid, U.M., Rudd, P.M. 2008. Evaluation of the serum N linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics*, 8(16): 3284-3293.

Arnold, J.N., Wormald, M.R., Sim, R.B., Rudd, P.M., Dwek, R.A. 2007. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annual Review of Immunology*, 25: 21-50.

Baker, E.N., Anderson, B.F., Baker, H.M., Haridas, M., Norris, G.E., Rumball, S.V., Smith, C.A. 1990. Metal and anion binding sites in lactoferrin and related proteins. *Pure Applied Chemistry*, 62(6): 1067-1070.

Berliner, J., Navab, M., Fogelman, A., Frank, J., Demer, L., Edwards, P., Watson, A., Lusis, A. 1995. Atherosclerosis: basic mechanisms: oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*, 91(9): 2488-2496.

Bernadette, F. 2007. Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas. Medica Panamericana (2a Ed), p. 117-124. Buenos Aires.

Campbell, B.J., Yu, L.G., Rhodes, J.M. 2001. Altered glycosylation in inflammatory bowel disease: a possible role in cancer development. *Glycoconjugate Journal*, 18(11): 851-858.

Carchon, H., Chevigne, R., Falmagne, J., Jaeken, J. 2004. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin. *Clinical Chemistry*, 50(1): 101-111.

Cecilian, F., Pocacqua, V. 2007. The Acute Phase Protein 1-Acid Glycoprotein: A Model for Altered Glycosylation During Diseases. *Current Protein and Peptide Science*, 8(1): 91-108.

Coddeville, B., Carchon, H., Jaeken, J., Briand, G., Spik, G. 1998. Determination of glycan structures and molecular masses of the glycovariants of serum transferrin from a patient with carbohydrate deficient syndrome type II. *Glycoconjugate Journal*, 15(3): 265-273.

Crichton, R.R., Wilmet, S., Legssyer, R., Ward, R.J. 2002. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic biochemistry*, 91(1): 9-18.

Crook, M., Couchman, S., Tutt, P. 1996. Plasma fibrinogen and its relationship to plasma sialic acid in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 7(6): 586-589.

Crook, M., Tutt, P., Pickup, J. 1993. Elevated serum sialic acid concentration in NIDDM and its relationship to blood pressure and retinopathy. *Diabetes Care*, 16(1): 57-60.

Crook, M., Tutt, P., Simpson, H., Pickup, J. 1993. Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta*, 219(1-2): 131-138.

Cylwik, B., Chrostek, L., Jakimiuk, B., Popławska, A., Szmitkowski, M. 2006. Serum level of sialic acid (SA) and carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in type 2 diabetes mellitus with microvascular complications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 20(2): 68-73.

Dabelea, D., Hanson, R., Bennett, P., Roumain, J., Knowler, W., Pettitt, D. 1998. Increasing prevalence of type II diabetes in American Indian children. *Diabetologia*, 41(8): 904-910.

Davidson, M. 1995. Clinical implications of insulin resistance syndromes. *The American Journal of Medicine*, 99(4): 420-426.

- De Hoff, P., Brill, L., Hirsch, A. 2009. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular Genetics and Genomics*, 282(1): 1-15.
- Debray, H., Decout, D., Strecker, G., Spik, G., Montreuil, J. 2005. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *European Journal of Biochemistry*, 117(1): 41-51.
- Deschamps, E.M., Miña, A., Diéguez, M. 2003. Isoformas de la transferrina: Utilidad clínica de su determinación. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 52: 35-39.
- Esper, R., Vilariño, J., Machado, R., Paragano, A. 2008. Endothelial dysfunction in normal and abnormal glucose metabolism. *Cardiovascular Diabetology*, 45(5): 17-43.
- Festa, A., D'agostino, R., Howard, G., Mykkänen, L., Tracy, R.P., Haffner, S.M. 2000. Inflammation and microalbuminuria in nondiabetic and type 2 diabetic subjects: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Kidney International*, 58(4): 1703-1710.
- Fleming, M., Mundt, M. 2004. Carbohydrate-deficient transferrin: validity of a new alcohol biomarker in a sample of patients with diabetes and hypertension. *Journal of the American Board of Family Medicine*, 17(4): 247-255.
- Fujimoto, S., Kawakami, N., Ohara, A. 1995. Nonenzymatic glycation of transferrin: decrease of iron-binding capacity and increase of oxygen radical production. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(3): 396-400.
- Fujimoto, W.Y., Bergstrom, R.W., Boyko, E.J., Leonetti, D.L., Newell-Morris, L.L., Wahl, P.W. 1995. Susceptibility to development of central adiposity among populations. *Obesity Research*, 3(2): 179-186.
- Fumeron, F., Péan, F., Driss, F., Balkau, B., Tichet, J., Marre, M., Grandchamp, B. 2006. Ferritin and transferrin are both predictive of the onset of hyperglycemia in men and women over 3 years. *Diabetes Care*, 29(9): 2090-2094.

Ghiggeri, G.M., Candiano, G., Delfino, G., Queirolo, C. 1985. Electrical charge of serum and urinary albumin in normal and diabetic humans. *Kidney International*, 28(2): 168-177.

Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*, 19(3): 257-267.

Gomme, P., McCann, K., Bertolini, J. 2005. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discovery Today*, 10(4): 267-273.

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

Guyton, A.C. y Hall, J.E. 2006. Tratado de Fisiología Médica. Elsevier (11a Ed), p. 425. Madrid, España.

Gornik, O., Lauc, G. 2007. Enzyme linked lectin assay (ELLA) for direct analysis of transferrin sialylation in serum samples. *Clinical Biochemistry*, 40(9-10): 718-723.

Hansen, J.E., Lund, O., Rapacki, K., Clausen, H., Mosekilde, E., Nielsen, J.O., Hansen, J.S. 1994. Glycosylation and Protein Conformation. *Protein Structure by Distance Analysis*: 247-254.

Hanson, R.L., Imperatore, G., Bennett, P.H., Knowler, W.C. 2002. Components of the “metabolic syndrome” and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes*, 51(10): 3120-3127.

Hanson, R.L., Pettitt, D.J., Bennett, P.H., Narayan, K.M., Fernandes, R., de Courten, M., Knowler, W.C. 1995. Familial relationships between obesity and NIDDM. *Diabetes*, 44(4): 418-422.

Heilbronn, L., Smith, S., Ravussin, E. 2004. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *International Journal of Obesity*, 28(1): 12-21.

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.

Hintze, J. 2001. NCSS 2001. *Number Cruncher Statistical Systems*. Kayville, Utah.

Jong, G., Feelders, R., Noort, W., Eijk, H. 1995. Transferrin microheterogeneity as a probe in normal and disease states. *Glycoconjugate Journal*, 12(3): 219-226.

Kanwar, Y.S., Wada, J., Sun, L., Xie, P., Wallner, E.I., Chen, S., Chugh, S., Danesh, F.R. 2008. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. *Experimental Biology and Medicine*, 233(1): 4-11.

Kazumi, T., Hozumi, T., Ishida, Y., Ikeda, Y., Kishi, K., Hayakawa, M., Yoshino, G. 1999. Increased urinary transferrin excretion predicts microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 22(7): 1176-1180.

Kemp, S.F., Creech, R.H., Horn, T.R. 1984. Glycosylated Albumin and Transferrin - Short-Term Markers of Blood-Glucose Control. *Journal of Pediatrics*, 105(3): 394-398.

Klein, R. 1995. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care*, 18(2): 258-268.

Klemm, T., Paschke, R. 2000. Mögliche genetische Ursachen für Spätkomplikationen des Diabetes mellitus. *Medizinische Klinik*, 95(1): 31-39.

Laakso, M. 1999. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*, 48(5): 937-942.

Laakso, M. 2001. Cardiovascular disease in type 2 diabetes: challenge for treatment and prevention. *Journal of Internal Medicine*, 249(3): 225-235.

Lacey, J., Bergen, H., Magera, M., Naylor, S., O'Brien, J. 2001. Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 47(3): 513-518.

Laemmli, V. 1970. Determination of protein molecular weight in polyacrylamide gels. *Nature*, 227: 680-685.

Lourin, O., Mattu, T.S., Mian, N., Keir, G., Winchester, B., Dwek, R.A., Rudd, P.M. 1996. The identification of abnormal glycoforms of serum transferrin in carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type I by capillary zone electrophoresis. *Glycoconjugate Journal*, 13(6): 1031-1042.

OMS. (2010). Organización Mundial de la Salud. 2010, recuperado el 10 de diciembre e 2010, de <http://www.who.int/es/>

Mårtensson, O., Härlin, A., Brandt, R., Seppä, K., Sillanaukee, P. 1997. Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(9): 1710-1715.

Martínez-Duncker, I., Palomares-Aguilera, L., Sánchez-Francia, D., Mollicone, R., Ibarra-González, I. 2008. Trastornos congénitos de la glicosilación: abordaje clínico y de laboratorio. *Acta Pediátrica de México*, 29(2): 78-88.

McCance, D., Dyer, D., Dunn, J., Bailie, K., Thorpe, S., Baynes, J., Lyons, T. 1993. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 91(6): 2470-2478.

Mckenzie, S.B. 2000. Hematología Clínica. Editorial El Manual Moderno (2a Ed), p. 147-162. México.

McNaught, A., Wilkinson, A. 1997. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Blackwell Scientific Publications (2a Ed), p. 86. Oxford.

Memisogullari, R., Bakan, E. 2004. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*, 18(4): 193-197.

Memisogullari, R., Taysi, S., Bakan, E., Capoglu, I. 2003. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochemistry and Function*, 21(3): 291-296.

Morgan, E. 1981. Transferrin, biochemistry, physiology and clinical significance. *Molecular Aspects of Medicine*, 4(1): 1-123.

Murakami, T., Shima, K. 1995. Diabetogenes; which cause type II diabetes mellitus. *Rinsho Byori / The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 43(8): 781-785.

Narita, T., Sasaki, H., Hosoba, M., Miura, T., Yoshioka, N., Morii, T., Shimotomai, T., Koshimura, J., Fujita, H., Kakei, M. 2004. Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, 27(5): 1176-1181.

Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., McCarthy, S., Betteridge, D., Wolff, S. 1995. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*, 44(9): 1054-1058.

O'Donnell, M., Martin, P., Florkowski, C., Toop, M., Chapman, C., Holder, R., Barnett, A. 1991. Urinary transferrin excretion in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetic Medicine*, 8(7): 657-661.

Orntoft, T.F., Vestergaard, E.M. 1999. Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis*, 20(2): 362-371.

- Ozben, T., Nacitarhan, S., Tuncer, N. 1995. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Annals of Clinical Biochemistry*, 32(3): 303-306.
- Pagano, M., Gauvreau, K. 2001. Fundamentos de Bioestadística (2a Ed), p. 259-284. Thomson Learning. México.
- Pérez, J. 2006. Manual de Patología General. Elsevier (6a Ed), p. 402-404. Barcelona, España.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, 258(5536): 598-599.
- Porath, J. 1988. IMAC--Immobilized metal ion affinity based chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 7(7): 254-259.
- Quinn, L. 2001. Type 2 diabetes: epidemiology, pathophysiology, and diagnosis. *Nursing Clinics of North America*, 36(2): 175-192.
- Ritchie, R., Palomaki, G., Neveux, L., Navolotskaia, O., Ledue, T., Craig, W. 1999. Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 13(6): 273-279.
- Rüdiger, H., Gabius, H. 2001. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*, 18(8): 589-613.
- Sanz-Nebot, V., Gonzalez, P., Toro, I., Ribes, A., Barbosa, J. 2003. Characterization of human transferrin glycoforms by capillary electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 798(1): 1-7.
- Schmidt, M.I., Duncan, B.B., Sharrett, A.R., Lindberg, G., Savage, P.J., Offenbacher, S., Azambuja, M.I., Tracy, R.P., Heiss, G. 1999. Markers of inflammation and prediction of

diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *The Lancet*, 353(9165): 1649-1652.

Schulz, L., Bennett, P., Ravussin, E., Kidd, J., Kidd, K., Esparza, J., Valencia, J. 2006. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the US. *Diabetes Care*, 29(8): 1866-1871.

Sharon, N., Lis, H. 2007. Lectins. Springer (2a Ed), p. 63-103. Dordrecht, The Netherlands.

Sillanaukee, P., Ponnio, M., Jaaskelainen, I. 1999. Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *European Journal of Clinical Investigation*, 29(5): 413-425.

Sönmez, H., Öztürk, Z., Ulutin, T., Domaniç, N., Kökolu, E. 2000. Carbohydrate-deficient transferrin and sialidase levels in coronary heart disease. *Thrombosis Research*, 99(4): 311-315.

Stibler, H. 1991. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clinical Chemistry*, 37(12): 2029-2037.

Stibler, H., Allgulander, C., Borg, S., Kjellin, K. 1978. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Medica Scandinavica*, 204(16): 49-56.

Stibler, H., Borg, S., Allgulander, C. 1979. Clinical significance of abnormal heterogeneity of transferrin in relation to alcohol consumption. *Acta Medica Scandinavica*, 206(16): 275-281.

Stoscheck, C. M. 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.
- Thomas, M., MacIsaac, R., Tsalamandris, C., Jerums, G. 2004. Elevated iron indices in patients with diabetes. *Diabetic Medicine*, 21(7): 798-802.
- Tortora, G., Grabowski, S. 2002. Principios de Anatomía y Fisiología. Oxford (9a Ed), p. 624-625. México.
- Turner, G. 1992. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clinica Chimica Acta*, 208(3): 149-171.
- Van Campenhout, A., Van Campenhout, C., Lagrou, A., Manuel-y-Keenoy, B. 2003. Transferrin modifications and lipid peroxidation: implications in diabetes mellitus. *Free Radical Research*, 37(10): 1069-1077.
- Van Dam, P., Gispen, W., Bravenboer, B., Van Asbeck, B., Erkelens, D., Marx, J. 1995. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes/Metabolism Reviews*, 11(3): 181-192.
- Van Noort, W., De Jong, G., Van Eijk, H. 1994. Purification of isotransferrins by concanavalin A Sepharose chromatography and preparative isoelectric focusing. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 32(12): 885-892.
- Van Rensburg, S., Berman, P., Potocnik, F., Taljaard, J. 2000. Glycosylation of transferrin in Alzheimer's disease and alcohol-induced dementia. *Metabolic Brain Disease*, 15(4): 243-247.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Stanley, P., Bertozzi, C., Hart, G., Etzler, M. 2009. Essentials of glycobiology. CSH Press (2a Ed), p. 1919-1921. La Jolla, CA.

Vázquez-Martínez, J. L., Gómez-Dantés, H., Fernández-Cantón, S. 2006. Diabetes mellitus en población adulta del IMSS. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 44(1): 13-26.

Vázquez-Moreno, L., Candia-Plata, M. 1996. Scale up isolation of immunoglobulins from pig serum by immobilized metal affinity chromatography. *Journal of Food Biochemistry*, 19(5): 367-380.

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.

Vivekanadan-Giri, A., Wang, J., Byun, J., Pennathur, S. 2008. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products identifies oxidative mechanisms of diabetic end-organ damage. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 9(4): 275-287.

Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. 2007. Fundamentos de Bioquímica: la vida a nivel molecular. Médica Panamericana, (2a Ed), p: 206-231. Buenos Aires.

WHO. (2010). World Health Organization. 2010, recuperado el 10 de diciembre de 2010, de <http://www.who.int/en/>

Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., King, H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27(10): 2569.

Wolff, S., Jiang, Z., Hunt, J. 1991. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, 10(5): 339-352.

Worthley, D., Harvey, N., Hill, N., Walsh, R., Edwards, J., Roberts, A. 2001. Urinary transferrin and albumin concentrations in patients with type 1 diabetes and normal controls: the search for the first protein lost. *Clinical Biochemistry-New York*, 34(1): 83-86.

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): 14345-14352.

Wuyts, B., Delanghe, J.R., Kasvosve, I., Wauters, A., Neels, H., Janssens, J. 2001. Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis. *Clinical Chemistry*, 47(2): 247-255.

Zimmet, P. 2000. Prevalence and risk factors in diabetes and its complications. *Journal of the Japan Diabetic Society*, 43(5): 46.