

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.



CCARACTERIZACIÓN DE LOS OLIGOSÁCARIDOS DEL Fc DE LA IgA1 SÉRICA DE PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

POR

MARIA DEL CARMEN CANDIA PLATA

TESIS APROBADA POR LA

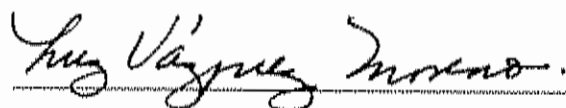
DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

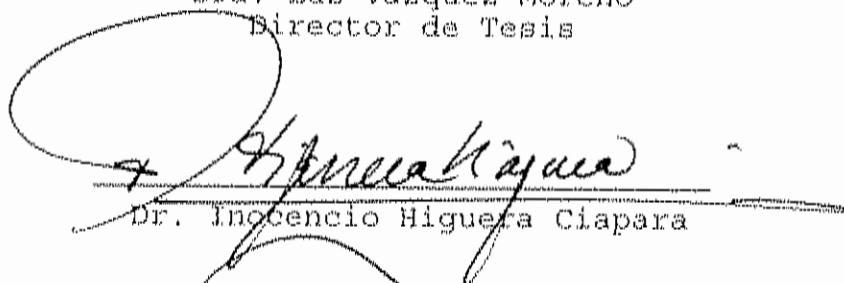
DOCTORADO EN CIENCIAS

APROBACION

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Maestra en Ciencias María del Carmen Candia Plata, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.



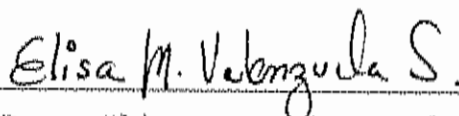
Dra. Luz Vázquez Moreno
Director de Tesis



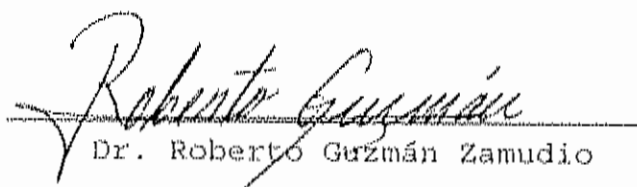
Dr. Inocencio Higuera Ciapara



Dr. Mauro E. Valencia Juillerat



Dra. Elisa M. Valenzuela Soto

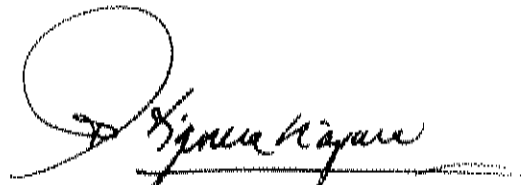


Dr. Roberto Guzmán Zamudio

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Inocencio Higuera Ciapara
Director General

UNIVERSIDAD DE SONORA
CIENCIA Y TECNOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DEL ALIMENTO
TAPATZÁN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y al Sindicato de Trabajadores Académicos de la Universidad de Sonora, el apoyo que me brindaron para participar en el Programa de Doctorado en Ciencias del CIAD, A.C.

Con profunda y reiterada admiración, agradezco la dirección y asesoría de este trabajo de tesis doctoral y el apoyo personal de la Dra. Luz Vázquez Moreno.

Asimismo, expreso mi gratitud al Dr. Mauro E. Valencia Juillerat por su invaluable asesoría. Reconozco también el apoyo e interés, hacia este trabajo, de los Doctores: Inocencio Higuera Ciapara, Elisa Valenzuela, Roberto Z. Guzmán y Juan Pedro Camou Arriola.

Agradezco de manera muy especial a la M. en C. Ana María Guzmán Partida, al Dr. Gerardo Alvarez Manilla y a la M. en C. María del Refugio Robles Burgueño por su disposición para discutir conceptos y compartir sus conocimientos.

Agradezco también, al personal y estudiantes de la Dirección de Ciencia de los Alimentos y de la Dirección de Tecnología de Alimentos Vegetales, especialmente a Marisa y a Pame, y al personal del Centro de Cómputo, todo su apoyo antes, durante y después de la realización de esta tesis doctoral.

Finalmente, doy las gracias por su apoyo e incommensurable paciencia y amor a mis queridos hijos, Paola y Sergio y a mi amado esposo Sergio Gutiérrez López.

DEDICATORIA

Con profundo amor, a mis hijos Paola y Sergio y a mi querido esposo Sergio Gutiérrez López, quienes han sido mi estandarte y un estímulo de superación constante.



CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
Epidemiología de la Diabetes Mellitus tipo 2....	4
Aspectos Clínicos Generales de la Diabetes Mellitus Tipo 2	5
Relación Entre la Inmunoglobulina A y la Diabetes Mellitus Tipo 2	7
Estructura y Función Normal de la Inmunoglobulina A1 (IgA1)	11
El Aumento de la IgA1 Puede ser Consecuencia de Cambios en los Oligosacáridos de la Proteína....	23
METODOLOGÍA	25
Sujetos	25
Cuantificación de la IgA1 Sérica	26
Purificación de la Inmunoglobulina A1 (IgA1).....	28
Cuantificación de Proteínas y Determinación de la Pureza	32
Obtención de Fragmentos Cristalizables de IgA1 ..	33
Obtención de Fragmentos Bisagra de IgA1.....	34
Ensayos de Inhibición de la Interacción IgA1 nativa-jacalina	35
Análisis de los Oligosacáridos de la IgA1	35

RESULTADOS	39
Concentración de la IgA1 Sérica	39
Purificación de la IgA1	39
Ensayos de Inhibición con Galactosa	46
Ensayos de Manchas	49
Lectinoimmunoensayos con la IgA1 Nativa.....	49
Lectinoimmunoensayos con los Fragmentos Bisagra y Cristalizable	53
DISCUSIÓN	64
CONCLUSIONES	76
REFERENCIAS	78
ARTICULO PUBLICADO	96

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Representación esquemática de la IgA1 humana monomérica	13
2.	Representación de la digestión enzimática de la IgA1 monomérica humana.....	14
3.	Estructura de la región bisagra de la IgA1 humana	15
4.	Estructura de los O-oligosacáridos de la región bisagra de la IgA1	17
5.	Los N-oligosacáridos están ligados a las Asn-263 y Asn-459 del Fc de la IgA1	18
6.	El 85% de los N-oligosacáridos de la IgA1 humana son biantenarios	19
7.	El 13% de los N-glicanos son tri y tetra-antenarios	20
8.	Polímeros de IgA1 en electroforesis nativa..	22
9.	Niveles de IgA1 sérica total en los dos grupos de estudio	40
10.	Aislamiento de inmunoglobulinas humanas séricas, en Sefarosa-6B altamente acetilada.	41
11.	Aislamiento de IgA en Agarosa-anti-IgA	43
12.	Purificación de la IgA1 sérica con Agarosa-jacalina	44
13.	SDS-PAGE al 12.5% de la IgA1 pura	45
14.	Electroforesis nativa (4-15%), de las tres fracciones de IgA1	47
15.	Inhibición de la interacción IgA1-jacalina .	48
16.	Ensayos de manchas con la IgA1 de alta afinidad a jacalina	50

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Página
17. Interacción entre las IgA1 de los pacientes y once lectinas vegetales	51
18. Interacción entre las IgA1 de los controles y once lectinas vegetales	52
19. Interacción de la lectina SNA con las tres fracciones de IgA1	54
20. Interacción de la lectina LcH con las tres fracciones de IgA1	55
21. Interacción de SNA con la IgA1 macromolecular de los pacientes y los controles	56
22. Influencia de la interacción SNA-IgA1 macromolecular, sobre las relaciones RCAI/SNA, RCAI/MMA, ECA/SNA Y ECA/MMA	58
23. Las relaciones LcH/AAA y WGA/SNA fueron menores con la IgA1 macromolecular de los pacientes ...	59
24. Las relaciones SNA/PNA y SNA/MMA fueron mayores con los Fc de la IgA1 macromolecular de los pacientes	61

LISTA DE TABLAS

Relaciones de absor-
bancia de las lectinas
con la IgA1 macromole-
cular nativa

Tabla	Página
1. Relaciones de absorban- cia de las lectinas ensayadas, con la IgA1 macromole- cular nativa	57
2. Relaciones de absorban- cia de las lectinas con los Fc de la IgA1 macromole- cular	62
3. Relaciones de absorban- cia de las lectinas con los fragmentos bisagra de la IgA1 macromole- cular	63

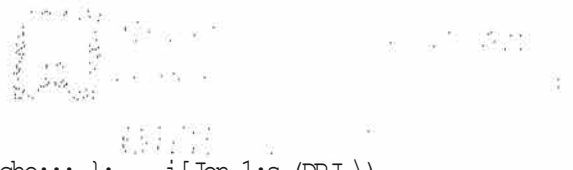
RESUMEN

Diversos estudios, han demostrado que los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) tienen una concentración de IgA sérica elevada y que, el aumento paralelo de la subclase IgA1, en ausencia de infecciones o de complicaciones vasculares, es parte de la anormalidad. Este trabajo, se realizó con el fin de buscar diferencias en los oligosacáridos de la IgA1 de pacientes con DM2, con respecto a un grupo de personas sanas del mismo sexo y edad, como la causa probable de la elevación de la IgA1 sérica.

Se cuantificaron los niveles de la IgA1 sérica en dos grupos de individuos, 23 pacientes con DM2 y 23 controles; en los pacientes, los niveles de IgA1 sérica fueron significativamente más altos que en los controles.

La IgA1, del suero de un subgrupo de cuatro individuos sanos y seis pacientes diabéticos, fue purificada en tres pasos usando Sefarosa-6B altamente acetilada, Agarosa-anti-IgA y Agarosa-jacalina. La IgA1, fue posteriormente separada en fracciones, de baja, intermedia y alta afinidad a jacalina. La fracción de alta afinidad de los pacientes fue significativamente mayor que la de los controles, representando hasta el 25% de la proteína total.

La IgA1 nativa, de pacientes y controles, fue enzimáticamente digerida y se obtuvieron los fragmentos cristalizables (Fc) y bisagra. Las diferencias en los oligosacáridos de la IgA1 nativa, los Fc y los fragmentos bisagra, fueron evaluadas con ensayos de afinidad por las lectinas Dolichos biflorus (DBA), Arachis hypogaea (PNA), Erythrina cristagalli (Eca), Lens culinaris (Lch), Anguilla anguilla (AAA), Triticum vulgare (WGA), Sambucus nigra (SNA), Canavalia ensiformis (ConA), Maackia amurensis (MMA), Ricinus communis I (RCAI) y Glicine max (SBA).



,,lfJn.Ldad pc,r .lm lectinas Uo.l..l.cho::; }:,...i[Jon.l:s (DBJ-\),
 A.rachi.s hy;::>09aea (PNA), /i,'ryt.Ju: J.næricJt:::a,Ja.Jj_ (E:cAI, .Lens
 cu..l..inaJ:->.ia (LcH), Anguilla anqu.i..l..l.a (!'.l.\Ai, I'.r.f.i:,cum
 vuJ.gad's (VW), Samhl.ICL./i rli.ora (:",NA), Car,,;iva.l..i.a
 ns l...oJMI's (Con.l\), /-1,icd; ,r lmu.J,"ens.l..l(JJ'.IJA.,l,l .ic')nu:.,;
 commun.i.s .r (PJAJJ y GJc.in<,! m;ix (:313A.),

Los resultados obtenidos con las lectinas SNA, MMA,
 J:cA, RCAJ y PNA (i.e.h,:::J.onel'SNA/ PN/-). SNll/MMA., MMA/ /:"NA,
 l<.CAL/:3t-J/\y. E:cA/SNl\ rev;il,n'on que la Jq!\J. nal::i.v,;do ali:.,,
 afinidad a jacalina de los pacientes tiene un aumento
 i.i.qn.f..kat:Ivo de Ac:tdo :::l:l.hlto, pl:J.nc:ipa l.mrc;nc a
 expeilsas de ácj,do siálj,co a2-6, con respecto a Ja lgAl
 rlatj_ va de los stijetos corltrol.es. Los mismos resultados
 fueroll o!Jtellidos cualldo se eilsay6 Ja afinidad de Jas F'c
 pol: las lecl:inas; el patr6r1 de j_llteraccJ.611 coll]as
 .l.r.' .Ct.:LnS.H, AJ-\l\y J. cl\,su.q:i.r.i./);:-ldemAs m:ino r qracl.i.'c/l,,:
 fucosilación de los centros quitobiosa de los Fc
 dtr,Jn.i.do:i ,:,pal:t.i.r.de) la ll^A] nativa l\lac.i:-oml,;,CIJld.ri:Jc,i
 Jos pacJ.entes dJ.alJéticos;

Los análisis de afinid,Jd c()u Jo,, fragmentos
 }JIsaqa i.ndj_caron que en es:l:a regi,ói:l de Ja IgAJ
 nlcro!rtolecLlJ.ar de los pacierltes d.i.alJéticos l'lay, t:alllbJ.é'l'l,
 un ma.yor 9tado dil :::l:al.i..l.a.c.J.ón Y(::,;pec:to a lc:::l:l:i';JAl
 milcromo.i}Clll tY- df;:!!os contr'oJ.es. :::;J_rel.n.barqQ, i:io l'1Ubc>
 dJfel:'encJas s.i..9n.i:f:l.cat:::i.vai;: nLé.i:nlinos el(:) C()J'Jl'::f;:n.i..'('lo
 t:l ;lativcl;ij i<tár:Josiá.l..i:o; J..i.9ado ,., rnx2-J y <:l.:?~6d mo;g
 o oligosacbridos,

E:5t(:::is rr);l:lultados, confirJtitQl"lque la fracc..l.ón de
 alta afinidad a jacalina, constituida princl.palmente por
 :rj';: _Alac,:r()molt: cl.l,lari:0, más abund.i:ntl en J.n::,il:::ir:::lc.J.c7l .itr:::.;;
 dialJéticos qJJe en Jos collttoJ.es, Asi,illj,sn10, sehala1 01:l qJJe

la IgA sérica macromolecular elevada, los picos de IgA con DM> t, y t/Jbip<cr, i., y ll.lada en n2-6 y ti.en, un contenido menor de fucosa en el centro quitob:Lo:;a de los N-oligosacáridos.

Sobre la base de que la hiperselectividad de las glicoproteínas séricas impiden su aclaramiento hepático, la disminución de la actividad de la IgA en la diabetes mellitus, no se puede suponer que la acción de la IgA patológica contribuya al aumento de los niveles plasmáticos de IgA, \ :q/\l tc.'ital; deb Jdo J_.l:'(l.);,;b, en:frnti.) a:3: nr:/Ur:einoc.ión pla.: l:n;- ll:..i.c:..i.

INTRODUCCION

Uno de los grandes retos que enfrentan las ciencias biomédicas contemporáneas, es la caracterización integral de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), un síndrome plurimetabólico crónico que afecta a más de 142 millones de adultos en edad productiva a escala mundial (King et al, 1998), y que genera cada día tasas más elevadas de invalidez y muerte (The DCCT Research Group, 1993; ADA, 1996; Bloomgarden, 1997; Bloomgarden, 1998). En México, la prevalencia de DM2 es una de las más altas del mundo (noveno lugar; González-Villalpando et al, 1994; King et al, 1998) y los índices de morbilidad y mortalidad, asociados a las complicaciones vasculares de la DM2, solamente son menores que los de Trinidad y Tobago (ADA, 1996; SSA, 1997).

La evolución clínica de la DM2, se caracteriza por la aparición insidiosa de cambios bioquímicos y metabólicos que, hasta ahora, se conocen solo parcialmente. La elevación de la inmunoglobulina A (IgA) sérica (Gill et al, 1981; Ardawi et al, 1994; Eguchi et al, 1995; Rodríguez-Segade et al, 1996), es uno de los cambios bioquímicos tempranos de la DM2 del que se conoce muy poco. En el suero de los pacientes diabéticos, puede haber aumento de IgA monomérica, IgA polimérica y complejos inmunes con IgA (Triolo et al, 1984; Eguchi et al, 1995; Figueredo et al, 1996; Koschinsky et al, 1997). La elevación concomitante de la inmunoglobulina A1 (IgA1) sérica, en ausencia de infección, es parte de la anormalidad (Ohmuro et al, 1993).

La IgA1 humana, es la subclase de IgA más abundante en el suero y es una proteína altamente glicosilada,

constituida por una gama amplia de glicofomas originadas por la microheterogeneidad de sus O- y N-glicanos (Mattu et al, 1998; Allen, 1999). Más del 90%, de los N- y los O-oligosacáridos de la IgA1 monomérica sérica (ubicados en dos sitios conservados del fragmento cristalizante y cinco sitios parcialmente ocupados de la región bisagra, respectivamente) están totalmente galactosilados y sialilados (Mattu et al, 1998; Tomana et al, 1999; Feehally y Allen, 1999). El estado de glicosilación de la IgA1 influye en las propiedades inmunoquímicas de la molécula. Se ha demostrado, que la modificación experimental de la fracción oligosacárida de la IgA1 sérica produce la agregación de esta molécula (Iwase et al, 1999). Más aún, la sialilación de la fracción glicano de la IgA1 puede influir el aclaramiento hepático de la IgA1 sérica. En la nefropatía por IgA, un cuadro renal patológico que padecen muchos pacientes con DM2 (Gans et al, 1992; Reinold et al, 1992; Orfila et al, 1998), se cree que el grado de sialilación de la IgA1 podría afectar el aclaramiento hepático de la molécula (Leung et al, 1999). En los pacientes con DM2, diversas proteínas séricas tienen un aumento significativo en su contenido de ácido siálico (Chen et al, 1996; Deepa et al, 1998; Crook et al, 2000). Sin embargo, no se sabe cuáles son las diferencias en el perfil de glicosilación de la IgA1 de pacientes diabéticos con relación al de las personas sanas.

Considerando, que el incremento en los niveles de la IgA1 sérica, en los pacientes con DM2, puede explicarse por los cambios en la fracción oligosacárida de la inmunoglobulina, el objetivo de este estudio fue caracterizar a los oligosacáridos del fragmento

cristalizable de la IgA1 sérica de pacientes con una elevada concentración de esta molécula y que padecen Diabetes Mellitus tipo 2.

ANTECEDENTES

Epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2, antes identificada como diabetes tipo II o diabetes no insulino dependiente), es un síndrome plurimetabólico que afecta a mujeres y hombres adultos (ALAD, 1995; Midthjell *et al*, 1995; Cervený *et al*, 1998; King *et al*, 1998). Casi el 5% de los adultos de todo el mundo son diabéticos (142 millones) y de estos, más del 90% corresponden a la diabetes tipo 2 (Cervený *et al*, 1998; King *et al*, 1998). Las complicaciones producidas por este padecimiento representan la cuarta causa de muerte en adultos a escala mundial (ALAD, 1995; Cervený *et al*, 1998).

La prevalencia actual de la DM2, es mayor en países desarrollados que en países emergentes. Sin embargo, en los próximos años se espera que se invierta esta relación, de manera que en el año 2025, los países pobres tendrán que atender a más del 75% de los adultos diabéticos de todo el mundo. La prevalencia de la DM2 en la población mexicana es una de las más altas del mundo, ocupando el noveno lugar. Las proyecciones de la OMS para el año 2025, indican que México, junto con otros países de América Latina, del Este Medio, África, Indonesia y Asia, triplicarán el número actual de diabéticos (King *et al*, 1998).

La DM2, afecta a una gran parte de la población económicamente activa (González-Villalpando *et al*, 1994). En México, esto representa un problema serio de salud pública, ya que según la Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas, en algunas poblaciones urbanas el número de

diabéticos rebasa el 10% de los adultos mayores de 40 años. Además, las complicaciones vasculares crónicas asociadas con la evolución natural de la diabetes, contribuyen significativamente a la tasa de mortalidad (37/100,000) que, en América, solamente es superada por Trinidad y Tobago (SSA, 1997; King *et al*, 1998).

En los países emergentes es, quizá, en donde con mayor crudeza se percibe el impacto epidemiológico de las complicaciones de la diabetes, ya que éstas generan elevadas tasas de mortalidad y desempleo por invalidez. El control de la exposición a los factores de riesgo, tales como la hipertensión arterial, el tabaquismo, el alcoholismo, la dislipidemia, etc., reduce la mortalidad específica debida a las complicaciones vasculares. Sin embargo, en un alto porcentaje de diabéticos, la reducción de los factores de riesgo no puede evitar totalmente la aparición de las complicaciones (The DCCT Research Group, 1993; ADA, 1996; Bloomgarden, 1997; Bloomgarden, 1998). Por ello, los programas mundiales de investigación, enfocados al estudio de la patogénesis de la Diabetes Mellitus Tipo 2 y de sus complicaciones, han sido considerados de importancia fundamental para el control global de la enfermedad (Bloomgarden, 1998).

Aspectos Clínicos Generales de la Diabetes Mellitus Tipo 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), es un síndrome plurimetabólico que compromete la utilización celular de carbohidratos, lípidos y proteínas. Los pacientes afectados por esta enfermedad tienen grados variables de resistencia a la insulina y una respuesta hormonal,

compensatoria, inadecuada (Davidson, 1995). Estos pacientes generalmente no requieren insulina exógena hasta los estadios tardíos de la enfermedad (Cervený et al, 1998).

El origen de la DM2, se ha vinculado tanto con factores genéticos (Altman y Todd, 1995; Fujisawa et al, 1995; Hanson et al, 1995; Iwasaki et al, 1995; Matsubara et al, 1995) como con factores relacionados con el estilo de vida. Entre éstos últimos, sobresalen la adiposidad visceral y los niveles bajos de actividad física (Fujimoto et al, 1997; Valencia et al, 1997; Tayama et al, 1997; Tsai et al, 1997).

El signo metabólico primario de la DM2 es la hiperglicemia, de la cual se derivan otros síntomas y signos tales como glucosuria, poliuria, polidipsia y polifagia. En su patogénesis, están implicadas la subutilización tisular de glucosa, las anomalías en la síntesis, liberación y acción de la insulina y la salida excesiva de glucosa hepática (Murakami y Shima, 1995).

A medida que la enfermedad progresa, aún en pacientes aparentemente bien controlados (Cervený et al, 1998), surgen complicaciones vasculares centrales y periféricas (retinopatía, nefropatía, y enfermedad coronaria, entre otras). Entre los factores relacionados con las complicaciones y con el deterioro subyacente del organismo, se encuentran la hiperglicemia (Murakami y Shima, 1995), el estado de estrés oxidativo (Olcsyk et al, 1994; Abbott et al, 1995; Pieper et al, 1995; Salonen et al, 1995; Cunningham et al, 1995; Bhoraskar et al, 1997; López-Virella et al, 1999;), la subutilización tisular de glucosa (Murakami y Shima, 1995), los cambios en la actividad de algunas enzimas y la acumulación de los

productos finales de la glicación avanzada y de moléculas oxidadas (Soulis-Liparota *et al*, 1995; Sensi *et al*, 1995).

Durante la evolución natural de la DM2, además se presentan otros cambios bioquímicos que tienen un significado patogénico oscuro. Uno de ellos, considerado un buen predictor de riesgo cardiovascular, es el aumento en los niveles de ácido siálico plasmático (Chen *et al*, 1996; Deepa *et al*, 1998; Crook *et al*, 2000). El otro, es el aumento en los niveles de la inmunoglobulina A (IgA) sérica, una glicoproteína que forma parte del sistema de defensa del organismo; los pacientes diabéticos, tienen con frecuencia niveles de IgA significativamente mayores que los de sujetos no diabéticos (Gill *et al*, 1981; Rodríguez-Segade *et al*, 1991; Ardawi *et al*, 1994; Eguchi *et al*, 1995). Sin embargo, tanto el origen como el significado patogénico de esta elevación son motivo de controversia desde hace más de dos décadas.

Relación entre la Inmunoglobulina A y la Diabetes Mellitus Tipo 2

Un cambio cuantitativo observado comúnmente en el suero de los pacientes diabéticos, es el aumento en la concentración de la inmunoglobulina A (IgA), una glicoproteína que forma parte del sistema de defensa del organismo (Gill *et al*, 1981; Rodríguez-Segade *et al*, 1991; Ardawi *et al*, 1994; Eguchi *et al*, 1995). Hasta ahora se desconoce el origen y el significado patogénico de esta elevación, sin embargo, es afectada por el grado de control glicémico de los pacientes (Ardawi *et al*, 1994; Vázquez-Moreno *et al*, 1999) y es altamente prevalente en los pacientes que han sido tratados con hipoglucemiantes

orales durante 10 o más años (Rodríguez-Segade *et al*, 1996), en los diabéticos que inician su padecimiento después de los 65 años de edad y en los que ya tienen complicaciones vasculares (Cheta *et al*, 1982; Rodríguez-Segade *et al*, 1996). Estos últimos, frecuentemente tienen una importante elevación de complejos inmunes con IgA y de autoanticuerpos IgA aparentemente asociados con el daño vascular (Triolo *et al*, 1984; Triolo *et al*, 1987; Eguchi *et al*, 1995; Figueredo *et al*, 1996; Koschinsky *et al*, 1997).

Por otro lado, los procesos infecciosos parecen no ser el estímulo primario para la elevación en la concentración sérica de la IgA, ya que el fenómeno se presenta sin antecedentes clínicos de infecciones y, además, la concentración de las inmunoglobulinas G y M (IgG e IgM) suele ser normal (Gill *et al*, 1981; Vázquez-Moreno *et al*, 1999). La edad y el sexo tampoco parecen estar involucrados en la elevación de la IgA (Gill *et al*, 1981), pero en algunos estudios los hombres han mostrado una concentración de IgA mayor que las mujeres (Rodríguez-Segade *et al*, 1996).

Es común observar niveles elevados de anticuerpos IgA contra proteínas de choque térmico y lipoproteínas modificadas (Figueredo *et al*, 1996; Koschinsky *et al*, 1997) en los pacientes que ya tienen complicaciones. Hasta ahora, no se ha determinado la contribución cuantitativa de ninguna de estas moléculas a la IgA sérica total, sin embargo, la abundancia de complejos inmunes con IgA y de moléculas de IgA con especificidad hacia compuestos finales de glicación avanzada en diabéticos complicados (Triolo *et al*, 1984; Triolo *et al*, 1987; Eguchi *et al*, 1995; Figueredo *et al*, 1996; Koschinsky *et al*, 1997),

apoyarían la hipótesis de que existe una relación entre el aumento de la IgA sérica y la patogénesis de las complicaciones vasculares.

Por otro lado, los resultados recientes obtenidos por Vázquez-Moreno y colaboradores (Vázquez-Moreno *et al*, 1999), indican que la concentración de IgA sérica también aumenta en los pacientes diabéticos controlados, en quienes no hay manifestaciones clínicas de complicaciones vasculares. Al comparar un grupo de 23 pacientes diabéticos no complicados y metabólicamente controlados (hemoglobina glicada < 10%) con un grupo correspondiente de 23 controles sanos de la misma edad y sexo, solamente en el grupo de diabéticos correlacionaron positivamente los niveles de IgA con el porcentaje de hemoglobina glicada ($r=0.57$; $p<0.0001$), sugiriendo así que el incremento en la IgA es secundario al nivel de control glicémico. Además, los pacientes mostraron un aumento significativo de IgA sérica ($p < 0.0001$) con respecto a los controles. Estos resultados, conducen a la suposición de que el aumento de IgA sérica podría ser una consecuencia temprana del impacto metabólico de la diabetes.

Hasta ahora, no hay reportes que sugieran que el cambio cuantitativo de IgA sérica de los pacientes diabéticos es originado por el aumento en la tasa de síntesis de la molécula o por la prolongación de su vida media.

En el suero de los pacientes diabéticos, se han identificado formas modificadas de las inmunoglobulinas G y M (Danze *et al*, 1987; Hammes *et al*, 1990; Menini *et al*, 1993), derivadas de su glicación espontánea. El origen de este fenómeno radica en la hiperglicemia, intermitente o

permanente, que sufren los pacientes diabéticos. La hiperglicemia promueve la glicación espontánea tanto de proteínas séricas como tisulares (Menini *et al*, 1993; Salmela *et al*, 1995; Sensi *et al*, 1995; Soulis-Liparota *et al*, 1995). Por ello, podría esperarse el aumento en la concentración de IgA glicada en el suero de los diabéticos. Pero los niveles de IgG e IgM suelen ser normales en los pacientes diabéticos (Gill *et al*, 1981; Vázquez-Moreno *et al*, 1999), lo que sugiere que la glicación de ambas moléculas no afecta la concentración sérica de este tipo de proteínas y, en consecuencia, tampoco afectaría los niveles de IgA.

Experimentalmente, no se han demostrado cambios en la vida media de la IgA sérica de ratas diabéticas inducidas con estreptozocina (Miller *et al*, 1988) y tampoco se ha estudiado el impacto de las alteraciones en la concentración de minerales y de la respuesta proliferativa de los linfocitos (Alexiewicz *et al*, 1997) sobre la tasa de producción y la estructura molecular de la IgA.

Al aumento de la IgA sérica contribuyen las formas monoméricas de la proteína, los complejos inmunes de IgA (Triolo *et al*, 1984; Eguchi *et al*, 1995) y las formas poliméricas de la proteína (Triolo *et al*, 1984). Ninguna de estas moléculas ha sido caracterizada estructuralmente y, por lo tanto, no se sabe si el cambio de concentración de IgA es concomitante a cambios en su estructura.

La subclase IgA1, contribuye importantemente al incremento de la IgA sérica total de los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (Ohmuro *et al*, 1993). Esta glicoproteína es la subclase de IgA más abundante en el suero humano y su participación inmunológica está directamente relacionada con la integridad estructural de

la molécula, misma que le permite interaccionar apropiadamente con receptores celulares altamente específicos (Woof y Amin, 1993; Field et al, 1994; Mattu et al, 1998). De ahí la importancia de caracterizar, en principio, cualquier modificación de la IgA.

Estructura y Función Normal de la Inmunoglobulina A1 (IgA1)

La Inmunoglobulina A (IgA), es una de las cinco clases de proteínas que constituyen, en el hombre, la base de la defensa inmunológica contra una amplia gama de microorganismos, partículas inhaladas, antígenos alimentarios, etc. Esta glicoproteína, es el principal anticuerpo de las secreciones mucosas y su tasa de biosíntesis diaria supera a la del resto de las inmunoglobulinas. La IgA producida en la médula ósea es, en su mayoría, monomérica, en tanto que la de origen mucoso es principalmente polimérica.

La IgA interactúa con receptores específicos (Fc α) ubicados en granulocitos, monocitos y macrófagos, que pueden mediar procesos tales como la fagocitosis, la generación de superóxido, la liberación de enzimas, y el aclaramiento de complejos inmunes. Las moléculas de IgA carecen del sitio de unión C1q y por ello no activan la vía del complemento clásico. La activación de la ruta alterna del complemento por IgA continúa siendo un tema controversial (Mattu et al, 1998).

La inmunoglobulina A1 (IgA1), es una de las dos subclases de IgA sintetizadas en el organismo. La IgA1 producida en la médula ósea, es una glicoproteína predominantemente monomérica constituida por cuatro

cadenas polipeptídicas (Mattu et al, 1998), dos cadenas pesadas "H" de 56 kDa, y dos cadenas ligeras "L" de 26 kDa, unidas por enlaces disulfuro. Las cadenas polipeptídicas "H" están glicosiladas en sitios específicos, presentando N- y O-oligosacáridos (Figura 1). El segmento de las cadenas "H", que sirve para unir a las dos cadenas pesadas, recibe el nombre de región bisagra. La digestión enzimática de la IgA1 monomérica, a la altura de la región bisagra, genera un fragmento cristalizante (Fc) y dos fragmentos Fab (Figura 2).

La función óptima de la IgA1, depende de la conformación de la proteína, que a su vez, depende tanto de la composición y secuencia de aminoácidos de las regiones constantes (conservadas) como de la integridad de los oligosacáridos ligados a ellas (Woof y Amin, 1993). Con la excepción de los receptores Fc α de neutrófilos (Mattu et al, 1998), los sistemas de receptores ubicados en otras células (las hepáticas por ejemplo) requieren de la presencia de los oligosacáridos de la IgA1 para interactuar eficazmente con la proteína (Woof y Amin, 1993).

La IgA1, contiene una secuencia rica en prolina en la región bisagra. En esta secuencia hay nueve sitios de glicosilación potenciales. Los O-oligosacáridos están localizados principalmente en la región bisagra, en los aminoácidos Thr²²⁶, Ser²³⁰ y Ser²³²; los residuos Thr²²⁵ y Thr²³⁶ están parcialmente ocupados (Mattu et al, 1998; Figura 3). Diversos estudios de precipitación de la IgA1 con la lectina jacalina, han demostrado que los O-oligosacáridos (Ser²³⁰ y/o Ser²³²) de la región bisagra de la IgA1 son los responsables de la interacción entre las dos moléculas (Skea et al, 1988).

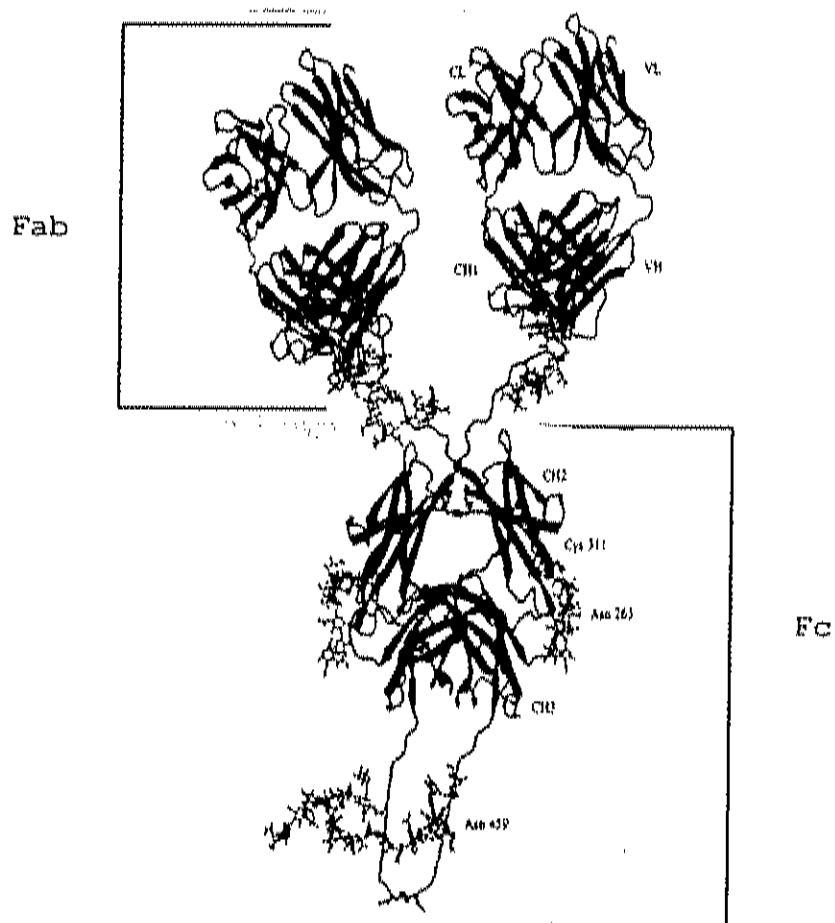


Figura 1. Representación esquemática de la IgA1 humana monomérica, constituida por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas H y L, a su vez, presentan dominios constantes (C) y dominios variables (V). Los sitios de glicosilación conservados se localizan en la región bisagra y en el segmento Fc. Cinco sitios ocupados con O-oligosacáridos se localizan en la región bisagra y dos N-oligosacáridos en el Fc (Asn 263 y Asn 459).

Fuente: Mattu *et al*, 1998.

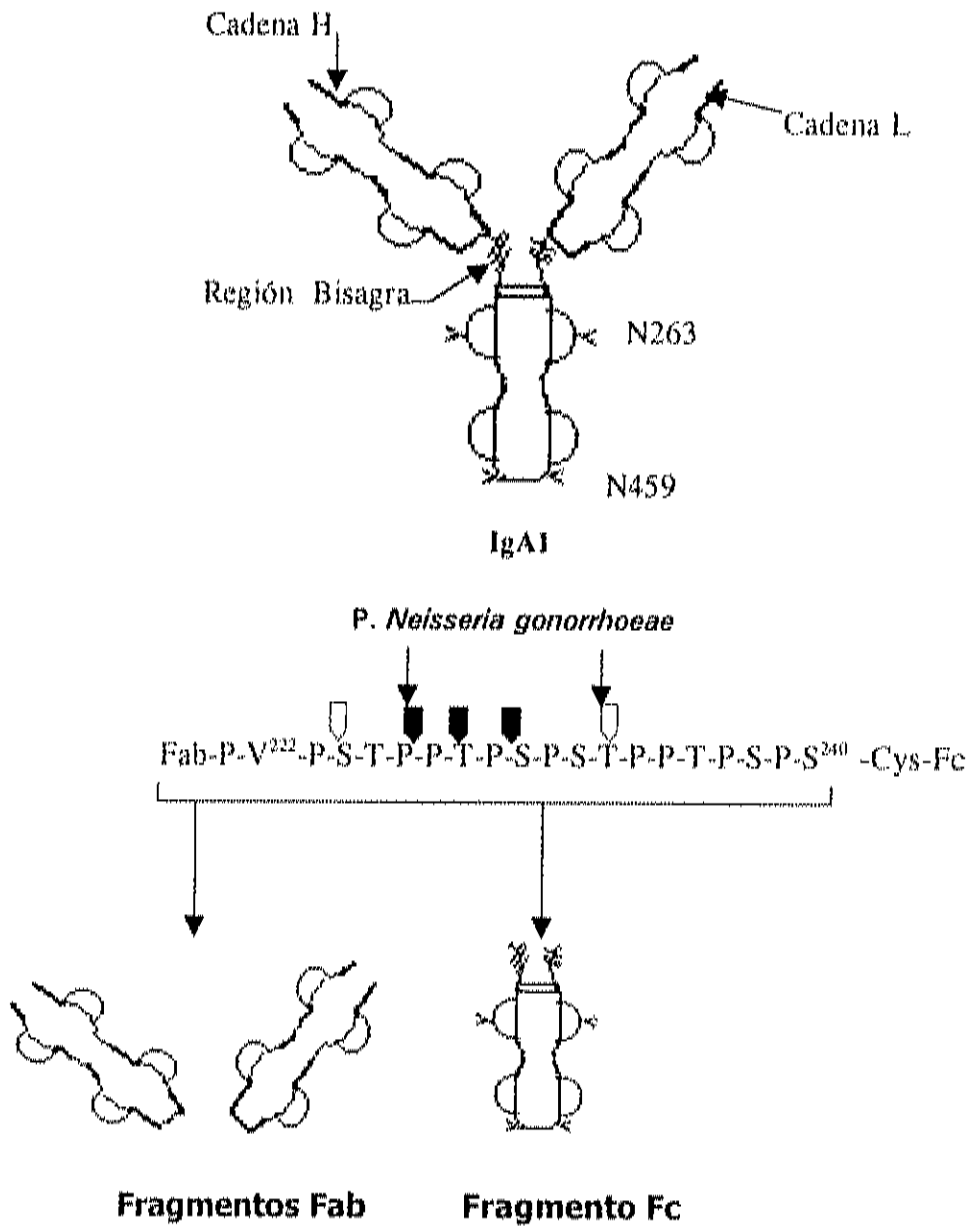


Figura 2. Representación de la digestión enzimática de la IgA1 monomérica humana. La proteasa de IgA1, de *Neisseria gonorrhoeae*, separa al fragmento Fc del resto de la molécula. El Fc queda así con los dos dominios constantes N-glicosilados y un sitio de O-glicosilación potencial. Fuente: Modificada de Mattu *et al*, 1998.

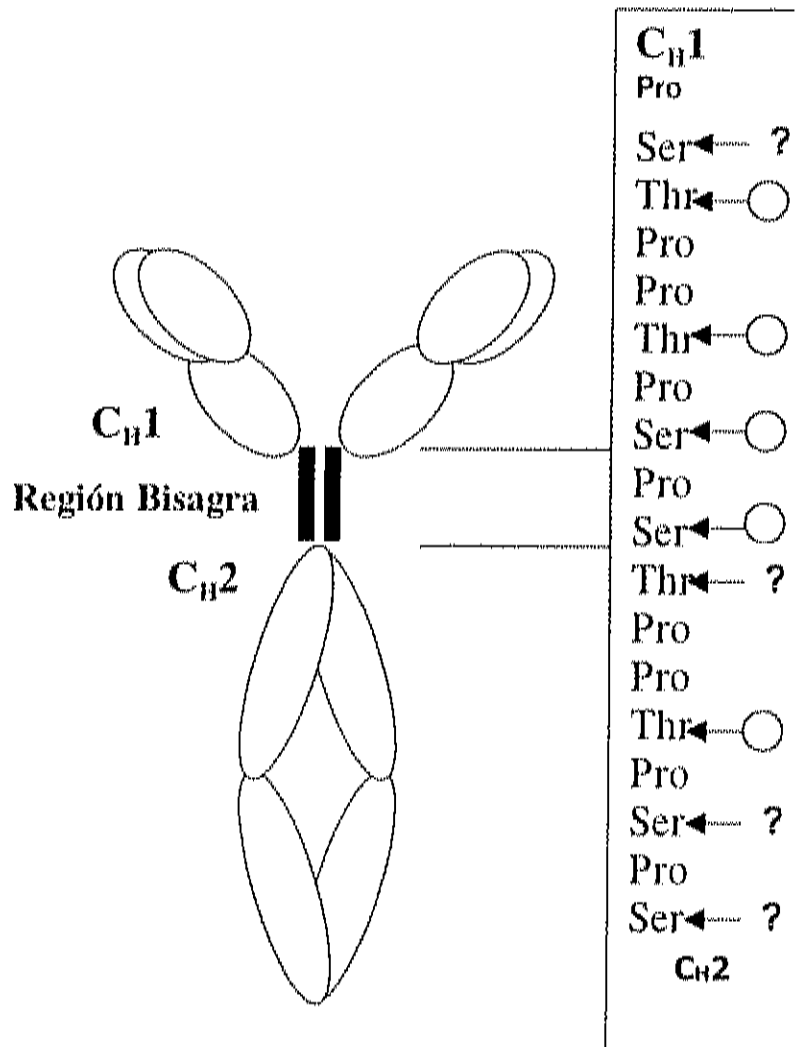


Figura 3. Estructura de la región bisagra de la IgA1 humana. Cinco aminoácidos (señalados con flecha y círculo abierto), están ocupados con O-glicanos. Existen además cuatro sitios potenciales de O-glicosilación.

Fuente: Modificado de Feehally, 1999 y Allen, 1999.

Entre los O-oligosacáridos de la IgA1 sérica, se encuentran di, tri o tetrasacáridos (Figura 4; Tomana et al, 1999). La presencia del neoantígeno N-acetilgalactosamina (GalNAc) en la IgA1 sérica normal es controversial (Allen, 1999; Mattu et al, 1998; Tomana et al, 1999). El repertorio limitado de estructuras O-glicanos de la IgA1 sérica, comparado con el de la IgA de las secreciones, indica que el procesamiento de los O-oligosacáridos es específico para cada tejido y refleja los diferentes ambientes en los cuales se requiere la función de estas moléculas.

En las cadenas H, los sitios N-glicosilados son la Asn²⁶³ y Asn⁴⁵⁹; ambos residuos están ubicados en el Fc (Figura 5). Se ha demostrado que, en la IgA1 humana, la ocupación de estos residuos es variable. Más del 85% de los N-oligosacáridos son biantenarios complejos, con una fucosa en el centro quitobiosa, una N-acetilglucosamina bisectaria, o ambas (Figura 6). Aproximadamente 20% de los N-glicanos biantenarios corresponden a estructuras bisectarias. Poco más del 13% de los N-glicanos son estructuras tri, o tetraantenarias (Figura 7; Field et al, 1994). Más del 95% de los N-oligosacáridos están totalmente galactosilados y más del 98% están sialilados. Los N-glicanos mono y disialilados contienen solamente ácidos siálicos en enlace α 2-6, mientras que los trisialilados contienen un ácido siálico en α 2-6 y dos ácidos siálicos en α 2-3 (Mattu et al, 1998). Entre los N-glicanos biantenarios, las estructuras monosialiladas son relativamente más abundantes, lo que sugiere que la sialiltransferasa sialila preferentemente un brazo de los glicanos biantenarios.

- 1) -O- GalNAc

- 2) -O- GalNAc - α 2, 6 NeuNAc

- 3) -O- GalNAc - β 1, 3-Gal

- 4) -O- GalNAc - β 1, 3-Gal - α 2, 3-NeuNAc

- 5)
 -O- GalNAc - β 1, 3- Gal - α 2, 3- NeuNAc
 |
 α 2, 6 - NeuNAc

Figura 4. Estructura de los O-oligosacáridos de la región bisagra de la IgA1. La presencia del neoantígeno GalNAc es controversial.

Fuente: Modificado de Feehally, 1999 y Tomana *et al*, 1999.

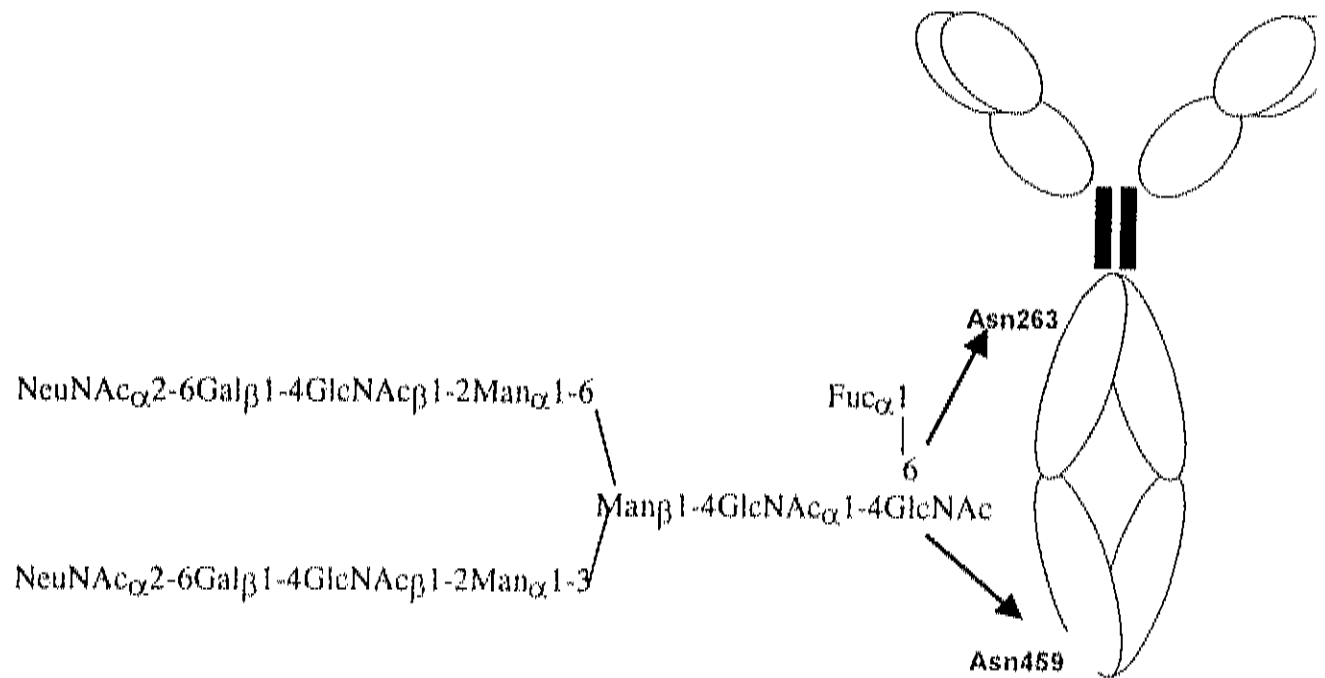
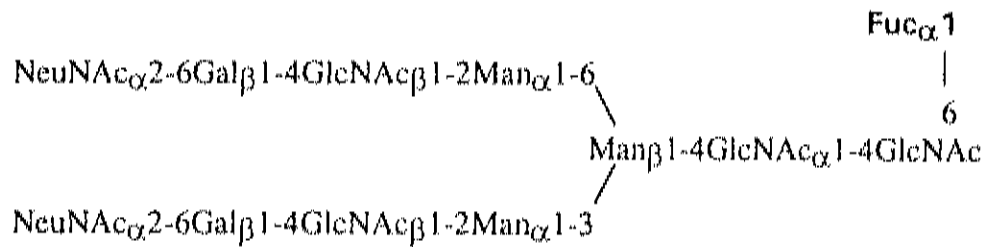


Figura 5. Los N-oligosacáridos biantenarios están ligados a las Asn-263 y Asn-459 del Fc de la IgA1. Son relativamente más abundantes las estructuras monosialiladas.

Fuente: Mattu *et al*, 1998.

A)



B)

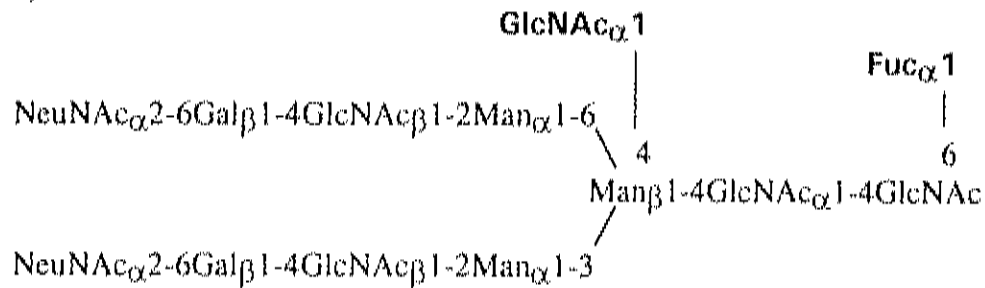
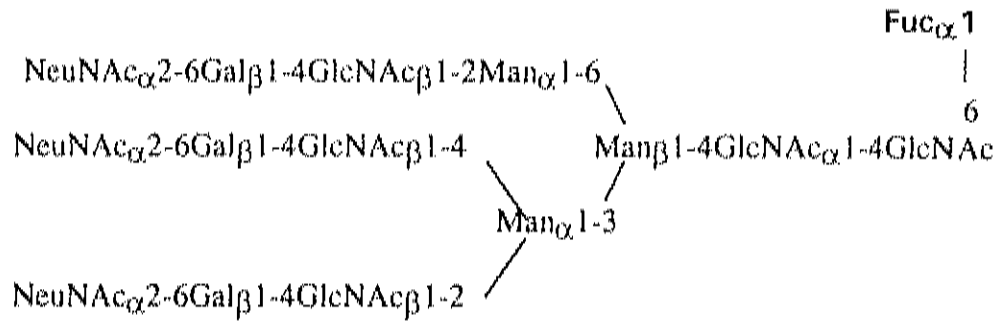


Figura 6. El 85% de los N-oligosacáridos de la IgA1 humana son biantenaricos complejos con una fucosa en el centro quitobiosa (A), de los cuales aproximadamente el 20% son biantenaricos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectaria (B). Más del 90% de los N-oligosacáridos de la IgA1 están totalmente galactosilados y sialilados. Estas estructuras se localizan en el Fc.

Diseñado a partir de Mattu *et al*, 1998.

A)



B)

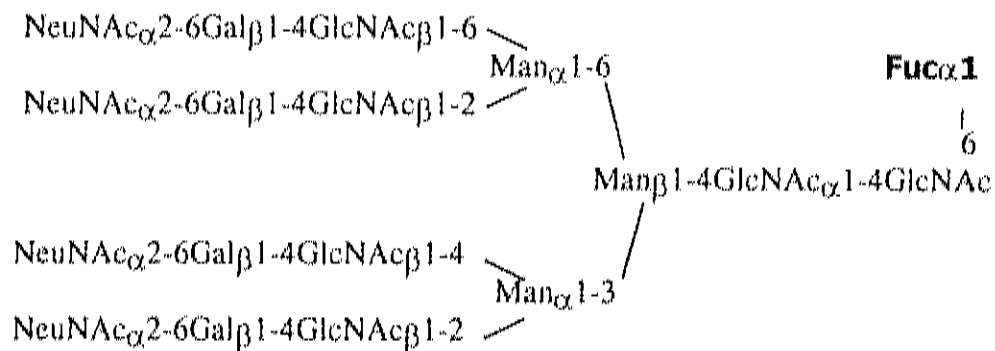


Figura 7. Aproximadamente el 13% de los N-glicanos, son estructuras triantennarias del tipo representado en (A) y tetraantennarias (B). Estos oligosacáridos están localizados fundamentalmente en el Fab.

Fuente: Mattu *et al.*, 1998.

En la IgA1 solamente se detectan pequeñas cantidades (<0.1%) de estructuras oligomanosa. Las casi totales galactosilación y sialilación de los N-oligosacáridos de la IgA1, parecen ser una consecuencia de la estructura primaria y del patrón de enlaces disulfuro de la IgA1 que determinan que los sitios conservados de glicosilación, en el segmento C α 2, estén totalmente accesibles a la acción de las glucosiltransferasas (Mattu *et al*, 1998).

En los Fab(s) hay tanto N- como O-oligosacáridos (Mattu *et al*, 1998). En este caso, los sitios de glicosilación no son conservados y parecen responder a fenómenos de inducción antigénica. Los N-glicanos del Fab están más sialilados que los de la región Fc. Aquí se encuentran, además, la mayoría de los N-oligosacáridos triantenarios.

Finalmente, la IgA1 puede formar estructuras poliméricas; los polímeros de IgA1 pueden tener de 2-6 monómeros y contribuyen a la heterogeneidad en el perfil de glicosilación de la IgA1 sérica nativa (Figura 8).

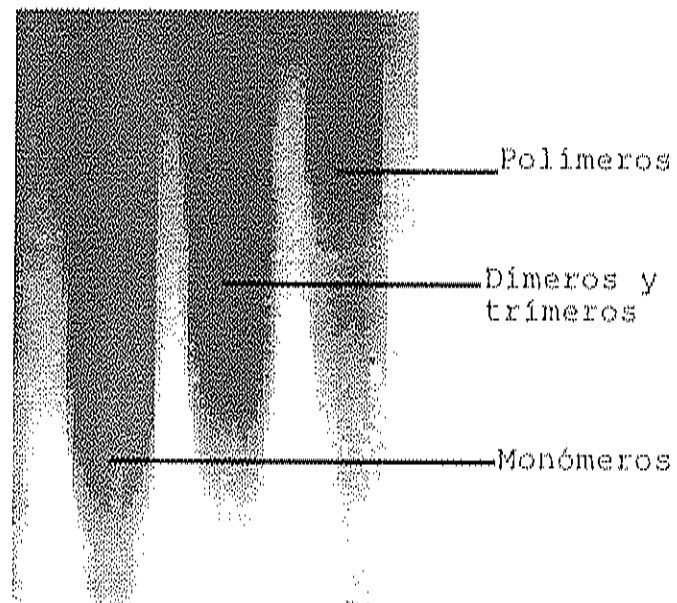


Figura 8. Polímeros de IgA1 en electroforesis nativa. La asociación de 2 a 6 monómeros origina los polímeros de IgA1 que contribuyen a la heterogenidad generada por los monómeros de la inmunoglobulina.

Fuente: Hiki *et al*, 1996.

El Aumento de la IgA1 Puede Ser Consecuencia de Cambios en los Oligosacáridos de la Proteína

Los N-oligosacáridos del Fc, no se requieren para la interacción de la IgA1 con sus receptores en neutrófilos (Mattu et al, 1998). Sin embargo, cuando existen modificaciones en los N- u O-oligosacáridos de la proteína, se altera la interacción entre la IgA1 y los sistemas de receptores encargados de remover a la proteína del torrente circulatorio (Leung et al, 1999). Se ha demostrado que, normalmente, los receptores encargados del aclaramiento de la IgA1 polimérica responden a cambios en la estructura de sus oligosacáridos; tanto el receptor hepático, encargado del aclaramiento de la IgA monomérica, como el receptor de la IgA polimérica, remueven del plasma a las formas de IgA desialiladas. Además, los oligosacáridos influyen en la secreción de la IgA1, en su conformación y su solubilidad, y participan en la polimerización de la proteína (Woof y Amin, 1993).

Por otro lado, se sabe que los procesos bioquímicos involucrados en la glicosilación de las glicoproteínas son fuertemente afectados por las condiciones metabólicas intracelulares (Rademacher et al, 1988). Se requieren concentraciones óptimas de cada uno de los precursores, de las enzimas y de otros compuestos para que la síntesis de N- y O-oligosacáridos se lleve a cabo apropiadamente. Por lo tanto, cuando existe una disregulación metabólica importante pueden desencadenarse cambios dramáticos en la estructura de la fracción glicano de las glicoproteínas. En tal caso se encuentran, la artritis reumatoide (Field et al, 1994; Gornik et al, 1999) y el síndrome de Henoch-Shönlein (Saulsbury, 1997), dos enfermedades en las que se

han detectado cambios en la estructura de los oligosacáridos de la IgG e IgA, respectivamente.

En el caso de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), la información disponible hasta el momento indica que los cambios en la concentración de la IgA1 no están relacionados con un evento antigénico específico. Tampoco hay evidencias de que el aumento en los niveles de la IgA1 sea originado por el aumento en la tasa de síntesis de la molécula. En contraparte, la coexistencia de nefropatía por IgA (un cuadro patológico renal en el que hay alteraciones en los oligosacáridos de la IgA1) y DM2 en un número importante de pacientes (Reinold *et al*, 1992; Gans *et al*, 1992; ; Kokubo *et al*, 1999; Orfila *et al*, 1998; Feehally y Allen, 1999; Hiki *et al*, 1999) y el aumento en los niveles de ácido siálico plasmático (Chen *et al*, 1996; Deepa *et al*, 1998; Crook *et al*, 2000) podrían ser evidencias de la existencia de cambios en los oligosacáridos de la IgA1 sérica de los pacientes diabéticos.

Con base en los anteriores argumentos, este trabajo fue realizado con el objetivo de caracterizar a los oligosacáridos del Fc de la IgA1 sérica de pacientes con DM2 con IgA1 sérica elevada.

METODOLOGÍA

Sujetos

Se cuantificaron los niveles de IgA1 en las muestras séricas obtenidas de 23 pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2). Los pacientes, fueron seleccionados aleatoriamente entre un grupo numeroso de personas que asisten a las clínicas externas de diabetes del Instituto Mexicano del Seguro Social y de la Clínica LaSalle de Hermosillo, Sonora, México. El diagnóstico de DM2, fue realizado de acuerdo con los criterios recomendados por el Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus (The report of the 1995 Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

Al momento de realizar el estudio, el grupo de pacientes con DM2 tenía 41 años de residencia promedio en Hermosillo, edad media de 59±10 años y un tiempo medio de evolución del padecimiento de 5.3 años. En un estudio previo, se había demostrado que estos pacientes tenían un nivel elevado de IgA sérica (Vázquez Moreno et al, 1999). El grupo control, fue integrado con 23 personas sanas del mismo sexo y edad que las del grupo de pacientes, y de la misma zona geográfica. Su buen estado de salud fue confirmado por medio de un examen clínico minucioso y una prueba de tolerancia a la glucosa (TGO), en la que se les proporcionó una carga oral de 75g de glucosa en ayuno. Se consideró que la TGO era normal, cuando la concentración de glucosa sérica fue menor de 7.8 mM/L a las 2 h de haber sido suministrada la carga de glucosa (The report of the 1995 Expert Committee on the Diagnosis and Classification

of Diabetes Mellitus, 1997).

La purificación de la IgA1, fue realizada con el suero de seis pacientes y cuatro controles seleccionados aleatoriamente entre el grupo inicial de 46 personas. Los seis pacientes estuvieron con tratamiento basado en hipoglicemiantes orales y sin infección durante, al menos dos meses antes del estudio.

El análisis estadístico de los resultados cuantitativos se realizó con el programa NCSS60 versión 6.0. El significado de las diferencias de medianas entre las muestras de un mismo grupo y entre grupos fue estimado por la prueba de rangos de Kruskal-Wallis de una vía.

Quantificación de IgA1 Sérica

La cuantificación de la IgA1 sérica se realizó en los 46 sujetos del grupo original, utilizando para ello dos métodos. La IgA1 total fue cuantificada con un ensayo inmunoenzimático ligado a enzima (ELISA, por sus siglas en inglés) y, la IgA1 con afinidad hacia la jacalina (Roque-Barreira y Campos Neto, 1985) fue cuantificada con un lectinoinmuncensayo usando a la lectina inmovilizada en poliestireno (Cullina y Greally, 1993).

Reducción y Alquilación de las Proteínas Séricas

Antes de determinar la concentración de la IgA1, las proteínas séricas fueron reducidas (Heremans, 1974) con ditiotreitól 0.044 M en Tris-HCl 0.6 M, pH 8.6 durante 2 h a temperatura ambiente y alquiladas con iodacetamida 0.048 M en Tris-HCl 0.6 M, pH 8.6. La mezcla, fue incubada por 12 h (Miller et al, 1988) a temperatura ambiente.

Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzima para la Cuantificación de la IgA1 Total

El suero humano, en dilución de 1/200 en carbonato de sodio 50 mM, pH 9.6, fue inmovilizado en placas de poliestireno (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) durante 12 h a 4°C. La placa fue bloqueada con albúmina de suero bovino al 1% y Tween 20 al 0.05%, en NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.05 M (TBS), pH 7.2 durante 3 h. El antisuero primario anti-IgA1 humana, desarrollado en borrego (The Binding Site, Inc., CA, USA), fue incubado en dilución 1/1,000 durante 1.5 h a temperatura ambiente y para revelar su interacción se utilizó el antisuero secundario anti-IgG marcado con biotina (The Binding Site, Inc., CA, USA) en dilución 1/2,000 en TBS, durante 1.5 h a temperatura ambiente. La reacción fue revelada con avidina-peroxidasa, en dilución 1/1,000, en presencia de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina como sustrato a 450 nm (Microplate Reader, Modelo 450, BioRad, CA, USA). La curva estándar, de 0.36 a 46 µg/mL, fue preparada con IgA comercial con una concentración de 2.3 mg/mL (ImmunoResearch Jackson, West Grove, Pennsylvania).

Cuantificación de la IgA1 Sérica con Afinidad a Jacalina

La jacalina fue inmovilizada a una concentración de 95 µg/mL en solución de carbonato, pH 9.6, durante 12 h a 4°C (Cullina y Greally, 1993) y la placa fue bloqueada con albúmina de suero bovino al 1% y Tween 20 al 0.05% en NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.05 M (TBS), pH 7.2 durante 3 h a temperatura ambiente. Las muestras de suero fueron

incubadas durante 1.5 h y la interacción jacalina-IgA1 sérica fue revelada con un antisuero anti-IgA1 humana (The Binding Site, Inc. , CA, USA), desarrollado en borrego, en dilución 1/1000 durante 1.5 h. El antisuero secundario anti-IgG marcado con biotina (The Binding Site, Inc., CA, USA), fue incubado en dilución 1/1000 durante 1.5 h a temperatura ambiente. La reacción fue revelada con avidina-peroxidasa, en dilución 1/1,000, en presencia de peróxido de hidrógeno y tetrametilbencidina como sustrato a 450 nm. La curva estándar, fue preparada de 0.36 a 46 µg/mL con IgA comercial de 2.3 mg/mL (ImmunoResearch Jackson, West Grove, Pennsylvania). Las muestras de suero de los pacientes y de las personas sanas fueron ensayadas a una dilución de 1/200 por duplicado y los estándares por triplicado.

Purificación de la Inmunoglobulina A1 (IgA1)

La purificación de la IgA1 sérica se realizó, a temperatura ambiente, utilizando tres métodos cromatográficos en secuencia. Primero, se aisló la fracción de inmunoglobulinas totales por cromatografía de hidrofobicidad (Sefarosa-6B altamente acetilada). Luego, la IgA fue aislada a partir de las inmunoglobulinas totales con Agarosa-anti-IgA y, finalmente, la IgA1 fue purificada a partir de la IgA, usando Agarosa-jacalina.

Aislamiento de las Inmunoglobulinas Sérica Totales

El aislamiento de las inmunoglobulinas séricas totales, se realizó utilizando como fase estacionaria una matriz hidrofóbica: Sefarosa-6B altamente acetilada

(Vázquez-Moreno *et al.*, 1992), que fue sintetizada a partir de 47g del gel de Sefarosa-6B CL deshidratado (Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden). El gel fue lavado sucesivamente con 47 mL de etanol al 95%, 47 mL de acetona y 47 mL de piridina. Posteriormente fue transferido a una solución de 31 mL de anhídrido acético y la suspensión fue agitada por 12 h a velocidad moderada y a temperatura ambiente. El gel así acetilado, fue lavado con 94 mL de etanol seguido por 47 mL de ácido acético al 10% y 650 mL de agua y empacado, en un sistema de baja presión a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, en una columna para cromatografía de 2.5 x 10 cm y equilibrado con 5 volúmenes de una solución de Na_2SO_4 0.5 M, pH 7.6. El volumen de la cama cromatográfica con el gel ya equilibrado fue de 10 mL.

Se aplicaron 2 mL (67-75 mg de proteína por mL) de suero humano (problema o control) a la fase estacionaria, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Las proteínas no adsorbidas a la matriz y las unidas inespecíficamente fueron eliminadas lavando la columna con la misma solución de equilibrio (Na_2SO_4 0.5 M, pH 7.6) y las proteínas unidas específicamente fueron eluidas subsecuentemente en un solo paso con PBS 20 mM, pH 7.2. Las proteínas remanentes se liberaron de la matriz con una solución de guanidina-HCl 6 M, pH 7.6. El aislamiento de las inmunoglobulinas fue monitoreado espectrofotométricamente a 280 nm y la concentración de proteína de las fracciones de lavado y elución fue determinada a 595 nm por el método de Bradford, usando inmunoglobulinas séricas humanas como proteínas estándares (Bradford, 1976) y por inmunodifusión radial (Goers, 1993) usando placas precalibradas para IgG, IgM e IgA (The Binding Site, Inc., CA, USA).

Aislamiento de la IgA Sérica

El aislamiento de la inmunoglobulina A sérica fue realizado con una matriz Agarosa-anti-IgA, que fue preparada con 2g del gel (Agarosa) activado con divinilsulfona (Kem-En-Tec., Copenhagen, Denmark). La Agarosa activada fue lavada con agua deionizada, resuspendida en una solución de carbonato de sodio 0.3 M, pH 8.6 e incubada por 14 h con 2 mL de una solución de anti-IgA humana de 22 mg/mL (The Binding Site, Inc., CA, USA) en presencia de polietilenglicol al 6% (Lihme *et al.*, 1986). El exceso de grupos activos fue bloqueado con una solución de etanolamina 0.2 M, pH 9, durante 5 horas.

El gel (Agarosa-anti-IgA), fue empacado en un sistema de baja presión a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min en una columna para cromatografía de 1 x 4 cm y equilibrado con 5 volúmenes de una solución de PBS, pH 7.2. El volumen de la cama cromatográfica con el gel ya equilibrado fue de 2 mL.

Se aplicaron en promedio 13 mg de las inmunoglobulinas séricas dializadas contra PBS, pH 7.2 (volumen total promedio 51 mL) a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Las inmunoglobulinas no adsorbidas a la matriz y las unidas inespecíficamente fueron eliminadas lavando la columna con la misma solución de equilibrio (PBS, pH 7.2) y las IgA unidas específicamente fueron eluidas subsecuentemente en un solo paso con una solución de Glicina ácida, pH 3.6. Se colectaron fracciones de 1.5 mL que fueron neutralizadas con Trizma base 0.1 M, pH 8.0. La purificación de la IgA fue monitoreada espectrofotométricamente a 280 nm y la concentración de

proteína de las fracciones de lavado y elución fue determinada a 595 nm por el método de Bradford, usando IgA sérica humana como proteína estándar (Bradford, 1976) y por inmunodifusión radial usando placas precalibradas para IgA (The Binding Site, Inc., CA, USA).

Purificación de la IgA1 Sérica

La purificación de la inmunoglobulina A1 (IgA1) sérica, fue realizada utilizando como fase estacionaria una matriz de Agarosa-jacalina (Aucunturier *et al.*, 1988; Skea *et al.*, 1988; Biewenga *et al.*, 1989; Hortin y Trimple, 1990; Hiki *et al.*, 1996; Do y Lee, 1998; Iwase *et al.*, 1999), que fue preparada de acuerdo al procedimiento descrito para el acoplamiento de la anti-IgA (Lihma *et al.*, 1986), pero utilizando polietilenglicol al 20% (Vázquez-Moreno *et al.*, 1993). Se acoplaron 50 mg de la proteína (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) a 2 g del gel de Agarosa (Kem-En-Tec., Denmark), obteniéndose así una fase estacionaria de 2 mL.

El gel, fue empacado en un sistema de baja presión a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min en una columna para cromatografía de 1 x 4 cm y equilibrado con 5 volúmenes de una solución de fosfatos salina (PBS), pH 7.2.

Se aplicaron 2 mg de IgA sérica dializada contra PBS, pH 7.2, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La IgA no adsorbida a la matriz y la unida inespecíficamente, fueron eliminadas lavando la columna con la misma solución de equilibrio (PBS, pH 7.2) y la IgA1 unida específicamente fue eluida subsecuentemente con un gradiente decreciente discontinuo, con galactosa 0.025 M en PBS, pH 7.2 para eluir a la fracción de IgA1 de baja afinidad a la

jacalina; galactosa 0.1 M en PBS, pH 7.2 para eluir a la fracción de afinidad intermedia a la jacalina y por último galactosa 0.8 M en PBS, pH 7.2 para eluir a la fracción de IgA1 de alta afinidad a la jacalina (Hiki *et al*, 1999). La proteína remanente fue eluida con una solución de Glicina 50 mM, pH 3.6. La purificación de la IgA1 fue monitoreada espectrofotométricamente a 250 nm y la concentración de proteína de las fracciones de lavado y elución fue determinada a 595 nm por el método de Bradford, usando IgA1 sérica humana como proteína estándar (Bradford, 1976), por inmunodifusión radial usando placas precalibradas para IgA (The Binding Site Inc., CA, USA) y ELISA.

Quantificación de Proteínas y Determinación de la Pureza de la IgA1

La cuantificación de proteínas en cada una de las etapas de aislamiento y purificación se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando inmunoglobulinas totales e inmunoglobulinas A y A1 comerciales (The Binding Site, Inc., CA, USA) como proteínas estándares. La pureza de la fracción de IgA1 fue determinada por inmunodifusión radial (Goers, 1993), SDS-PAGE al 12.5% (Laemmli, 1970), electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas electrotransferencia e inmunodetección utilizando anti-IgA1 humana y anti-IgG humana, como antisueros primarios (The Binding Site, Inc., USA).

Obtención de los Fragmentos Cristalizables de la IgA1

Digestión Enzimática de la IgA1 Nativa

Los fragmentos cristalizables (Fc), fueron obtenidos a partir de la digestión enzimática de la IgA1 nativa. Para ello, 0.5 mg de IgA1 pura fueron resuspendidos en 1 mL de una solución de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0.1 mM, pH 7.5, e incubados con la proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae* (Kilian et al, 1996) en una relación de 1/250 enzima-sustrato durante 16 h a 37°C (Boehringer & Mannheim, Germany).

Purificación de los Fc de la IgA1

Los Fc fueron purificados, a partir de la mezcla de reacción obtenida de la digestión de la IgA1 con la Proteasa de *Neisseria gonorrhoeae* (Mattu et al, 1998), por cromatografía de filtración en gel. Para ello, se utilizaron dos columnas TSK SW3000G-XL (7.8 x 300 mm) acopladas en secuencia a un sistema para cromatografía líquida de alta presión (Supelco, PA, USA) y equilibradas con una solución de fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.150 M, pH 7.2. La mezcla de la reacción enzimática fue aplicada y la cromatografía se realizó a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min, con monitoreo permanente a 280 y 220 nm. La pureza de los fragmentos fue confirmada con SDS-PAGE al 12.5%.

Obtención de los Fragmentos Cristalizables de la IgA1

Digestión Enzimática de la IgA1 Nativa

Los fragmentos cristalizables (Fc), fueron obtenidos a partir de la digestión enzimática de la IgA1 nativa. Para ello, 0.5 mg de IgA1 pura fueron resuspendidos en 1 mL de una solución de Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0.1 mM, pH 7.5, e incubados con la proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae* (Kilian *et al.*, 1996) en una relación de 1/250 enzima-sustrato durante 16 h a 37°C (Boehringer & Mannheim, Germany).

Purificación de los Fc de la IgA1

Los Fc fueron purificados, a partir de la mezcla de reacción obtenida de la digestión de la IgA1 con la Proteasa de *Neisseria gonorrhoeae* (Mattu *et al.*, 1998), por cromatografía de filtración en gel. Para ello, se utilizaron dos columnas TSK SW3000G-XL (7.8 x 300 mm) acopladas en secuencia a un sistema para cromatografía líquida de alta presión (Supelco, PA, USA) y equilibradas con una solución de fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.150 M, pH 7.2. La mezcla de la reacción enzimática fue aplicada y la cromatografía se realizó a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 0.25 mL/min, con monitoreo permanente a 280 y 220 nm. La pureza de los fragmentos fue confirmada con SDS-PAGE al 12.5%.

Obtención de los Fragmentos Bisagra de IgA1

La IgA1 liofilizada (2 mg) fue resuspendida en 1 mL de Tris-HCl 0.4 M, pH 8.6, y desnaturalizada con Guanidina-HCl 6 M y EDTA 0.2 M (Iwase *et al*, 1999). La proteína desnaturalizada, fue reducida con ditiotreitól al 1.5% durante 45 minutos a 90°C (Gurd, 1972) e incubada con 40 mmoles de iodacetamida en Tris-HCl 0.4 M, pH 8.6 durante 30 minutos a temperatura ambiente.

La IgA1 reducida y alquilada fue resuspendida en 640 µL de una solución de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 (Iwase *et al*, 1999) con urea 2 M. Se adicionaron 80 µL de una solución de tripsina de 2 µg/µL, con 80 µL de CaCl₂ 0.05 M y la mezcla de reacción fue incubada por 12 h a 37°C.

Purificación de los Fragmentos Bisagra de la IgA1

Los fragmentos bisagra de la IgA1 fueron purificados a partir de la IgA1 previamente digerida con tripsina. La mezcla de reacción fue ajustada a 0.36 M de urea, utilizando una solución de Tris-HCl 0.175 M, pH 7.6 y aplicada a una columna Agarosa-jacalina, de 2 mL de volumen de cama (Iwase *et al*, 1999). La cromatografía se realizó a temperatura ambiente, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La elución de los fragmentos bisagra adsorbidos al gel, fue promovida con una solución de galactosa 0.5 M en Tris-HCl 0.175 M, pH 7.6.

Para desalar y purificar a homogeneidad los fragmentos bisagra, se utilizó una columna Bio-Gel P-4, de 9.5 mL de volumen de cama, equilibrada con urea 0.36 M en Tris-HCl 0.175 M, pH 7.6.

Ensayos de Inhibición de la Interacción IgA nativa-jacalina

Los ensayos de inhibición entre la jacalina y la IgA1 de pacientes y controles (Hiki *et al.*, 1996), fueron realizados en presencia de galactosa, inmovilizando, en placas de poliestireno, 10 µg/mL de IgA1 en 100 µL de solución de carbonato, pH 9.6, durante 12 h a 4°C. Las placas, bloqueadas con albúmina de suero bovino al 1% y Tween al 0.05%, en TBS, pH 7.5 durante 3 h a temperatura ambiente, fueron incubadas con jacalina en TBS, pH 7.5, en presencia de galactosa 0.025, 0.1 y 0.8 M durante 1.5 h. Paralelamente, fue ensayada la interacción de la jacalina y la IgA1 en ausencia de galactosa. La reacción fue revelada con avidina-peroxidasa, en dilución 1/1,000, en presencia de peróxido de hidrógeno y ortofenilendiamina como sustrato a 450 nm (Microplate Reader, Modelo 450, BioRad, CA, USA)

Análisis de los Oligosacáridos de la IgA1

Por sus propiedades de unión diferencial a glicoreceptores (Debray *et al.*, 1981; Kobata *et al.*, 1992; Wold *et al.*, 1994; Endo, 1996; Robertson y Kennedy, 1996; Goodarzi y Turner, 1997; Kabir, 1998; Leung *et al.*, 1999; Allen, 1999) y por su utilidad para la investigación de los cambios en los oligosacáridos de las proteínas séricas en diversas enfermedades (Turner, 1992), en este estudio fue utilizada una batería de once lectinas para realizar la caracterización de la IgA1 de los pacientes diabéticos y los controles.

Biotinilación de las Lectinas

Las lectinas usadas para el análisis de los oligosacáridos (Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA), fueron ligadas covalentemente a biotina de acuerdo a Hofmann *et al*, 1982, con algunas modificaciones. Cinco mg de las lectinas *Maackia amurensis* (MMA), *Ricinus communis* I (RCAI), *Artrocarpus integrifolia* (Jacalina), *Triticum vulgare* (WGA) y *Canavalia ensiformis* (ConA), fueron incubados con 2 mg del éster biotinamidocaproato N-hidroxisuccinimida en dimetilformamida (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) durante 2 h a temperatura ambiente, dializadas contra agua y liofilizadas. Las lectinas *Dolichos biflorus* (DBA), *Arachis hypogaea* (PNA), *Erythrina cristagalli* (ECA), *Lens culinaris* (LCH), *Anguilla anguilla* (AAA), *Sambucus nigra* (SNA) y *Glicine max* (SBA) fueron adquiridas, ya biotiniladas, de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA).

Ensayos de Manchas

El análisis preliminar de los oligosacáridos de la IgA1 nativa, fue realizado mediante ensayos de manchas a temperatura ambiente (Stott, 1989). La proteína nativa (2 µg) fue inmovilizada sobre tiras de nitrocelulosa. Las interacciones inespecíficas fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino al 4% p/v y Tween 20 al 0.05% p/v en NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.05 M (TBS), pH 7.5 durante 1.5 h. Las tiras fueron incubadas con las once lectinas biotiniladas en solución (10 µg/mL) de TBS, pH 7.5, durante 2 h. La interacción IgA1-lectinas fue revelada con avidina-peroxidasa (1/1000 en TBS, pH 7.5), en presencia de

peróxido de hidrógeno y utilizando diaminobencidina como sustrato.

Lectinoimmunoensayos con la IgA1 Nativa

El análisis de la interacción IgA1-lectinas, fue realizado mediante lectinoimmunoensayos (Kabir, 1993) utilizando las once lectinas. La IgA1 nativa (10 µg/mL en TBS, pH 7.5), fue inmovilizada en placas de poliestireno durante 12 h a 4°C en TBS, pH 7.2 y diluida en serie hasta alcanzar una concentración de 1×10^{-6} µg/mL. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% p/v y Tween 0.05% v/v en TBS, pH 7.5 e incubadas con las lectinas biotiniladas en TBS (10 µg/mL) durante 2 h a temperatura ambiente. La interacción entre la IgA1 y la lectina fue revelada con avidina-peroxidasa (1/1000 en TBS, pH 7.5), en presencia de peróxido de hidrógeno y ortofenilendiamina como sustrato a 450 nm (Microplate Reader, Modelo 450, BioRad, CA, USA) y las diferencias entre las relaciones de absorbancia de los ensayos de la IgA1 (a 1 µg/mL) de diabéticos y las de los controles, fueron utilizadas para estimar las diferencias de afinidad de la proteína por las lectinas, por medio del análisis por rangos de Kruskal-Wallis.

Lectinoimmunoensayos con los Fragmentos Bisagra y Cristalizable

Se utilizó el procedimiento general descrito en los lectinoimmunoensayos con la IgA1 nativa, con algunas modificaciones. Los Fragmentos Cristalizables (Fc) en solución de fosfato de sodio 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.2 (3

µg/mL), fueron inmovilizados en placas de poliestireno durante 16 h a temperatura ambiente. Después de bloquear las placas con albúmina de suero bovino al 1% y Tween al 0.05%, en TBS, pH7.5, fueron incubadas con cada una de las lectinas en solución (10 µg/mL) de TBS, pH 7.5, durante 1.5 h. La interacción lectina-Fc fue revelada con avidina-peroxidasa (1/1000) usando ortofenilendiamina como sustrato a 450 nm.

Los fragmentos bisagra en solución de urea 0.36 M, Tris-HCl 0.175 M, pH 9.6 (3 µg/mL), fueron inmovilizados en placas de poliestireno (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) durante 24 h a 4°C. El bloqueo de las placas, fue realizado durante 3 h, con albúmina de suero bovino al 1% y Tween al 0.05%, en TBS, pH7.5, y las lectinas fueron ensayadas en solución (10 µg/mL) de TBS, pH 7.5, durante 1.5 h. La interacción lectina-bisagra fue revelada con avidina-peroxidasa (1/1000) usando ortofenilendiamina como sustrato a 450 nm.

RESULTADOS

Concentración de la IgA1 Sérica

La concentración de IgA1 sérica, de 23 pacientes diabéticos y 23 personas sanas, fue determinada mediante dos ensayos de fase sólida no competitivos. Los resultados de los ensayos, mostraron fuerte correlación ($r = 0.998$) e indicaron un aumento significativo de IgA1 en el suero de los pacientes (2.62 ± 1.48 mg/mL; Figura 9) con respecto al de los controles (1.46 ± 1.47 mg/mL; $p < 0.001$).

Purificación de IgA1

Aislamiento de las Inmunoglobulinas Séricas Totales

Utilizando un gel de Sefarosa-6B altamente acetilada, de 10 mL de volumen de cama, y aplicando en promedio 2 mL de suero por corrida, se recuperaron 13.5 mg de inmunoglobulinas por corrida cromatográfica. En el cromatograma típico (Figura 10), se observó un primer pico que correspondió a la fracción de proteínas séricas no adsorbidas a la matriz (fracción de lavado). El segundo pico del cromatograma correspondió a la fracción de elución. La capacidad del gel, medida con una solución de 8 mg/mL de inmunoglobulinas humanas séricas (fracción de Cohn; Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) fue de 1.4 mg/mL. Se realizaron en total 22 corridas cromatográficas, sin que hubiera pérdida de capacidad del gel altamente acetilado.

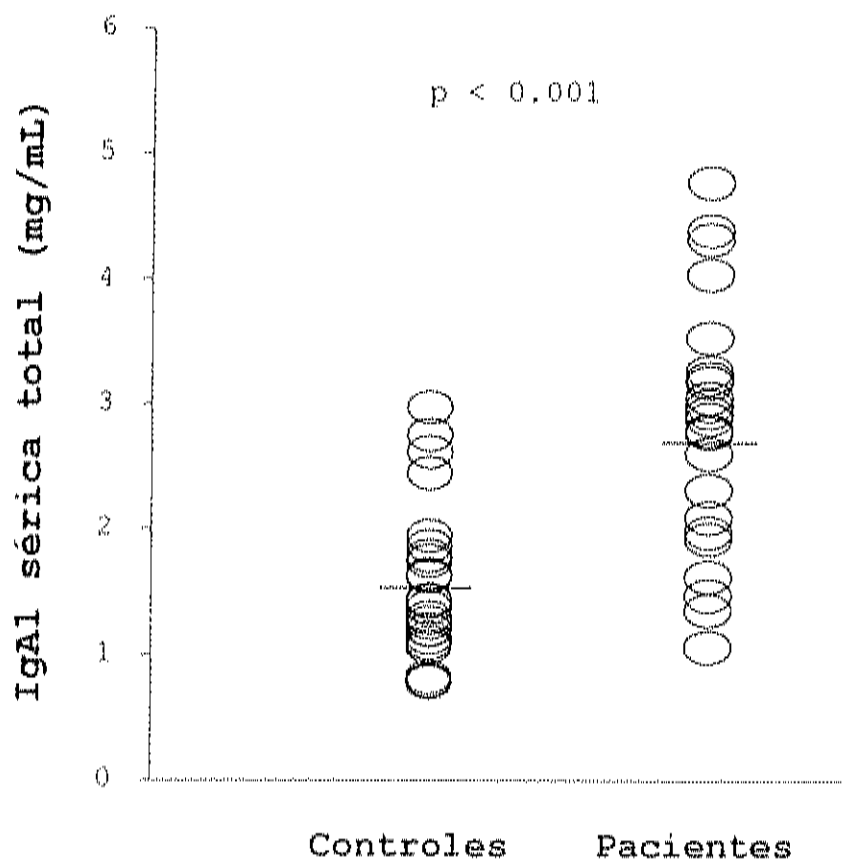


Figura 9. Niveles de IgA1 sérica total en los dos grupos de estudio. Cada círculo representa a un individuo. La barra señala la media de cada grupo, calculada por transformación logarítmica. La concentración de IgA1 en los pacientes, fue significativamente mayor que la de los controles.

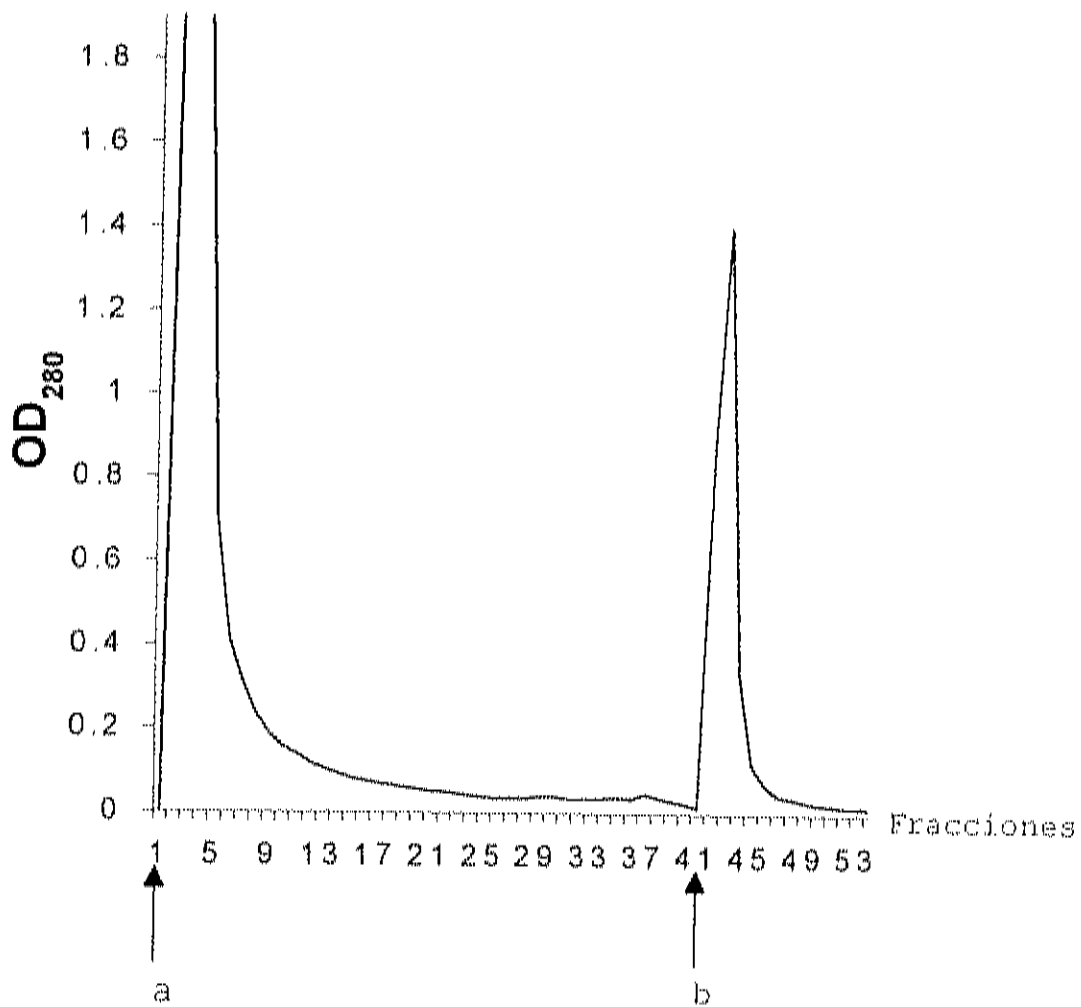


Figura 10. Aislamiento de inmunoglobulinas humanas séricas en Sefarosa-6B altamente acetilada. La solución proteica (65 mg/mL de suero) fue aplicada (a) y lavada con Na_2SO_4 0.5 M, pH 7.6. Las inmunoglobulinas fueron eluidas con PBS 20 mM, pH 7.2 (b).

Aislamiento de la IgA Sérica

Para la purificación de la inmunoglobulina A sérica se utilizó como fase estacionaria una matriz Agarosa-anti-IgA con 2 mL de volumen de cama. En promedio, se recuperaron 1.3 mg de IgA, por corrida cromatográfica, aplicando 13 mg de inmunoglobulinas totales. En el cromatograma típico (Figura 11), se observó un primer pico que correspondió a la fracción de inmunoglobulinas séricas no adsorbidas a la matriz (fracción de lavado). El segundo pico del cromatograma, con la IgA, correspondió a la fracción de elución a pH 3.6.

Purificación de la IgA1

Para la purificación de la inmunoglobulina A1, se utilizó como fase estacionaria una matriz Agarosa-jacalina con 2 mL de volumen de cama. Aplicando al gel un promedio de 1.3 mg de IgA, se recuperaron 0.9 mg de IgA1 por corrida cromatográfica. En el cromatograma típico (Figura 12), obtenido eluyendo la columna con un gradiente de galactosa, se observó un primer pico que correspondió a la fracción de IgA sérica no adsorbida a la matriz (fracción de lavado). Los siguientes picos, correspondieron a las fracciones de proteína eluidas con galactosa (0.025, 0.1 y 0.8 M). La pureza de las fracciones de elución, fue confirmada con un ELISA no competitivo con anti-IgA1 (The Binding Site, Inc., CA, USA) como antisuero primario y por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras (Figura 13), electrotransferencia e inmunodetección.

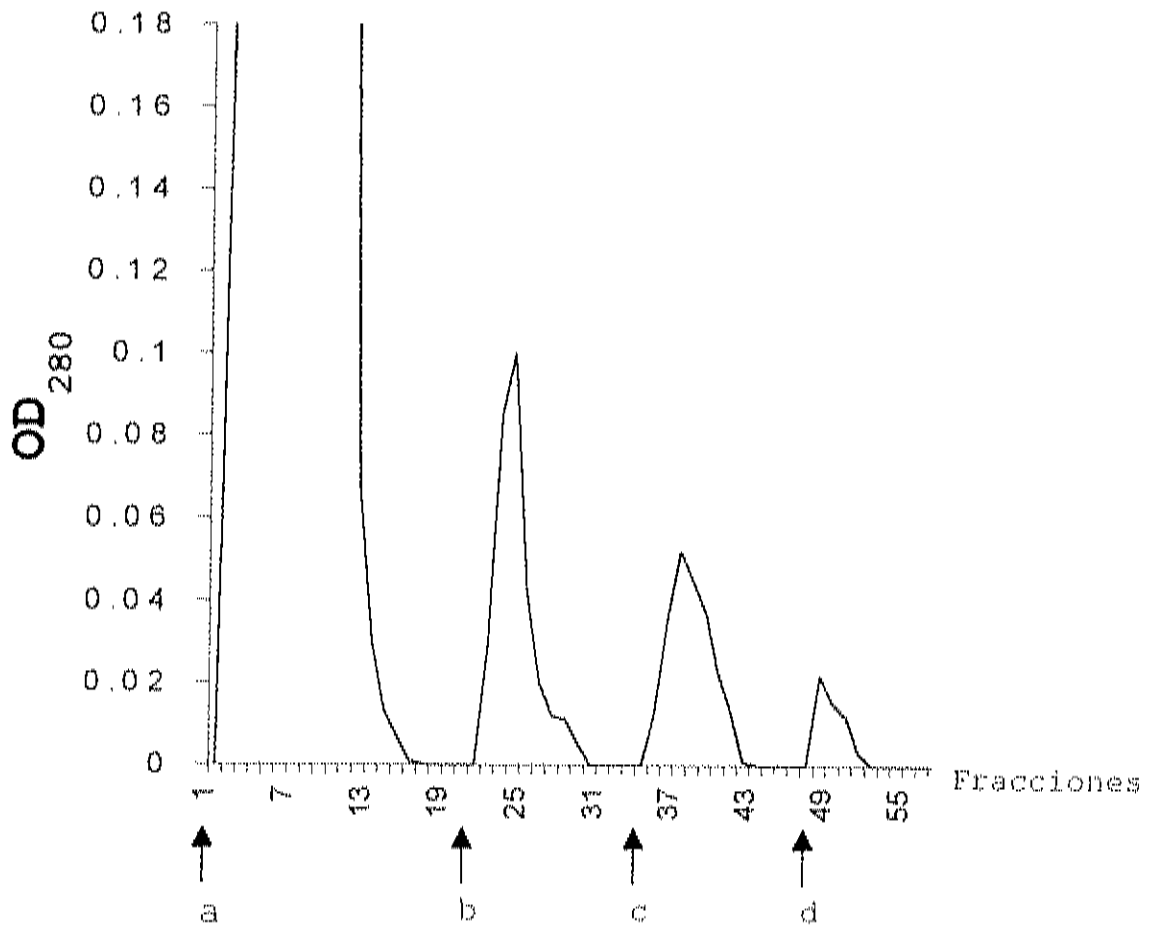


Figura 11. Aislamiento de IgA en Agarosa-anti-IgA. La solución de inmunoglobulinas (13 mg) fue aplicada (a) y lavada con PBS, pH 7.2. La IgA fue eluida con Gli-HCl, pH 3.6 (b), Gli-HCl, pH 3.0 (c) y Gli-HCl, pH 2.6 (d).

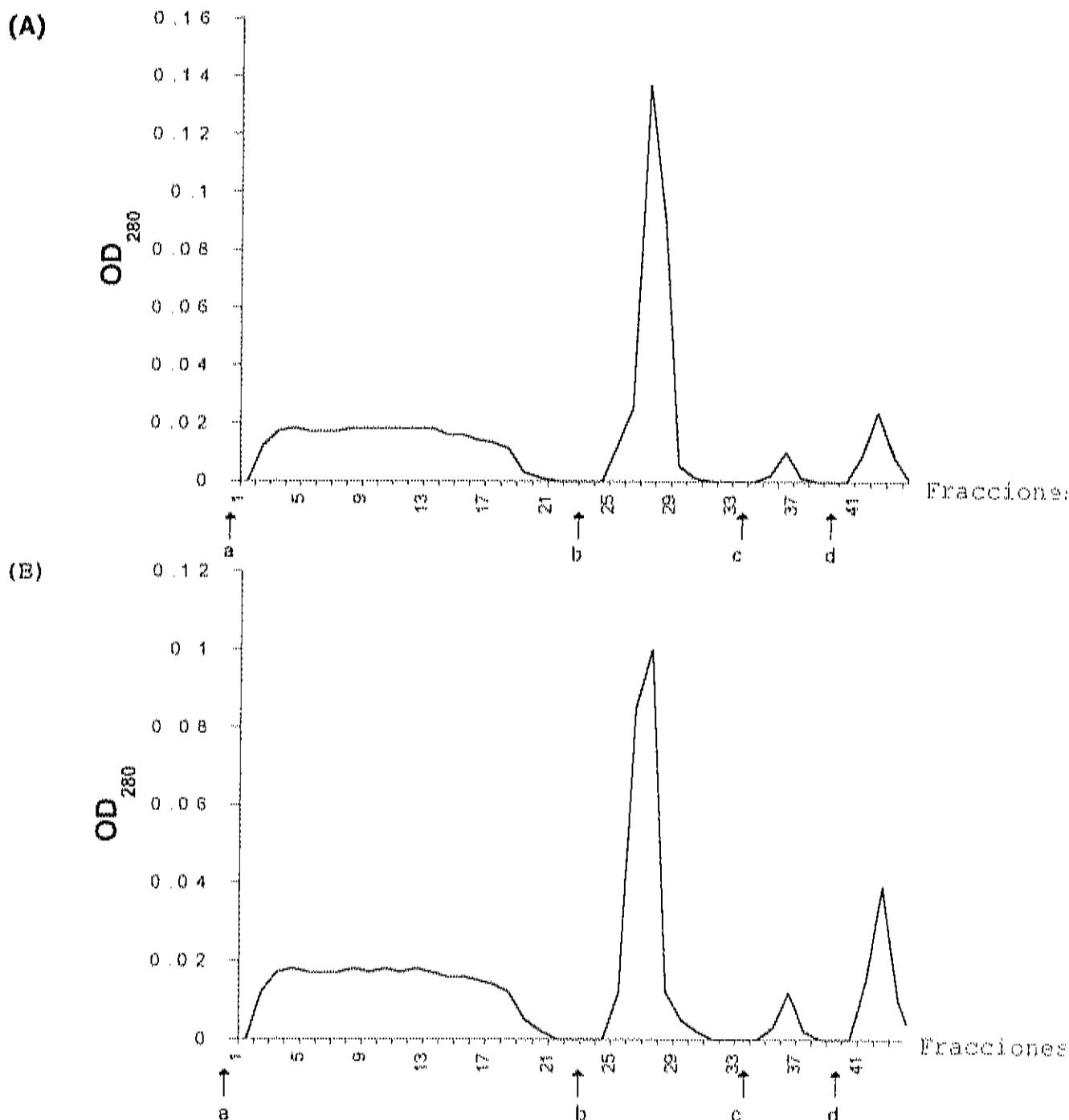


Figura 12. Purificación de la IgA1 sérica con Agarosa-jacalina. La solución de IgA (2 mg) fue aplicada a la columna (a) y las proteínas no adsorbidas al gel se eliminaron con PBS, pH 7.2. La IgA1 de baja afinidad a la jacalina y la de afinidad intermedia fueron eluidas con galactosa 0.025 M (b) y galactosa 0.1 M (c) respectivamente. La fracción de alta afinidad, fue eluida con galactosa 0.8 M (d) y fue significativamente mayor en los pacientes (B) con respecto a los controles (A).

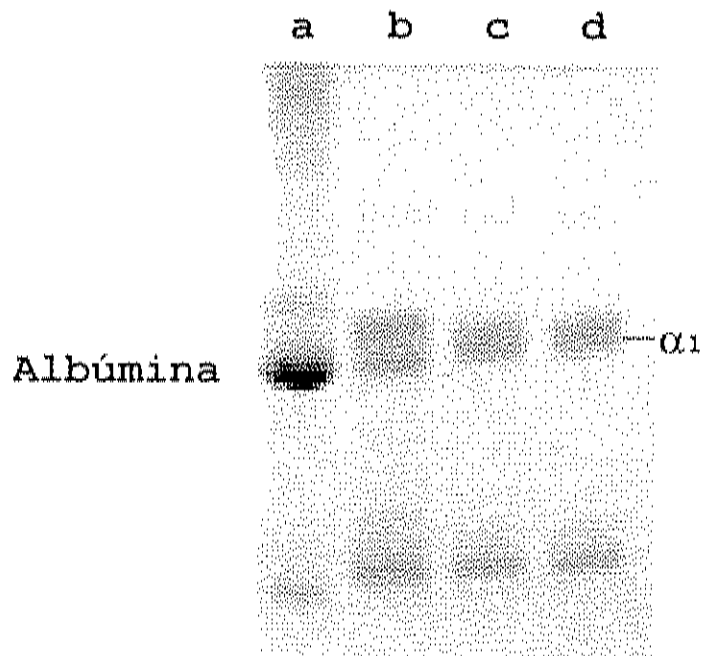


Figura 13. Electroforesis, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, al 12.5%. El suero humano (a) fue cargado a Sefarosa-6B altamente acetilada para aislar a las inmunoglobulinas totales (b). La IgA (c) fue aislada de las inmunoglobulinas usando Agarosa-anti-IgA y la IgA1 pura (d) fue obtenida con Agarosa-jacalina.

La fracción de IgA1 de baja afinidad a jacalina (segundo pico del cromatograma de la figura 12), eluida con galactosa 0.025 M, constituyó el mayor porcentaje (70-86%) de la proteína total eluida, mientras que la fracción de afinidad intermedia a la jacalina (eluida con galactosa 0.1 M; tercer pico del cromatograma) representó del 2-8% de la proteína adsorbida al gel.

El cuarto pico del cromatograma (Figura 12), fue generado por la elución (con galactosa 0.8 M) de la fracción de IgA1 con alta afinidad a jacalina. En los pacientes, el porcentaje de proteína contenido en esta última fracción fue hasta del 25%, comparado con un máximo de 14% en los controles.

La electroforesis en condiciones nativas (Figura 14), de las tres fracciones de IgA1, evidenció la elevada heterogeneidad de la IgA1 sérica. La fracción de baja afinidad a jacalina estuvo constituida principalmente por IgA1 monomérica (156-177 kDa), mientras que la fracción de alta afinidad a jacalina fue predominantemente IgA1 polimérica (>200 kDa). Las proteínas más abundantes en la fracción de afinidad intermedia, fueron las IgA1 de masa intermedia (dímeros y trímeros).

Ensayos de Inhibición con Galactosa

En los pacientes, la interacción IgA1-jacalina, eluida con galactosa 0.025 y 0.1 M, fue inhibida de manera similar que la de los controles. En tanto que, la interacción jacalina-IgA1 polimérica de los pacientes mostró una inhibición mayor con relación a la IgA1 polimérica de los controles ($p < 0.02$; Figura 15).

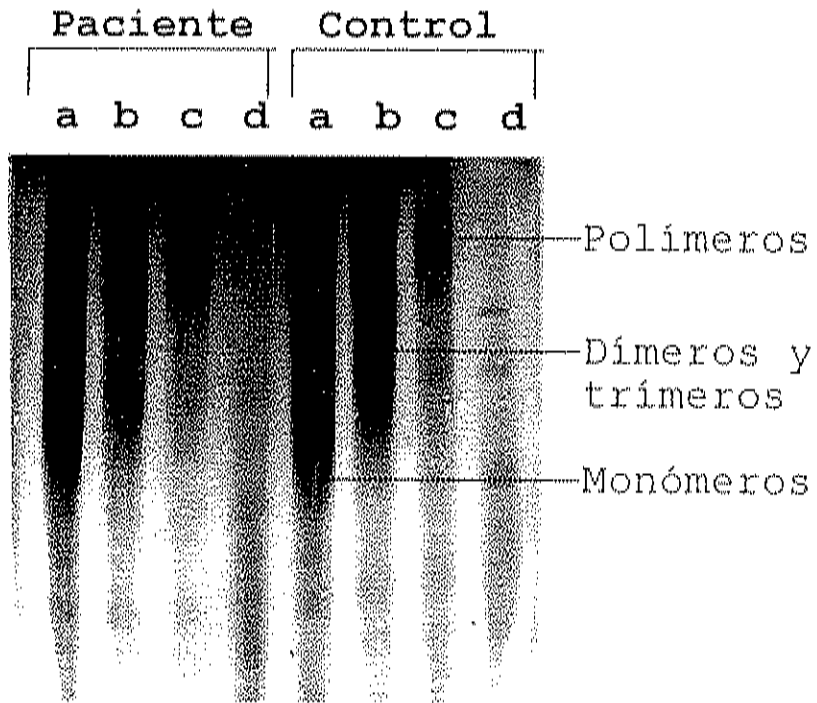


Figura 14. Electroforesis, en condiciones nativas (4-15%), de las tres fracciones de IgA1. La fracción de afinidad baja (a) estuvo enriquecida con IgA1 monomérica. La de afinidad intermedia (b) estuvo constituida por abundantes dímeros y trímeros de IgA1. La IgA1 macromolecular (c) fue el componente principal de la fracción de alta afinidad a la jacalina. La proteína remanente fue eluida de la columna a pH 3.6 (d).

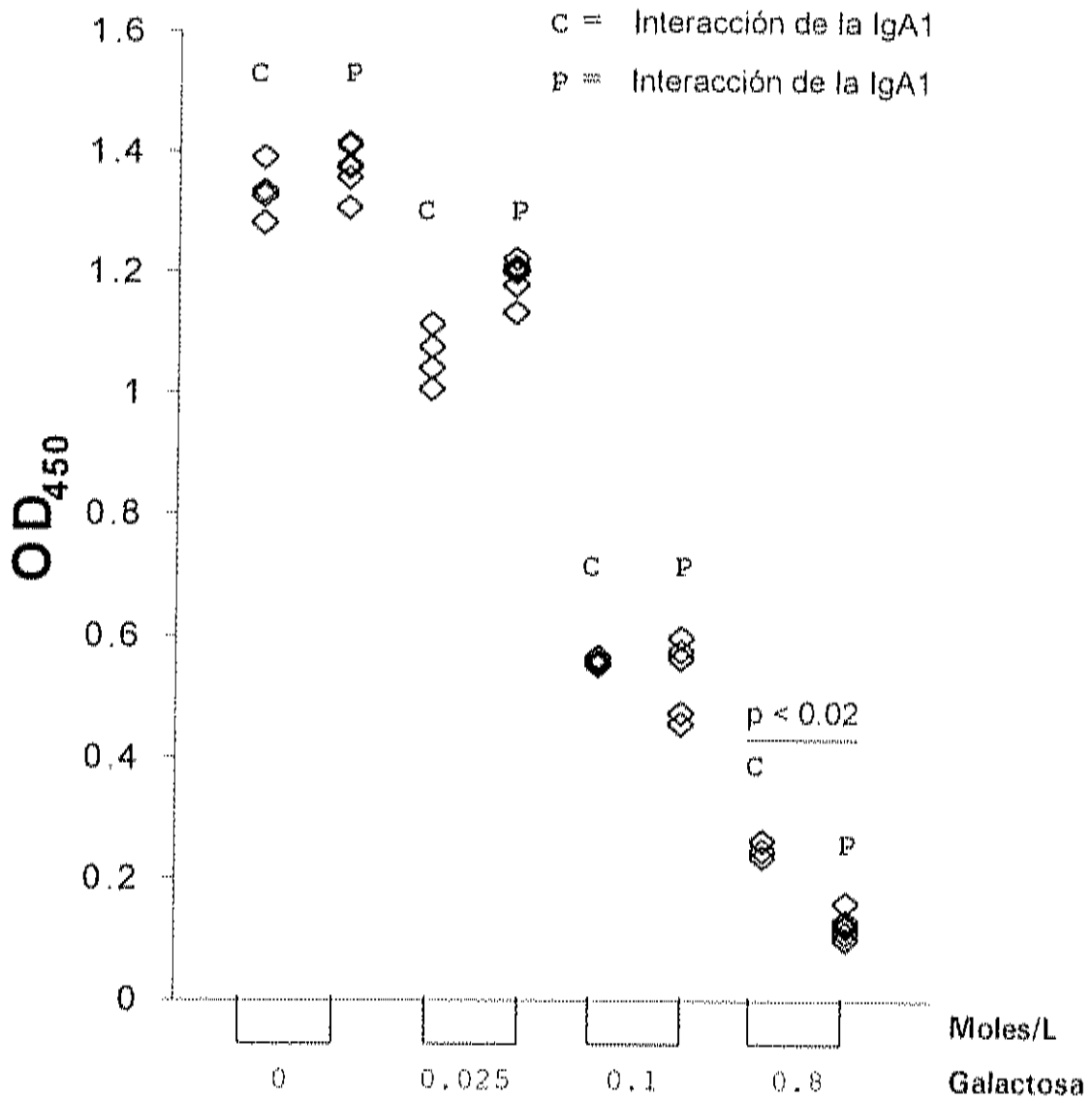


Figura 15. Inhibición de la interacción IgA1-jacalina. La interacción entre la IgA1 de los pacientes y la jacalina fue fuertemente inhibida en presencia de galactosa 0.8 M.

Ensayos de Manchas

Se detectaron diferencias en la intensidad de las manchas, generadas por la interacción entre las lectinas y la IgA1 nativa, de los pacientes con respecto a la de los controles. La IgA1 de los pacientes, presentó mayor interacción que la de los controles con las lectinas SNA y MMA y menor interacción con ECA, LcH, Con A, SEA, RCAI, WGA y AAA. Esta diferencia se observó, en las fracciones de afinidad baja e intermedia, pero fue más notoria en las fracciones de alta afinidad (eluidas con galactosa 0.8 M). Diferencias menores, en la intensidad de las manchas, fueron generadas por la interacción de la IgA1 y la lectina PNA, mientras que no se observaron cambios en la interacción con DBA (Figura 16).

Lectinoinmunoensayos con la IgA1 Nativa

Para corroborar las diferencias observadas en los ensayos de manchas, se realizaron lectinoinmunoensayos. Para ello, primero se realizaron ensayos de afinidad con la IgA1 nativa eluida con galactosa 0.8 M en un solo paso. Las diferencias de afinidad, entre la IgA1 de los pacientes y de los controles, pueden observarse en las figuras 17 a 18. La IgA1 de los pacientes mostró una interacción mayor con SNA que con la IgA1 de los controles, pero una interacción menor con las lectinas ECA, LcH, AAA, ConA, WGA y RCAI.

La interacción del grupo de once lectinas, fue ensayada después con cada una de las fracciones de IgA1 con diferente afinidad a jacalina. Los ensayos con la fracción de alta afinidad (IgA1 macromolecular), mostraron

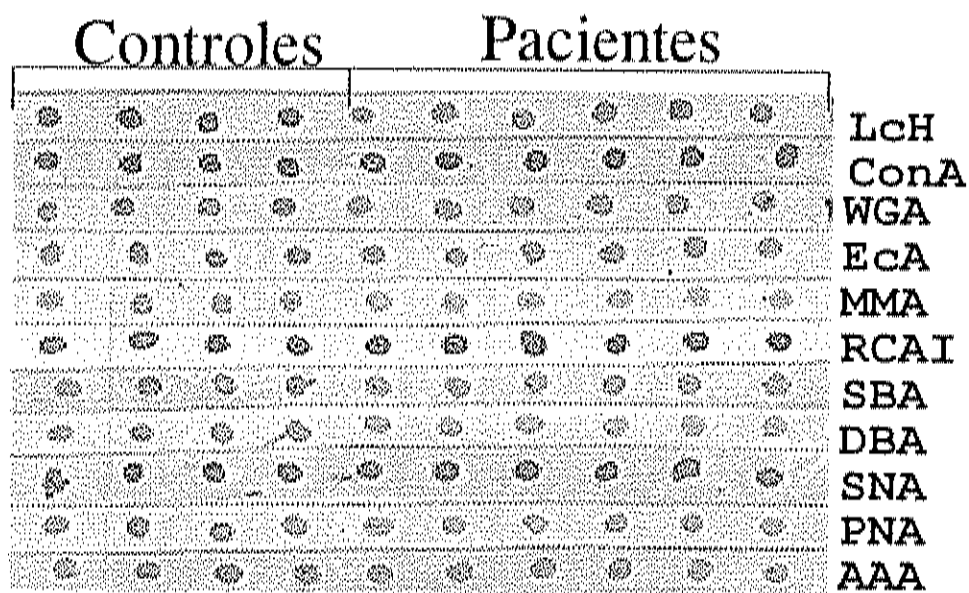


Figura 16. Ensayos de manchas con la IgA1 de alta afinidad a la jacalina. La señal generada por la interacción de la IgA1 con las lectinas SNA y MMA fue mayor en los pacientes, mientras que las señales producidas con las lectinas ECA, RCAI, LcH, AAA, SBA, ConA y WGA fueron menores respecto a las de los controles.

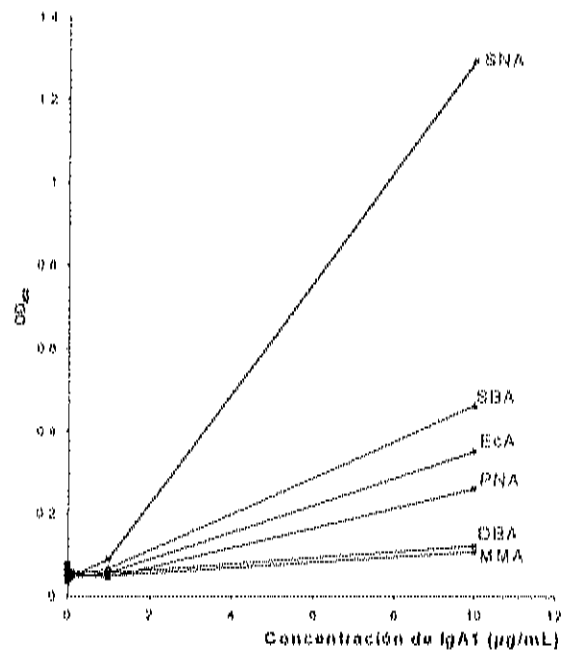
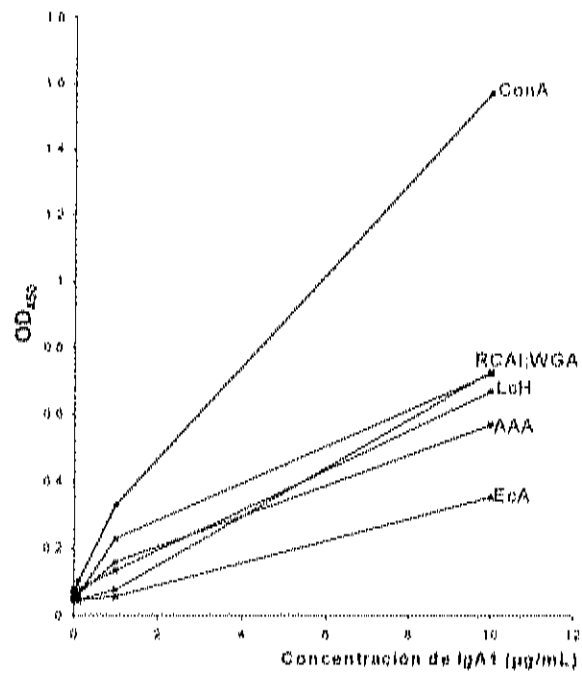


Figura 17. Interacción entre la IgA1 de los pacientes, eluida como fracción total con galactosa 0.8 M, y once lectinas de origen vegetal.

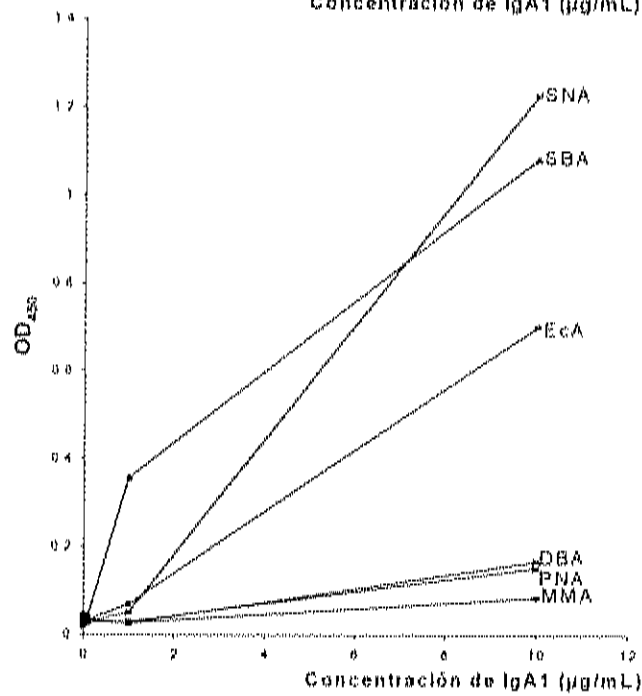
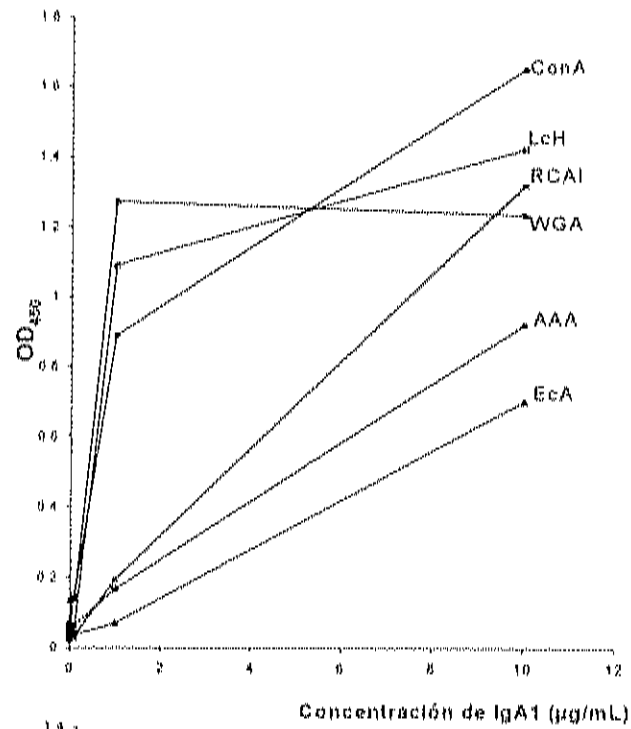


Figura 18. Interacción entre la IgA1 de los sujetos controles, eluida como fracción total con galactosa 0.8 M, y once lectinas de origen vegetal.

un patrón de absorbancia general similar al de la IgA1 eluida en un solo paso. La afinidad entre SNA y la IgA1 macromolecular de los pacientes, fue significativamente mayor que la de los controles (Figura 19).

La lectina LCH, originó una señal baja con las tres fracciones (de baja, intermedia y alta afinidad a jacalina) de IgA1 de los pacientes. Sin embargo, las fracciones de afinidad baja e intermedia, mostraron una menor interacción con la lectina ($p < 0.02$) con relación a la de alta afinidad (Figura 20).

Las diferencias de absorbancia, a 450 nm, generadas por la interacción entre la IgA1 y las lectinas individuales, fueron posteriormente evaluadas con base en la relación de absorbancia generada por pares de lectinas afines hacia estructuras oligosacáridas relacionadas. Con este análisis, pudo observarse que las relaciones SNA/PNA y SNA/MMA (Figura 21) fueron significativamente mayores en la IgA1 polimérica de los pacientes que en la de los controles ($p < 0.02$), mientras que no hubo diferencia en la relación MMA/PNA (Tabla 1).

Al mismo tiempo, las relaciones ECA/SNA, ECA/MMA, RCAI/SNA, RCAI/MMA (Figura 22), LCH/AAA y WGA/SNA (Figura 23), obtenidas con la fracción IgA1 de alta afinidad de los pacientes, fueron significativamente menores que las de los controles ($p < 0.02$).

Ensayos de Afinidad con los Fragmentos Bisagra y Cristalizable

Los Fragmentos Cristalizables, derivados de la digestión de la IgA1 polimérica de alta afinidad a jacalina, de los pacientes mostraron una relación SNA/PNA

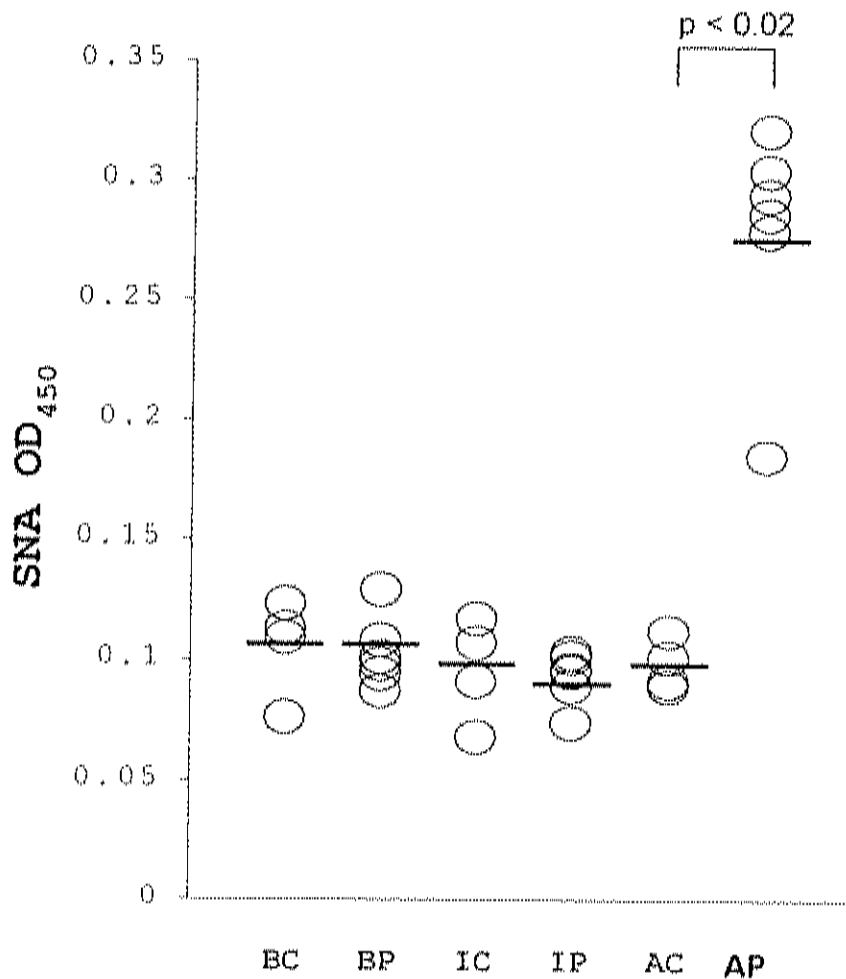


Figura 19. Interacción de la lectina SNA con las IgA1 de baja afinidad a jacalina (L), afinidad intermedia (I) y alta afinidad (A). Se observó una diferencia significativa entre pacientes y controles solamente con la IgA1 de alta afinidad a la jacalina.

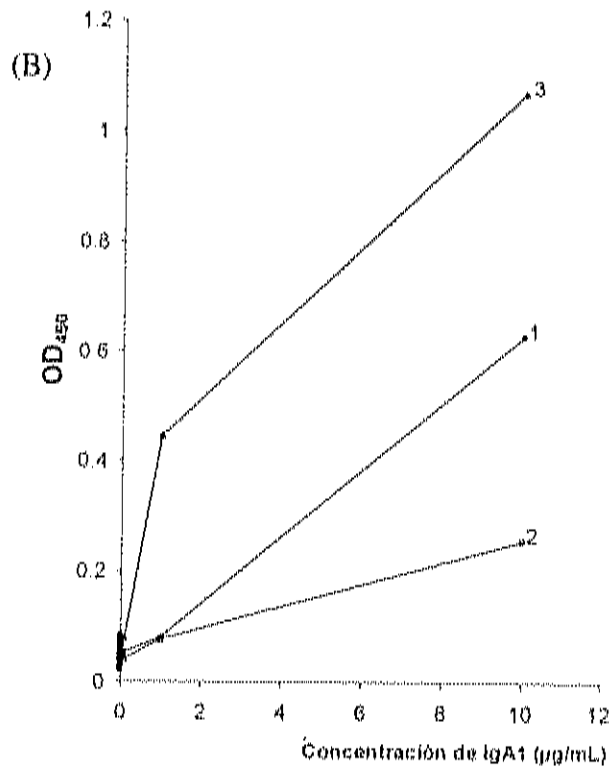
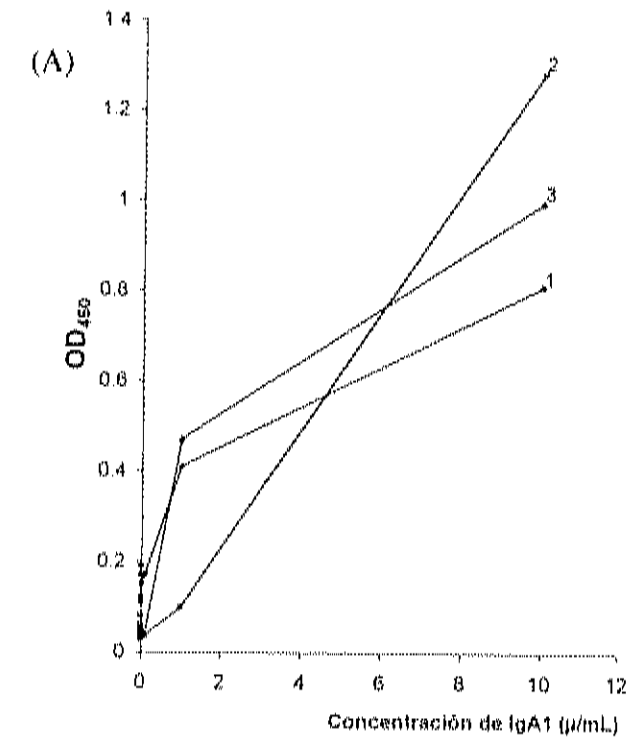


Figura 20. Interacción de las fracciones de IgA1, de baja (1), intermedia (2) y alta (3) afinidad a jacalina, con la lectina LcH. La interacción de la IgA1 de afinidad baja e intermedia de los controles (A) con la LcH, produjo una señal más intensa ($p < 0.02$) que la de los pacientes (B).

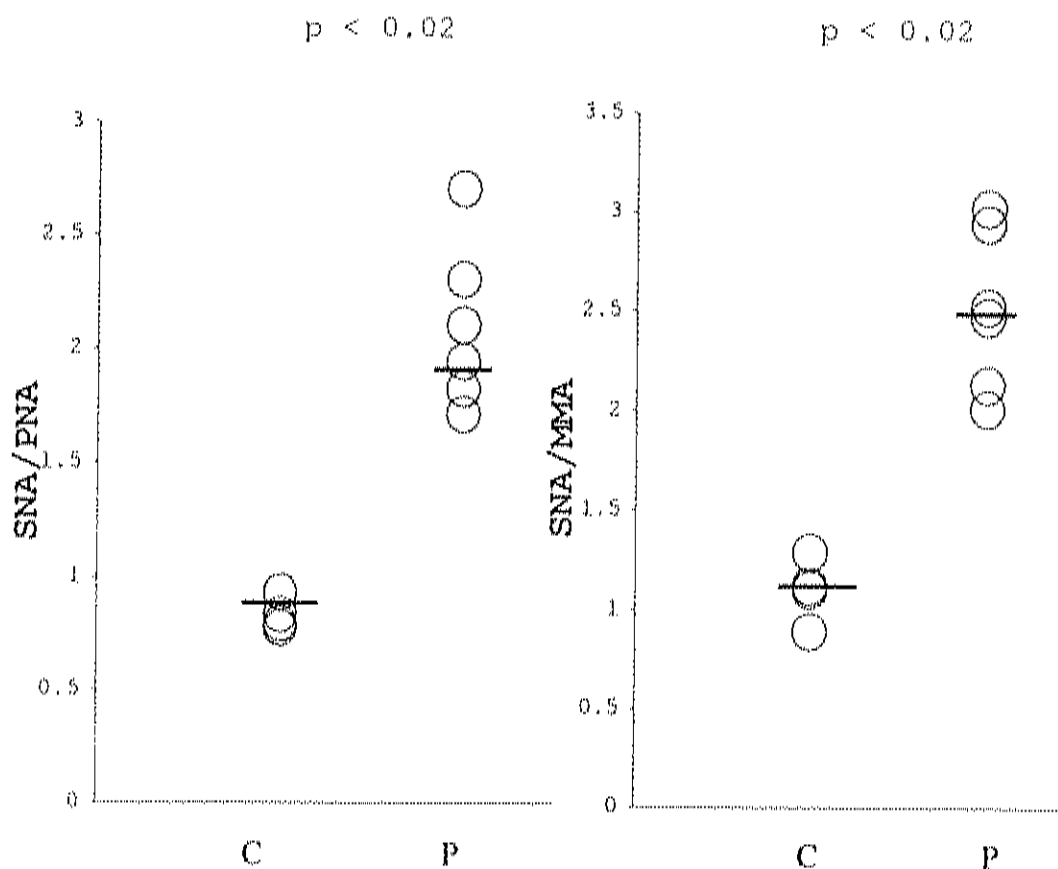


Figura 21. La interacción de la SNA con la IgA1 macromolecular de los pacientes fue significativamente mayor que con la de los controles y afectó fuertemente las relaciones SNA/PNA y SNA/MMA. La barra indica la media de cada grupo calculada por transformación logarítmica.

Tabla 1. Relaciones de Absorbancia de las Lectinas
Ensayadas con la IgA1 Macromolecular Nativa.

	Pacientes ¹	Controles ²	p
SNA/PNA	2.09 (\pm 0.36)	0.83 (\pm 0.07)	< 0.02
SNA/MMA	2.52 (\pm 0.04)	1.10 (\pm 0.16)	< 0.02
MMA/PNA	0.77 (\pm 0.13)	0.76 (\pm 0.08)	= 0.80
ECA/SNA	0.55 (\pm 0.09)	2.13 (\pm 0.31)	< 0.02
ECA/MMA	1.45 (\pm 0.24)	2.40 (\pm 0.35)	< 0.05
RCAI/SNA	0.33 (\pm 0.04)	1.06 (\pm 0.46)	< 0.02
RCAI/MMA	1.19 (\pm 0.24)	1.41 (\pm 0.35)	< 0.05
LcH/AAA	1.13 (\pm 0.06)	1.47 (\pm 0.08)	< 0.02
WGA/SNA	2.79 (\pm 0.20)	7.44 (\pm 0.53)	<0.02

Los valores se expresan como la media \pm DE. La media del grupo fue calculada por transformación logarítmica.
¹Seis pacientes. ²Cuatro controles sanos.

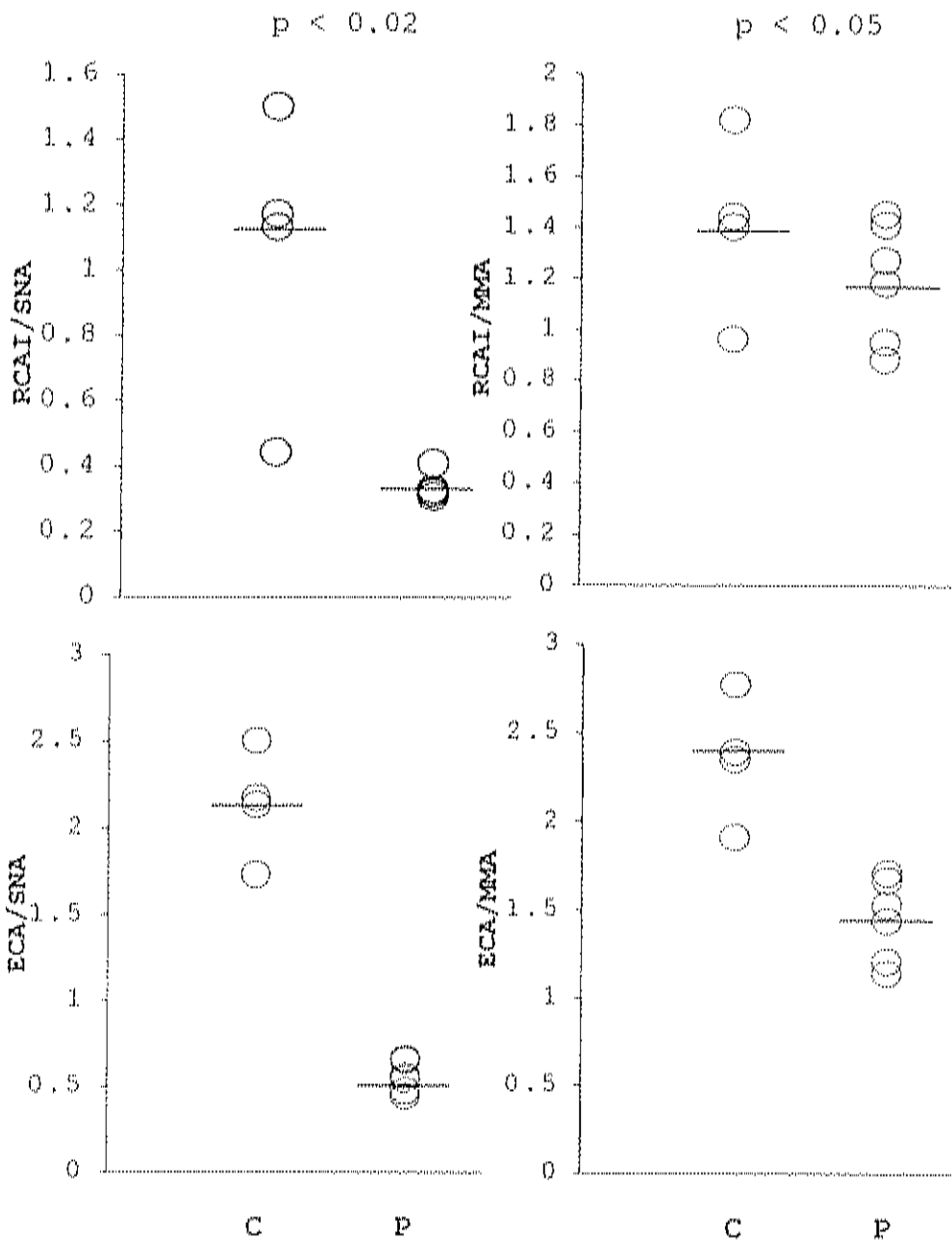


Figura 22. La elevada interacción, de la SNA con la IgA1 macromolecular de los pacientes, determinó que las relaciones RCAI/SNA, RCAI/MMA, ECA/SNA Y ECA/MMA fueran significativamente menores que las de los controles. La barra señala la media calculada por transformación logarítmica. P, pacientes; C, controles.

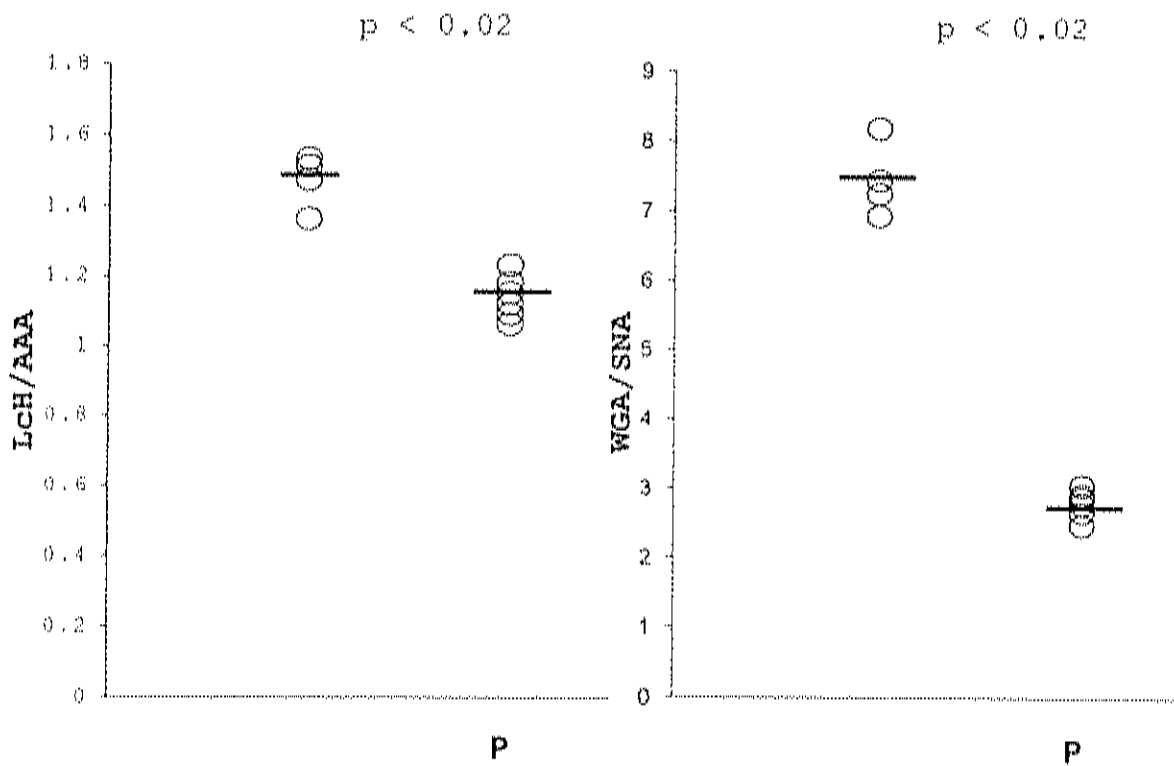


Figura 23. La relaciones LCH/AAA y WGA/SNA fueron significativamente menores con la IgA1 macromolecular de los pacientes que con la de los controles. La barra indica la media de cada grupo calculada por transformación logarítmica.

y SNA/MMA, significativamente mayor que la obtenida a partir de los Fragmentos Cristalizables de la IgA1 de los sujetos controles (Figura 24), confirmando así la información obtenida con la IgA1 nativa. No se observó diferencia en la relación MMA/PNA, mientras que las relaciones ECA/SNA, LcH/AAA y WGA/SNA de los pacientes (Tabla 2) fueron similares a las obtenidas con la proteína nativa y, por lo tanto, significativamente menores que las de los controles ($p < 0.02$).

Con excepción de las relaciones SNA/PNA y MMA/PNA, no se observaron cambios de afinidad significativos en las señales generadas por la interacción entre los oligosacáridos de la región bisagra y las lectinas ensayadas. Las relaciones SNA/PNA y MMA/PNA (Tabla 3) obtenidas con los fragmentos bisagra de la IgA1 macromolecular de los pacientes, fueron mayores que las obtenidas a partir del análisis de los fragmentos bisagra controles. La relación SNA/MMA fue similar entre pacientes y controles (Tabla 3).

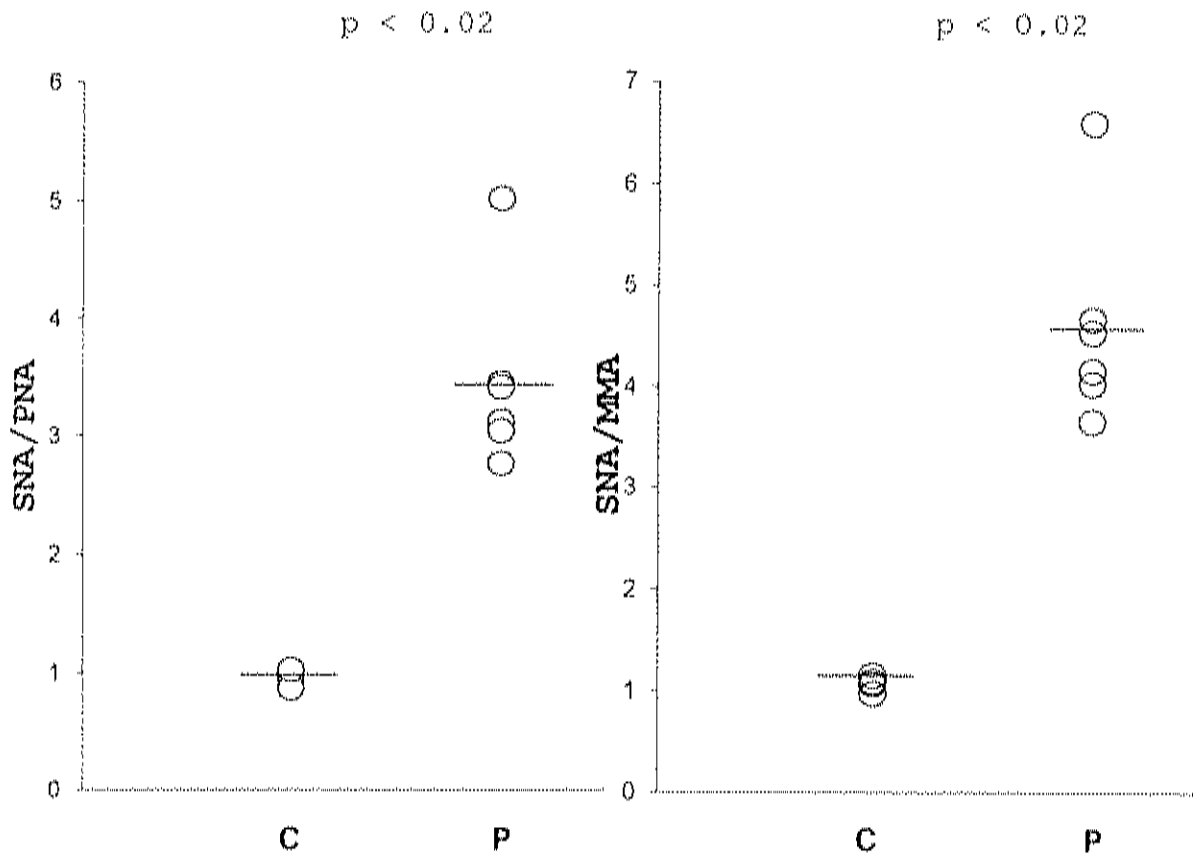


Figura 24. Las relaciones SNA/PNA y SNA/MMA, fueron significativamente mayores con los Fc de la IgA1 macromolecular de los pacientes que con los de los controles, confirmando así los resultados obtenidos con la IgA1 macromolecular nativa. La barra indica la media de cada grupo calculada por transformación logarítmica.

Tabla 2. Relaciones de Absorbancia de las Lectinas
Con los Fragmentos Fc de la IgA1 Macromoleculat

	Pacientes ¹	Controles ²	p
SNA/PNA	3.47 (± 0.80)	0.94 (± 0.07)	< 0.02
SNA/MMA	4.60 (± 1.04)	1.07 (± 0.08)	< 0.02
MMA/PNA	0.73 (± 0.06)	0.90 (± 0.06)	= 0.71
ECA/SNA	0.27 (± 0.06)	0.85 (± 0.06)	< 0.02
ECA/MMA	1.28 (± 0.24)	1.89 (± 0.06)	< 0.05
RCAI/SNA	0.57 (± 0.09)	1.53 (± 0.15)	< 0.02
RCAI/MMA	1.15 (± 0.17)	1.80 (± 0.12)	< 0.05
LcH/AAA	0.22 (± 0.06)	0.86 (± 0.12)	< 0.02
WGA/SNA	0.61 (± 0.13)	1.16 (± 0.08)	< 0.02

Los valores se expresan como media ± DE. La media del grupo fue calculada por transformación logarítmica.¹Seis individuos conformaron el grupo de pacientes.²Cuatro el de sujetos controles.

Tabla 3. Relaciones de Absorbancia de las Lectinas con los Fragmentos Bisagra de la IgA1 Macromolecular.

	Pacientes ¹	Controles ²	p
SNA/PNA	5.86 (\pm 0.48)	4.48 (\pm 0.36)	< 0.02
SNA/MMA	7.19 (\pm 0.48)	6.57 (\pm 0.36)	= 0.39
MMA/PNA	1.26 (\pm 0.48)	0.65 (\pm 0.36)	< 0.02
RCAI/SNA	0.59 (\pm 0.07)	0.90 (\pm 0.10)	< 0.02
RCAI/MMA	0.47 (\pm 0.09)	1.02 (\pm 0.11)	< 0.02

Los valores están expresados como medias \pm DE. La media del grupo fue calculada por transformación logarítmica.

¹Seis individuos del grupo de pacientes.

²Cuatro controles.

DISCUSIÓN

En los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), es frecuente observar niveles elevados de IgA sérica (Gill *et al*, 1981; Triolo *et al*, 1984; Ardawi *et al*, 1994; Eguchi *et al*, 1995; Figueredo *et al*, 1996; Rodríguez-Segade *et al*, 1996). En muchos de esos casos, el aumento de la IgA se produce a expensas de la IgA1, la subclase de IgA más abundante en el suero humano (Ohmuro *et al*, 1993).

La concentración de IgA1, en el torrente circulatorio, normalmente depende de varios factores. Entre ellos, de la tasa de síntesis y degradación de la molécula. Sin embargo, hasta hoy no se sabe si la elevación de IgA1 es el resultado del aumento en su síntesis o de deficiencias en su aclaramiento.

La remoción de la IgA, del torrente circulatorio, depende de la estructura de los oligosacáridos unidos covalentemente a la molécula (Rocatello *et al*, 1993). La mayoría de los receptores involucrados en el reconocimiento de la IgA (receptores hepáticos), son sensibles a pequeños cambios de los carbohidratos y particularmente a los cambios en el contenido de ácido siálico (Chuang *et al*, 1997; Iwase *et al*, 1999; Leung *et al*, 1999).

En la IgA1, los responsables de la interacción de la inmunoglobulina con los receptores hepáticos (Chuang *et al*, 1997; Iwase *et al*, 1999) son los oligosacáridos N- y O- ligados a sitios conservados y, por ello, este trabajo fue enfocado al estudio de los posibles cambios en los oligosacáridos del fragmento cristalizante de la IgA1 sérica de pacientes con DM2.

La IgA1 fue purificada del suero de seis pacientes diabéticos, que tenían una concentración elevada de esta proteína, y de cuatro sujetos sanos controles. Los pacientes fueron seleccionados entre un grupo inicial de 23 de ellos, en quienes se demostró el aumento simultáneo de las IgA e IgA1. Estos primeros resultados, coincidieron con los publicados por Ohmuro y colaboradores (1993) y confirmaron la importancia de la contribución de la IgA1 en el aumento de la IgA sérica total.

La IgA1 sérica, de pacientes y controles, fue purificada y fraccionada dependiendo de su afinidad diferencial hacia la lectina jacalina (Iwase et al, 1999), en subpoblaciones de IgA1 con diferentes glicofomas de la proteína y un contenido variable de estructuras monoméricas y poliméricas (Hiki et al, 1999). La cromatografía de afinidad con jacalina, ha sido un método ampliamente usado en procesos de separación, en un solo paso, de la IgA1 (To et al, 1995; Iwase et al, 1999). Sin embargo, se ha demostrado que esta lectina tiene afinidad también por otras glicoproteínas séricas, que tienen el común denominador de poseer O-oligosacáridos, incluyendo el inhibidor C1, la gonadotropina coriónica, plasminógeno, factor de coagulación X, fetuina, e IgD (Zehr y Litwin et al, 1987; Hortin y Trimble, 1990). Aunque estas proteínas séricas se encuentran en mucho menor concentración que la IgA1, su eliminación constituyó un paso importante debido a la interferencia potencial que podrían ejercer en los análisis de afinidad por lectinas. Por ello, en este trabajo, la IgA1 fue purificada utilizando tres etapas cromatográficas. En la primera, se aislaron las inmunoglobulinas totales (Vázquez-Moreno et al, 1992). La

IgA fue aislada, posteriormente, por cromatografía de afinidad y, finalmente, la IgA1 fue purificada con la matriz Agarosa-jacalina (Skea *et al*, 1988). En el paso de purificación final, la IgA1 fue subfraccionada en IgA1 de baja afinidad (eluida con galactosa 0.025 M), IgA1 de afinidad intermedia (eluida con galactosa 0.1 M) e IgA1 de afinidad alta a la jacalina, eluida con galactosa 0.8 M (Hiki *et al*, 1999). El perfil electroforético cualitativo, en condiciones nativas, de las tres fracciones de IgA1 de los pacientes y de los controles fue similar: La fracción de baja afinidad, estuvo constituida principalmente por IgA1 monomérica, mientras que la fracción de afinidad intermedia presentó abundancia de dímeros y trímeros. En este perfil electroforético, que coincide con el reportado por otros autores (Hiki *et al*, 1996; Hiki *et al*, 1999), la IgA1 de alta afinidad estuvo enriquecida en estructuras macromoleculares. En los pacientes, esta fracción constituyó hasta el 25% de la IgA1 total eluida de la columna de Agarosa-jacalina, mientras que en los controles representó no más del 14%. Por lo tanto, es ésta la fracción de IgA1 macromolecular que contribuye a la elevación de la IgA total macromolecular que, en los pacientes con DM2, suele estar elevada (Triolo *et al*, 1984).

Durante años, se ha tratado de explicar el aumento de IgA polimérica en la DM2 (Triolo *et al*, 1984) como el reflejo de posibles alteraciones en los mecanismos normales de aclaramiento de la IgA polimérica o del posible aumento de los procesos de síntesis y polimerización de la IgA. Sin embargo, hasta ahora, no se han reportado cambios en la actividad de las células productoras de IgA ni en los procesos de polimerización

de la molécula. En contraparte, con experimentos de mutagénesis dirigida, se ha demostrado que los cambios en los N-oligosacáridos de la IgA1 promueven la formación de estructuras poliméricas (Chuang et al, 1997) y que la desialilación, *in-vitro*, de los O-oligosacáridos de la región bisagra de la IgA1, promueve la agregación de las estructuras monoméricas (Iwase et al, 1999).

En este estudio, la interacción de la IgA1 macromolecular de los pacientes y la jacalina, fue fuertemente inhibida con galactosa (Aucounturier et al, 1987). Esto sugiere, que la interacción de la inmunoglobulina con la lectina es menos intensa que con la IgA1 de los controles.

Una posible explicación de éste último fenómeno, se haya en el conocimiento que se tiene acerca de la forma en la que la jacalina interacciona con los O-glicanos de la IgA1. La lectina reconoce a los antígenos Gal- β 1-3-GalNAc (AgT) y GalNAc (AgTn) de la IgA1, pero su afinidad hacia el AgT es mayor que hacia el AgTn (Hiki et al, 1996) y, se reduce en ambos casos, si los antígenos están sialilados (Hortin y Trimble, 1990). Por lo tanto, la menor interacción de la IgA1 de los pacientes con la jacalina, podría deberse a una relación AgT/AgTn menor que la de la IgA1 de los controles, o bien a una hipersialilación de los O-glicanos de la IgA1 de los pacientes. En ambos casos, los resultados representarían una desviación de la estructura oligosacárida de la IgA1 macromolecular de los pacientes con respecto a la de los controles.

Para estudiar las posibles diferencias en la glicosilación de la IgA1, de pacientes y controles, se usaron once lectinas de origen vegetal con una



especificidad hacia carbohidratos bien conocida. Es por ello, que han sido utilizadas ampliamente para caracterizar las diferencias en los oligosacáridos de distintas glicoproteínas (Debray *et al*, 1981; Turner, 1992; Katoh *et al*, 1993; Wold *et al*, 1994; Tamao, 1996; Goodarzi y Turner, 1997; Wu *et al*, 1997; Kabir, 1998).

La glicosilación global de la IgA1, se evaluó primero con ensayos de manchas de las fracciones de IgA1 de alta, intermedia y baja afinidad a la jacalina. La IgA1 de los pacientes, presentó mayor interacción con las lectinas SNA y MMA y menor interacción con ECA, LCH, Con A, SBA, RCAI, WGA y AAA, que con la IgA1 de los controles. Esta diferencia se observó en las fracciones de afinidad baja e intermedia, pero fue más notoria en las fracciones de alta afinidad. Diferencias menores en la intensidad de las manchas fueron generadas por la interacción de la IgA1 y la lectina PNA, mientras que no se observaron cambios en la interacción con DBA.

Los resultados de los lectinoinmunoensayos en placa, confirmaron los obtenidos en los ensayos de manchas. Debido a que las lectinas SNA y MMA reconocen la presencia de ácido siálico terminal en los oligosacáridos (Tamao, 1996), estos resultados sugirieron un aumento en el contenido de ácido siálico de los glicanos de la IgA1 macromolecular de los pacientes, en relación con la IgA1 de los controles.

El ácido siálico es un carbohidrato comúnmente encontrado en el extremo no reductor de los oligosacáridos (Mattu *et al*, 1998). En la IgA1 sérica, está ligado en enlaces α 2-6 y α 2-3 a los N-oligosacáridos del fragmento cristalizable y a los O-oligosacáridos de la región bisagra (Field *et al*, 1994; Mattu *et al*, 1998). Su

presencia es de importancia fundamental para el desempeño funcional de la inmunoglobulina (Chuang y Morrison, 1997) y, por su carga electronegativa, parece jugar un papel importante en la autoagregación de la IgA1 (Iwase *et al*, 1999). Sin embargo, un aumento considerable en la cantidad de ácido siálico terminal puede ejercer un efecto negativo en los procesos de aclaramiento normales de la IgA1 sérica (Rifai *et al*, 1989).

Se sabe, que la remoción de la IgA1 macromolecular sérica, es mediada por su interacción con receptores hepáticos (Rifai *et al*, 1989; Rocatello *et al*, 1993) que reconocen asialoglicoproteínas (Rocatello *et al*, 1993). Estos receptores, reconocen a las glicoproteínas que han perdido ácido siálico terminal y responden removiéndolas del plasma (Rocatello *et al*, 1993), manteniendo así el equilibrio entre los procesos de síntesis y degradación de las glicoproteínas séricas. Por lo tanto, una consecuencia inmediata de la hipersialilación de la IgA1, en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), podría ser la disminución del aclaramiento de la molécula, debido a la falta de reconocimiento de la IgA1 hipersialilada por los asialoreceptores, y su subsecuente elevación en el torrente circulatorio.

Por otro lado, la hipersialilación de la IgA1, explicaría causalmente la asociación de la DM2 y la nefropatía por IgA, una enfermedad en la que la IgA1 tiene un claro componente patogénico (Gans *et al*, 1992; Reinold *et al*, 1992; Kokubo *et al*, 1999; Orfila *et al*, 1998; Feehally y Allen, 1999; Hiki *et al*, 1999). En ésta última, Leung y colaboradores, han demostrado un incremento en el grado de sialilación α 2-3 de la IgA1, que podría, por el efecto enmascarador del ácido siálico sobre los procesos

de aclaramiento de la molécula, contribuir a su aumento en el suero (Leung et al, 1999). Sin embargo, en los pacientes diabéticos, el aumento de ácido siálico en la IgA1 podría ser parte de un proceso general de hipersialilación de las glicoproteínas séricas, ya que se ha demostrado que el contenido de ácido siálico sérico se eleva con frecuencia en estos pacientes (Chari y Nath, 1984).

Por otro lado, algunos reportes señalan la importancia de la IgA1 macromolecular en la formación de los complejos inmunes séricos (Iwase et al, 1999). En los pacientes diabéticos, los complejos inmunes con IgA, representan a una fracción importante de la IgA sérica y han sido relacionados con la patogénesis de las complicaciones vasculares (Triolo et al, 1984; Triolo et al, 1987). Tanto los eventos de formación de complejos inmunes, como su participación en los procesos de daño vascular, podrían ser explicados con base en el carácter aniónico de las IgA1 hipersialiladas.

Para identificar los sitios de hipersialilación de la IgA1 macromolecular de los pacientes, el contenido de ácido siálico fue analizado, indirectamente, por la relación de absorbancia a 450 nm generada por la interacción de la IgA1 con las lectinas con afinidad relacionada: SNA, MMA y PNA. Una reacción positiva con PNA indica la presencia del antígeno Gal- β (1-3)-N-acetilgalactosamina sin ácido siálico terminal (Hiki et al, 1996; Leung et al, 1999). Una reacción positiva con MMA indica la presencia de ácido siálico terminal (α 2-3) ligado a galactosa y una reacción positiva con SNA indica la presencia de ácido siálico (α 2-6) ligado a galactosa o

a N-acetilgalactosamina (Leung et al, 1999). Así, las relaciones SNA/MMA, SNA/PNA y MMA/PNA sirvieron para conocer el contenido relativo de siálico en la molécula nativa.

Las relaciones SNA/PNA y SNA/MMA, obtenidas con la IgA1 de alta afinidad a jacalina de los pacientes, fueron significativamente mayores que las obtenidas con la IgA1 de los controles, mientras que no se detectó una diferencia significativa en la relación MMA/PNA. Estos resultados, apoyaron indirectamente la hipótesis de que la hipersialilación de la IgA1 macromolecular de los pacientes es a expensas del aumento de ácido siálico ligado en enlaces $\alpha 2-6$.

Los residuos de ácido siálico, se pueden enlazar en $\alpha 2-6$ a los residuos de galactosa ubicados tanto en O-oligosacáridos como en N-oligosacáridos (Mattu et al, 1998). Por ello, fue necesario separar la región bisagra (con O-oligosacáridos y el fragmento cristalizable (Fc; con los dominios CH2 y CH3) de la IgA1 macromolecular.

Los resultados obtenidos con los Fc, corroboraron los obtenidos con la IgA1 macromolecular nativa. Las relaciones SNA/PNA y SNA/MMA, obtenidas con los Fc de los pacientes, fueron significativamente mayores que las obtenidas con los Fc de los controles. No se observó diferencia en la relación MMA/PNA. Estos resultados sugieren que la hipersialilación de los N-oligosacáridos de la IgA1 macromolecular de los pacientes, se debe al aumento de los residuos de ácido siálico unidos en enlace $\alpha 2-6$.

En los ensayos con los fragmentos bisagra de la IgA1 macromolecular de los pacientes, las relaciones SNA/PNA y

MMA/PNA, fueron significativamente mayores que las de los controles, mientras que, la relación SNA/MMA fue similar entre pacientes y controles. El aumento relativo, en la interacción de los fragmentos bisagra de la IgA1 de pacientes con la MMA, con respecto a la señal producida por la IgA1 nativa, indicó un aumento importante en el índice de sialilación α 2-3 en esta región de la molécula. Estos resultados, se suman a los obtenidos en los ensayos de inhibición con galactosa y apoyan la hipótesis de que los O-glicanos de la región bisagra están hipersialilados. Además, el efecto enmascarador del ácido siálico, explica la reducción en la interacción de la IgA1 macromolecular de los pacientes con la lectina PNA (Leung et al, 1999).

Los resultados obtenidos con SNA, MMA y PNA, fueron confirmados por la señal generada con la interacción de la IgA1 de los pacientes, y la de sus Fc, con las lectinas Eca, RCAI, SBA, AAA y WGA, misma que fue baja en comparación con la generada por la IgA1 y los Fc controles.

La lectina RCAI, es una aglutinina específica para residuos de galactosa de los oligosacáridos complejos y muestra una reactividad débil hacia la galactosa O-ligada (Wu et al, 1997). Una reactividad fuerte con esta lectina, sugiere una completa galactosilación de las estructuras biantenarias. La lectina Eca, interacciona con estructuras complejas que tienen ramas polilactosamias, especialmente con tri y tetraantenarios. Se ha demostrado, que la interacción de ambas lectinas con sus ligandos, es reducida por la presencia de ácido siálico (Wu et al, 1997).

Las relaciones RCAI/SNA, RCAI/MMA, Eca/SNA y Eca/MMA, obtenidas con la IgA1 (y los Fc) de los pacientes fueron significativamente menores que las de los controles. Estos resultados sugirieron, que la interacción de Eca y RCAI con los oligosacáridos de la IgA1 (y los Fc) de los pacientes pudo haber sido enmascarada por la hipersialilación de estas moléculas.

El mismo efecto de enmascaramiento, pudo haberse producido en la interacción entre la IgA1 (y Fc) de los pacientes y las lectinas SEA y WGA. Diversas publicaciones, señalan que SEA tiene elevada afinidad por N-acetilgalactosamina unida por enlaces alfa o beta a los O-oligosacáridos (Wu et al, 1997), en tanto que WGA reconoce, con un elevado grado de afinidad, a la N-acetilglucosamina (Debray et al, 1981). Ambas señales, son más intensas cuando sus ligandos azúcares están en forma libre y, menos intensas, cuando los ligandos forman parte de los oligosacáridos. La lectina WGA tiene, además, afinidad por el ácido siálico libre. Por lo tanto, la interacción reducida de esta lectina y la IgA1 de los pacientes (y los Fc) podría deberse a que la presentación predominante del ácido siálico, en los oligosacáridos de la molécula, es α 2-6. Esta hipótesis, fue confirmada con la relación WGA/SNA, que en los pacientes fue significativamente menor que la obtenida con los controles.

La interacción de las lectinas, LcH y AAA, con la IgA1 (y los Fc) de los pacientes también originó una señal baja. Pero a diferencia de las lectinas precedentes, este resultado se observó con las tres fracciones de IgA1 (de baja, intermedia y alta afinidad a la jacalina).

Lens culinaris (LCH) tiene afinidad por N-oligosacáridos cortos, que terminan en GlcNAc o manosa, y presentan un residuo de fucosa en el centro quitobiosa (Wold *et al.*, 1994). Las GlcNAc bisectarias, en los oligosacáridos, reducen su interacción con la lectina y, si los biantenarios no tienen fucosa en el centro quitobiosa, la lectina los reconoce con menor afinidad. La lectina LCH, también tiene afinidad por biantenarios silalilados, de hecho, su afinidad es mayor cuando las secuencias oligosacáridas están sustituidas con ácido siálico en posición C-6 (Debray *et al.*, 1981). Esto último, permite suponer que la interacción reducida entre LCH y la IgA1 de los pacientes, no fue producida por interferencia de ácido siálico, sino por la disminución de centros de fucosa. Adicionalmente, la disminución del contenido de fucosa fue corroborada por la señal baja generada por la interacción entre la lectina AAA (específica para fucosa enlazada en alfa a los oligosacáridos) y la IgA1 (y los Fc) de los pacientes.

La IgA1 y los Fc, fueron ensayados también con la lectina Concanavalina A (ConA), que interactúa con gran afinidad con cadenas oligomanosas y con afinidad moderada con biantenarios complejos (Debray *et al.*, 1981). Una N-acetilglucosamina bisectaria reduce su interacción con los oligosacáridos biantenarios (Debray *et al.*, 1981). La interacción de ConA con la IgA1 de pacientes y controles no mostró diferencias, lo que indicó la ausencia de cambios en el perfil de GlcNAc de los oligosacáridos bisectarios entre los pacientes y los controles.

Finalmente, tampoco hubo diferencias significativas en la interacción de la IgA1, de controles y pacientes, con DBA. Esta última, es una lectina con afinidad hacia N-

acetilgalactosamina (Wu *et al*, 1997), un antígeno que representa a una muy pequeña fracción de los Oligosacáridos en la región bisagra (Tomana *et al*, 1999); por ello la señal fue baja, tanto en pacientes como en controles. Los resultados de los ensayos de afinidad con la IgA1 nativa y con las regiones bisagra, demostraron que no hay variaciones en la proporción de este antígeno entre la IgA1 de los pacientes y la de los controles.

CONCLUSIONES

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), es un síndrome plurimetabólico que constituye un desafío médico importante, debido a que ha alcanzado proporciones epidémicas a escala mundial y a su enorme impacto (derivado principalmente de las complicaciones vasculares que produce) sobre los índices de morbilidad y mortalidad en adultos.

El origen de la DM2, ha sido asociado con factores genéticos y con factores relacionados con el estilo de vida de las poblaciones. Su comportamiento clínico es insidioso y, durante su evolución natural, se presentan cambios bioquímicos y metabólicos de origen y participación patogénica oscuras.

La elevación de los niveles de IgA1 sérica, es uno de los cambios bioquímicos tempranos de la DM2 con origen e implicaciones patogénicas desconocidas. Se han realizado múltiples estudios con la finalidad de explorar la participación patogénica de la IgA1 y su relación con la aparición de complicaciones vasculares, pero ninguno de ellos ha explorado la existencia de posibles cambios en la estructura de la molécula, a pesar de que en los pacientes con DM2 hay elevación de IgA1 macromolecular sin un estímulo infeccioso previo.

Con el fin de buscar una posible explicación al aumento de la IgA sérica en los pacientes diabéticos, en este trabajo fueron analizados los oligosacáridos de la porción constante de la IgA1 de pacientes con DM2.

Los análisis, con una batería de lectinas de origen vegetal, brindaron información sobre la existencia de una desviación de la microheterogeneidad de la IgA1 de los

REFERENCIAS

- Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. 1995. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(11):1812-8
- ADA. 1996. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 19(suppl 1):S8-S15
- Aitman TJ, Todd JA. 1995. Molecular genetics of diabetes mellitus. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 9(3):631-56
- ALAD. 1995. Consenso sobre prevención, control y tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente. Ed. Antártica S.A.C.I.F.E. Buenos Aires, Arg. pp. 7-62
- Alexiewicz JM, Kumar D, Smogorzewski M, Massry SG. 1997. Elevated cytosolic calcium and impaired proliferation of B lymphocytes in type II diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis.* 30(1):98-104
- Allen AC. 1999. Methodological approaches to the analysis of IgA1 O-glycosylation in IgA nephropathy. *J of Nephrology.* 12(2):76-84
- American Diabetes Association. 1996. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 19(suppl 1):S8-S15

Ardawi MS, Nasrat HA, Bahmassy AA. 1994. Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients. *Diabet Med.* 11(4):384-7

Aucounturier P, Duarte F, Mihaesco E, Pineau N, Preud'homme JL. 1988. Jacalin, the human IgA1 and IgD precipitating lectin, also binds IgA2 of both allotypes. *J Immunol Methods.* 113:185-91

Barr VA, Scott LJ, Hubbard AL. 1995. Immunoabsorption of hepatic vesicles carrying newly synthesized dipeptidyl peptidase IV and polymeric IgA receptor. *J Biol Chem.* 270(46):27834-44

Bhoraskar AS, Narag SV, Raheja BS. 1997. Rise in plasma triglycerides: A simple early indicator of oxidative stress in urban asian indians. 16th International Diabetes Federation Congress. Abstracts, *Diabetologia supplement*; 1647

Biewenga J, Hiemstra PS, Steneker I, Daha MR. 1989. Binding of human IgA1 and IgA1 fragments to jacalin. *Mol Immunol.* 26(3):275-81

Bloomgarden ZT. 1997. The 32nd annual meeting of the European Association for the study of diabetes. *Diabetes Care.* 20(7):1198-201

Bloomgarden ZT. 1998. International diabetes federation meeting, 1997. Nephropathy, retinopathy, and glycation. *Diabetes Care.* 21(9):1560-6

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54

Cervený JD, Leder RD, Wayne CW. 1998. Issues surrounding tight glycaemic control in people with type 2 diabetes mellitus. *Ann Pharmacother.* 32:896-905

Crook M, Cartwright K, Lumb P, Worsley A. 2000. Serum sialic acid in young type-1 diabetic patients. *Diabet Res Clin Pract.* 47:119-122

Cullina MJ, Greally JF. 1993. A novel lectin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of IgA1 in serum and secretory IgA1 in secretions. *Clin Chim Acta.* 216:23-38

Cunningham J, Leffell M, Mearkle P, Harmatz P. 1995. Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism* 44(8):996-9

Chari SN, Nath N. 1984. Sialic acid content and sialidase activity of polymorphonuclear leucocytes in diabetes mellitus. *Am J Med Sci.* 288(1):18-20

Chen JW, Gall MA, Yokoyama H, Jensen JS, Deckert M, Parving HH. 1996. Raised serum sialic acid concentration in NIDDM patients with and without diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 19(2):130-4

Cheta D, Mihaescu S, Mihalache N. Immunoglobulin A in diabetics. 1982. *Med Interne*. 20(1):15-7.

Chuang PD, Morrison SL. 1997. Elimination of N-linked glycosylation sites from the human IgA1 constant region: effects on structure and function. *J Immunol*. 158(2):724-32

Danze PM, Tarjoman A, Rousseaux J, Fossati P, Dautrevaux M. 1987. Evidence for an increased glycation of IgG in diabetic patients. *Clin Chim Acta*. 166(2-3):143-53

Davidson MB. 1995. Clinical implications of insulin resistance syndromes. *Am J Med*. 99:420-6

Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. 1981. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem*. 117:41-55

Deepa R, Rema M, Mohan V. 1998. Lack of association between serum sialic acid levels and retinopathy in Type 2 diabetic patients. *Diab Res Clin Pract* 41:165-9

Do S, Lee KY. 1998. Jacalin interacts with Asn-linked glycopeptides containing multiantennary oligosaccharide structure with terminal α -linked galactose. *FEBS Letters*. 421:169-73

Eguchi K, Yagame M, Suzuki D, Jinde K, Naka R, Yano N, Nomoto Y, Sakai H, Miyazaki M. 1995. Significance of high levels of serum IgA and IgA-class circulating immune complexes (IgA-CIC) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 9(1):42-8

Endo T. 1996. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. *J Chromatog A*. 720:251-61

Feehally J, Allen SC. 1999. Structural features of IgA molecules which contribute to IgA nephropathy. *J Nephrol*. 12:66-75

Field MC, Amatayakul-Chantler S, Rademacher TW, Rudd PM, Dwek RA. 1994. Structural analysis of the N-glycans from human immunoglobulin A1: comparison of normal human serum immunoglobulin A1 with that isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem J*. 299:261-75

Figueredo A, Ibarra JL, Rodríguez A, Molino AM, Gómez-de la Concha E, Fernández-Cruz A, Patino R. 1996. Increased serum levels of IgA antibodies to hsp 70 protein in patients with diabetes mellitus: their relationship with vascular complications. *Clin Immunol Immunopathol*. 79(3):252-5

Fujimoto W, Boyko E, Chen KW, Leonetti D, Newell L, Wahl P. 1997. Visceral adiposity, blood pressure, and glucose are independent risk factors for coronary heart disease. 16th International Diabetes Federation Congress. Abstracts, *Diabetologia* supplement: 0109

Fujisawa T, Ikegami H, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, Hamada Y, Ueda H, Fukuda M, Ogiwara T. 1995. A mutation in the glucagon receptor gene (Gly40Ser): heterogeneity in the association with diabetes mellitus. *Diabetologia*. 38(8):983-5

Gans R OB, Ueda Yoshihiko, Ito S, Köhli R, Min I, Shafi M, Brentjens JR. 1992. The occurrence of IgA-Nephropathy in patients with diabetes mellitus may not be coincidental: A report of five cases. *Am J of Kidney Dis*. XX(3):255-260

Gill ChW, Bush S, Burleigh WM, Cooke-Gomes C. 1981. Elevation of IgA levels in the non-insulin-dependent (type II) diabetic patient. *Diabetes Care*. 4(6):636-9

Goers J. 1993. Immunochemical techniques. Laboratory Manual. Academic Press, Inc. San Diego, CA. pp.54-5

González-Villalpando C, Stern M, Arredondo-Pérez B. 1994. Utilización de servicios hospitalarios por pacientes diabéticos: Estudio en población abierta. *Revista de Salud Pública*. 36:415-19

Goodarzi MT, Turner GA, 1997. A lectin method for investigating the glycosylation of nanogram amounts of purified glycoprotein. *Glycoconj J*. 14(4):493-496

Gornik I, Maravic G, Dunic J, Flogel M, Lauc G. 1999. Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*. 32(8):605-8

Gurd ERN. 1972. Methods of enzymology. Carboxy-methylation. XXV:424-38

Hammes HP, Kiefel V, Laube H, Federlin K. 1990. Impaired agglutination of IgM resulting from non-enzymatic glycation in diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 9(1):37-42

Hanson RL, Elston RC, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. 1995. Segregation analysis of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Pima Indians: evidence for a major-gene effect. *Am J Hum Genet.* 57(1):160-70

Heremans JF. 1974. Immunoglobulin A. En: The Antigens. Vol. II. Edited by Michael Sela. Academic Press, New York, USA. pp. 384

Hiki Y, Iwase H, Kokubo T. 1996. Association of asialo-galactosyl β 1-3N-acetylgalactosamine on the hinge with a conformational instability of jacalin-reactive immunoglobulin A1 in immunoglobulin nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 7:955-60

Hiki Y, Kokubo T, Iwase H, Masaki Y, Sano T, Tanaka A, Toma K, Hotta K, Kobayashi Y. 1999. Underglycosylation of IgA1 hinge plays a certain role for its glomerular deposition in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 10:760-9

Hofmann K, Titus G, Montibeller JA, Finn EM. 1982. Avidin binding of carboxyl-substituted biotin and analogues. *Biochemistry.* 21:978-984

Hortin GL, Trimple BL. 1990. Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: Application of Jacalin-Agarose. *Anal Biochem.* 188:271-277

Iwasaki N, Ohgawara H, Nagahara H, Kawamura M, Bell GI, Omori Y. 1995. Characterization of Japanese families with early-onset type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus and screening for mutations in the glucokinase and mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) genes. *Acta Diabetol.* 32(1):17-22

Iwase H, Ishii-Karakasa I, Fujii E, Hotta K, Hiki Y, Kobayashi Y. 1992. Analysis of glycoform of O-glycan from human myeloma immunoglobulin A1 by gas-phase hydrazinolysis following pyridylamination of oligosaccharides. *Anal Biochem.* 206:202-5

Iwase H, Ohkawa S, Ishii-Karakasa I, Hiki Y, Kokubo T, Sano T, Tanaka A, Toma K, Yutaka K, Hotta K. 1999. Study of the relationship between sticky human serum IgA1 and its O-glycan glycoform. *Biochem Biophys Res Comm.* 261:472-47

Iwase H, Tanaka A, Hiki Y, Kokubo T, Sano T, Ishii-Karakasa I, Kasunori T, Yutaka K, Hotta K. 1999. Mutual separation of hinge-glycopeptide isomers bearing five N-acetylgalactosamine residues from normal human serum immunoglobulin A1 by capillary electrophoresis. *J Chromatog B.* 728:175-83

Iwase H, Tanaka A, Hiki Y, Kokubo T, Sano T, Ishii-Karakasa I, Toma K, Kobayashi Y, Hotta K. 1999. Aggregated human serum immunoglobulin A1 induced by neuraminidase treatment had a lower number of O-linked sugar chains on the hinge portion. *J Chromatog B*. 724:1-7

Kabir S. 1993. Simultaneous isolation of intestinal IgA and IgG from rabbits infected intraduodenally with *Vibrio cholerae* 01 by combined lectin affinity chromatography involving jacalin and protein A. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*. 16(2):153-61

Kabir S. 1998. Jacalin: A jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. *J Immunol Methods*. 212:193-211

Kanauchi M, Kawano T, Dohi K. 2000. Serum IgA levels in patients with diabetic nephropathy and IgA nephropathy superimposed on diabetes mellitus. *Diabet Res Clin Pract*. 48:113-8

Katoh E, Hell B, Kage A, Tauber R. 1993. Lectin Specificity and binding characteristics of human C-reactive protein. *J Immunol*. 149(2):445-53

Kilian M, Reinholdt J, Lomholt H, Poulsen K, V.G.Frandsen E. 1996. Biological significance of IgA1 proteases in bacterial colonization and pathogenesis: critical evaluation of experimental evidence. *APMIS* 104:321-38

King H, Aubert RE, Herman WH. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care*. 21(9):1414-31

Kobata A, Endo T. 1992. Immobilized lectin columns: Useful tools for the fractionation and structural analysis of oligosaccharides. *J Chromatog*. 597:111-22

Kokubo T, Hiki Y, Iwase H, Tanaka A, Nishikido J, Hotta K, Kobayashi Y. 1999. Exposed peptide core of IgA1 hinge region in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 14:81-5

Koschinsky T, Bunting CE, Glahn U, Vlassara H, Palinski W, Witztum JL. 1997. Increased titer of immunoglobulin (Ig) a antibody to FFI-LDL in diabetic patients. 16th. Int Diab Fed Congress. Resumen No. 19

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature*. 227:680-5

Leung JCK, Poon PYK, Neng Lai K. 1999. Increased sialylation of polymeric immunoglobulin A1: Mechanism of selective glomerular deposition in immunoglobulin A nephropathy?. *J Lab Clin Med*. 133:152-60

Lihme A, Schafer-Nielsen C, Larsen KP, Muller KG, Bog-Hansen TC. 1986. *J Chromatogr*. 376:299-305

López-Virella MF, Virella G, Orchard TJ, Koskinen S, Evans RW, Becker DJ, Forrest KY. 1999. Antibodies to oxidized LDL and LDL-containing immune complexes as risk factors for coronary artery disease in diabetes mellitus. *Clin Immunol.* 90(2):165-72

Matsubara A, Tanizawa Y, Matsutani A, Kaneko T, Kaku K. 1995. Sequence variations of the pancreatic islet/liver glucose transporter (GLUT2) gene in Japanese subjects with noninsulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 80(11): 3131-5

Mattu TS, Pleass RJ, Willis AC, Kilian M, Wormald MR, Lellouch AC, Rudd-PM, Woof JM, Dwek RA. 1998. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-Glycosylation on Fc α receptor interactions. *J Biol Chem.* 273:2260-72

Menini T, Gugliucci A, Sodahlon YK, Stahl AJ, Blickle JF, Brogard JM. 1993. Glycated immunoglobulin M in diabetic patients. *Ann Biol Clin.* 51:10-1

Midthjell K, Bjorndal A, Holmen J, Kruger O, Bjartveit K. 1995. Prevalence of known and previously unknown diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in an adult Norwegian population. Indications of an increasing diabetes prevalence. The Nord-Trondelag Diabetes Study. *Scand J Prim Health Care.* 13(3):229-35

Miller LL, Izzo MJ, Wemett D. 1988. Persistent grossly elevated plasma immunoglobulin A levels in untreated streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 37:177-84

Miller LL, Izzo MJ, Wemett D, Panner BJ, Schenk EA. 1988. Increased plasma IgA, sIgA, and C3- and IgA-containing immune complexes with renal glomerular deposits in diabetic rats. *Diabetes*. 37:185-93

Murakami T, Shima K. 1995. [Diabetogenes; which cause type II diabetes mellitus]. *Rinsho Byori*. 43(8):781-5

National Diabetes Data Group. 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*. 28:1039

Ohmuro H, Tomino Y, Tsushima Y, Shimizu M, Kuramoto T, Koide H. 1993. Elevation of serum IgA1 levels in patients with diabetic nephropathy. *Nephron*. 63:355

Olczyk K, Koscielniak-Kocurek E, Sonecki P, Zdenkowski W. 1994. The lipid peroxidation products and the enzymes of antioxidant system in patients with diabetes mellitus. *Rocz Akad Med Bialymst*. 39:93-9

Orfila C, Lepert JC, Modesto A, Pipy B, Suc JM. 1998. IgA nephropathy complicating diabetic glomerulosclerosis. *Nephron*. 79(3):279-87

Pieper GM, Jordan M, Dondlinger LA, Adams MB, Roza AM. 1995. Peroxidative stress in diabetic blood vessels. Reversal by pancreatic islet transplantation. *Diabetes*. 44(8):884-9

Rademacher TW, Parekh RB, Dwek-RA. 1988. Glycobiology. *Ann Rev Biochem*. 57:785-838

Reinold OF, Ueda Y, Ito S, Kohli R, Min I, Shafi M, Brentjens. 1992. The occurrence of IgA-nephropathy in patients with diabetes mellitus may not be coincidental: A report of five cases. *Am J Kidney Dis.* XX(3):255-60

Rifai A, Schena FP, Montinaro V, Mele M, D'Addabbo A, Nihi L, Pezzullo JC. 1989. Clearance kinetics and fate of macromolecular IgA in patients with IgA nephropathy. *N Engl J Med.* 61(4):381-88

Robertson ER, Kennedy JF. 1996. Glycoproteins: A consideration of the potential problems and their solutions with respect to purification and characterization. *Bioseparation.* 6:1-15

Roccatello D, Picciotto G, Coppo R, Piccoli G, Molino A, Cacace G, Amore A, Amoroso A, Quattrocchio G, Sena LM. 1989. Clearance of polymeric IgA aggregates in humans. *Am J Kidney Dis.* XIV(5):354-60

Roccatello D, Picciotto G, Torchio M, Ropolo R, Ferro M, Franceschini R, Quattrocchio G, Cacace G, Coppo R, Sena LM, Giuseppe de Filippi PG, Piccoli G. 1993. Removal systems of immunoglobulin A and immunoglobulin A containing complexes in IgA nephropathy and cirrhosis patients. The role of asialoglycoprotein receptors. *Lab Inves.* 69(6):714-23

Rodríguez-Segade S, Camina MF, Paz JM, Del Río R. 1991. Abnormal serum immunoglobulin concentrations in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta.* 203(2-3):135-42

Rodriguez-Segade S, Camina MF, Carnero A, Lorenzo MJ, Alban A, Quinteiro C, Lojo S. 1996. High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus: age-wise distribution and relation to chronic complications. *Clin Chem.* 42(7):1064-7

Roque-Barreira M, Campos-Neto A. Jacalin. 1985. An IgA-binding lectin. *J Immunol.* 124:2596-600

Salmela PI, Oikarinen AI, Ukkola O, Karjalainen A, Linnaluoto M, Puukka R, Ryhanen L. 1995. Improved metabolic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus is associated with a slower accumulation of glycation products in collagen. *Eur J Clin Invest.* 25(7): 494-500

Salonen JT, Nyyssonen K, Tuomainen TP, Maenpaa PH, Korpela H, Kaplan GA, Lynch J, Helmrigh SP, Salonen R. 1995. Increased risk of non-insulin dependent diabetes mellitus at low plasma vitamin E concentrations: a four year follow up study in men. *BMJ.* 28;311(7013):1124-7

Saulsbury FT. 1997. Alterations in the O-linked glycosylation of IgA1 in children with Henoch-Schonlein purpura. *J Rheumatol.* 24(11):2246-49

Sensi M, Pricci F, Pugliese G, De-Rossi MG, Petrucci AF, Cristina A, Morano S, Pozzessere G, Valle E, Andreani D. 1995. Role of advanced glycation end-products (AGE) in late diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract.* 28(1):9-17

Skea DL, Christopoulos P, Flaut AG, Underdown BJ. Studies on the specificity of the IgA-binding lectin, Jacalin. 1988. *Mol Immunol*. 25(1):1-6

Soulis-Liparota T, Cooper ME, Dunlop M, Jerums G. 1995. The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia*. 38(4):387-94

Stott DL. 1989. Immunoblotting and dot blotting. *J Immunol Methods*. 119:153-74

Tanaka A, Iwase H, Hiki Y, Kokubo T, Ishii-Karakasa I, Toma K, Kobayashi Y, Hotta K. 1998. Evidence for a site-specific fucosylation of N-linked oligosaccharide of immunoglobulin A1 from normal human serum. *Glycoconj*. 15(10):995-1000

Tamao A. 1996. Purification of C-reactive protein using lectins. *J Sahaech*. 7: 126-9

Tayama K, Inukai T, Fujiwara Y, Aso Y, Ogino K, Takemura Y. 1997. Clinical significance of accumulated visceral fat in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. 16th International diabetes federation congress. Abstracts, Diabet-supplement: 1669

The DCCT Research Group. 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 329:977-86



The report of the 1995 Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. *Diabetes Care*. 20:1183

To WY, Leung JCK, Lai KN. 1995. Identification and characterization of human serum alpha2-HS glycoprotein as a jacalin-bound protein. *Biochem Biophys Acta*. 1249:58-64

Tomana M, Novak J, Julina BA, Matousovic K, Konecny K, Mestecky J. 1999. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest*. 104(1):73-81

Triolo G, Giardina E, Rinaldi A, Bompiani D. 1984. IgA- and insulin-containing (C3-fixing) circulating immune complexes in diabetes mellitus. *Clin Immunol Immunopathol*. 30:169-77

Triolo G, Giardina E, Rinaldi A, Bompiani D. 1984. Serum hyper IgA in diabetes mellitus: I. Increase in the proportion of the polymeric to the monomeric form. *Boll Ist Sieroter Milan*. 63(2):173-4

Triolo G, Giardina E, Seddio G, Terrizzi C. 1987. Analysis of IgA1 and IgA2 subclass distribution in IgA-containing circulating immune complexes in patients with diabetes mellitus. *Boll-Ist-Sieroter-Milan*. 66(2):116-9.

Tsai EC, Boyko EJ, Newell-Morris L, Leonetti DL, Fujimoto WY. 1997. Non insulin dependent diabetes mellitus and obesity in mexican pima indians. 16th International diabetes federation congress. Abstracts. Diab-supplement: 0053

Turner GA. 1992. N-glycosylation of serum proteins in disease and its investigation using lectins. *Clin Chim Acta*. 208:149-171

Valencia ME, Esparza J, Ravussin E, Bennett PH, Fox C, Schulz L. 1997. Non insulin dependent diabetes mellitus and obesity in mexican pima indians. 16th Int Diab Fed Congress. Abstracts, Diab supplement: 0053

Vázquez-Moreno L, Candia-Plata MC, Jiménez M, Carbajal A, Villarreal J. 1999. Sexta Reunión de Investigación en Salud. Cd. Obregón, Son. México.

Vázquez-Moreno L, Forath J, Schluter SF, Marchalonis JJ. 1992. Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*) serum by gel-immobilized metal chromatography. *Comp Biochem Physiol*. 103B(3), 563-568

Vázquez-Moreno L, Calderón de la Barca AM, Robles-Burgueño R. 1993. Comparison of divinylsulphone-activated agarose with different matrix materials to purify lectins by affinity chromatography. In: Van Driessche E, Franz S, Beeckmans U, et al., editors. *Lectins: Biology, biochemistry*, Vol. 5. Hellerup, Denmark. Pp. 110-4

WHO. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: Second Report, Technical Report Serial No. 727. 1985. Geneva: World Health Organization.

Wold AE, Motas C, Svanborg C, Mestecky J. 1994. Lectin receptors on IgA isotypes. *Scand J Immunol*. 39(2):195-201

Woof JM, Amin AR. 1993. The role of glycosylation in antibody effector function. GlycoNews. Oxford GlycoSystems Ltd. Abingdon, OX14 1RG, UK. pp. 2-4

Wu AM, Song SC, Sugii S, Herp A. 1997. Differential binding properties of Gal/GalNAc specific lectins available for characterization of glycoreceptors. *Ind J Biochem Biophys*. 34:61-71

Youngs A, Chang S, Dwek RA, Scragg G. 1996. Site-specific glycosylation of human immunoglobulin G is altered in four rheumatoid arthritis patients. *Biochem J*. 314:621-30

Zehr BD, Litwin SD. 1987. Human IgD and IgA1 compete for D-galactose-related binding sites on the lectin jacalin. *Scand J Immunol*. 26:229-36

WHO. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: Second Report, Technical Report Serial No. 727. 1985. Geneva: World Health Organization.

Wold AE, Motas C, Svanborg C, Mestecky J. 1994. Lectin receptors on IgA isotypes. *Scand J Immunol*. 39(2):195-201

Woof JM, Amin AR. 1993. The role of glycosylation in antibody effector function. GlycoNews. Oxford GlycoSystems Ltd, Abingdon, OX14 1RG, UK. pp. 2-4

Wu AM, Song SC, Sugii S, Herp A. 1997. Differential binding properties of Gal/GalNAc specific lectins available for characterization of glycoreceptors. *Ind J Biochem Biophys*. 34:61-71

Youngs A, Chang S, Dwek RA, Scragg G. 1996. Site-specific glycosylation of human immunoglobulin G is altered in four rheumatoid arthritis patients. *Biochem J*. 314:621-30

Zehr BD, Litwin SD. 1987. Human IgD and IgA1 compete for D-galactose-related binding sites on the lectin jacalin. *Scand J Immunol*. 26:229-36



ELSEVIER

Hypersialylated macromolecular serum immunoglobulin A1 in type 2 diabetes mellitus

Luz Vázquez-Moreno^{a,*}, María del Carmen Candia-Plata^b,
María del Refugio Robles-Burgueño^a

^aCentro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, 83,000 México

^bUniversidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

Received 17 August 2000; received in revised form and accepted 24 October 2000

Abstract

Objectives: The origin of the elevation of serum immunoglobulin A1 (IgA1) in Type 2 diabetes mellitus (DM) is unsettled. The aim of this study was to address the carbohydrate changes of serum IgA1 from patients with Type 2 diabetes mellitus, as a possible cause of the elevation.

Design and methods: IgA1 was purified from sera of 6 DM patients and 4 healthy matched controls by using highly acetylated-Sepharose 6B, anti-IgA-agarose, and jacalin-agarose columns, and further separated into jacalin low-affinity, medium, and high-affinity fractions. Hinge and Fc fragments from native IgA1 were obtained and analyzed by using *Sambucus nigra*, *Maackia amurensis*, *Arachis hypogaea*, *Erythrina cristagalli*, and *Ricinus communis* lectins.

Results: The jacalin high-affinity fraction, mostly constituted by macromolecular IgA1, was more abundant in DM patients than in controls and also more reactive to *Sambucus nigra*, and *Maackia amurensis* lectins.

Conclusions: Macromolecular serum IgA1 from DM patients is hypersialylated and this probably contributes to the high level of IgA1 in DM patients. © 2001 The Canadian Society of Clinical Chemists. All rights reserved.

Keywords: Type 2 diabetes mellitus; Sialylation; Macromolecular IgA1

1. Introduction

Increased concentrations of serum immunoglobulin (Ig) A as monomers, polymers, and immune complexes are frequently found in patients with Type 2 diabetes mellitus (DM) [1–7]. Concomitant elevation of the IgA1 subclass in the absence of infection is part of the abnormality [8]. However, its etiology and implications are unsettled.

Human IgA1 is a heavily glycosylated serum protein that consists of an assortment of molecules with different N- and/or O-glycoforms due to microheterogeneity of the glycan moiety [9,10]. Monomeric serum IgA1 appeared to contain up to 90% of fully galactosylated and sialylated bi-antennary N-oligosaccharides at the two conserved N-glycosylation sites in each α -chain, and five partially occupied sites with O-oligosaccharides at the hinge region [10–12].

Glycosylation of the IgA1 influences the immunochemical properties of the immunoglobulin. Experimentally induced modifications of the oligosaccharide moiety of serum IgA1 have shown to promote the production of aggregated IgA1 [13–14]. Moreover, sialylation at the glycan moiety of IgA1 may influence the hepatic clearance of serum IgA1. Studies on IgA nephropathy, a superimposed disease of DM patients [15], have demonstrated an unusual sialylation pattern that possibly affects the clearance of polymeric IgA1 [16]. Also, other serum proteins showed a significantly increase in its sialic acid content [17]. However, it is not known whether the glycosylation profile of IgA1 from DM patients differs from that of IgA1 from normal healthy individuals.

Considering that the increased levels of serum IgA1 in DM patients could reasonably be explained by changes in the glycan moiety of the immunoglobulin, the aim of this study was to examine the glycosylation of the IgA1 from patients that coursed with elevated levels of serum IgA1.

* Corresponding author.

E-mail address: lvazquez@cascabel.ciad.mx (L. Vázquez-Moreno).

2. Materials and methods

2.1. Materials

CNBr-activated Sepharose 6B was purchased from Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden). DVS-activated Agarose (Mini-Leak) was from Kem-En-Tek (Copenhagen, Denmark), TSK SW3000G-XL was obtained from Supelco (PA, USA). IgA protease from *Neisseria gonorrhoeae* was from Boehringer Mannheim (Germany), and biotinylated lectins *Sambucus nigra* (SNA), *Maaackia amurensis* (MMA), *Arachis hypogaea* (PNA), and *Erythrina cristagalli* (ECA) were obtained from Oxford GlycoSystems (NY, USA) and *Ricinus communis* 120 from Sigma (St. Louis, MO USA). Precalibrated plates for RID, sheep antihuman IgA1 serum, and biotin-labeled goat antisheep IgG serum were purchased from The Binding Site (CA, USA). Affinity-pure human IgA was from ImmunoResearch Jackson (West Grove, PA, USA). Trypsin, unlabelled jacalin, peroxide-labeled jacalin, and all other reagents of analytical grade were purchased from Sigma.

2.2. Subjects

Serum samples of 23 patients with Type 2 diabetes mellitus were tested for elevation of IgA1. Patients were randomly selected from a large group of persons attending diabetes outpatient clinics of the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) and the Clínica LaSalle, institutions located at Hermosillo, Mexico. Diagnostic criteria [18,19] used in this study follow to that from the expert Committee on the Diagnostics and Classification of Diabetes Mellitus [20]. The mean age of patients was 59 (± 10) yr and the average duration of the disease was 5.3 (± 6.3) yr. Also, it had been previously shown that every patient included in this study had a significantly high level of serum IgA.

Twenty-three healthy subjects, nondiabetics, sex, and age-matched to patients were integrated as the control group. These control subjects were from the same geographical zone. Good health standing of controls was confirmed by primary ascertainment of clinical status. The subjects were given a standard oral glucose tolerance test (OGGT) of 75 g, after a 12 to 14 h overnight fast. Normal OGGTS (<7.8 mM/L 2 h postload) was confirmed in every control [3].

Six patients and four controls were further selected from the initial group of 46 subjects, and their sera used to purify IgA1. DM patients were all on oral hypoglycaemic therapy and without any infection for at least 2 months before the study.

2.3. Quantitation of serum IgA1

Sera IgA1 was quantified as a bound-jacalin protein, following Cullina and Greally [21]. Briefly, wells of enzyme-linked immunoassay (ELISA) plates (Sigma) were

coated with 100 μ L of a 95 μ g/mL jacalin solution in carbonate buffer, pH 9.6 and incubated for 12 h at 4 °C. The plate was blocked with 1% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20, in 0.05 mol/L Tris/HCl, 0.15 mol/L NaCl (TBS), pH 7.5, for 1.5 h at room temperature (r.t.) and further incubated, for 1 h at r.t., with 1/200 diluted test samples in TBS, pH 7.5. Standard curves were prepared with affinity purified IgA (ImmunoResearch), within a range from 0.36 to 46 μ g/mL. Standards were applied in triplicate and samples in duplicate.

Wells were extensively washed with 1% bovine serum albumin, 0.05% Tween 20, in TBS, pH 7.5 (TBT), and incubated with biotin-conjugated goat antihuman IgA1, for 1 h at r.t. After further washing with TBT, wells were incubated with streptavidin-peroxidase (1/1000 in TBS, pH 7.5) for 1 h at r.t. 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine solution was used to reveal the interaction that was read, after stopping the reaction, at 450 nm. Kruskal-Wallis test was used to measure statistical significance.

2.4. Purification and fractionation of serum IgA1

For hydrophobic chromatography, 10 mL of highly acetylated-Sepharose 6B was synthesized as described by Vázquez-Moreno *et al.* [22] and packed into a 10 \times 2.5 cm, inner diameter, column. For affinity chromatography, two matrices were prepared according to Vázquez-Moreno *et al.* [23], coupling 44 mg of antihuman IgA (ImmunoResearch) and 50 mg of jacalin (Sigma) to 2 g of DVS-activated agarose (Kem-En-Tek, Copenhagen, Denmark). Affinity gels were packed into 4 \times 1 cm inner diameter columns.

Hydrophobic gel was equilibrated with 0.5 mol/L Na_2SO_4 , pH 7.6, and loaded with 2 mL of previously adjusted serum with 1 mol/L Na_2SO_4 , pH 7.6. Unadsorbed proteins were removed with 0.5 mol/L Na_2SO_4 , pH 7.6, and Igs were eluted with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2.

Isolated Igs were dialyzed against PBS, pH 7.2, and loaded into antihuman IgA-agarose column previously equilibrated with PBS, pH 7.2. Unbound Igs were washed with PBS, pH 7.2, and IgA was eluted from the column with 0.05 mol/L glycine/HCl, pH 3.6. Elution fraction was immediately neutralized with 0.1 mol/L Tris buffer, pH 8.0.

Dialyzed IgA fraction was loaded into jacalin-agarose column. IgA2 fraction was removed from the column with PBS, pH 7.2 [24], and IgA1 eluted in three steps [25], first with 0.025 mol/L galactose (jacalin low-affinity fraction), then with 0.1 mol/L galactose (medium-affinity), and finally with 0.8 mol/L galactose in PBS, pH 7.2 (high-affinity).

Protein concentration of chromatographic fractions was estimated by radial-immunodiffusion using precalibrated plates (The Binding Site) and spectrophotometrically at 595 nm by the Bradford method [26] using human immunoglobulins (The Binding Site) as standards. Purity of IgA1 was tested by 12.5% SDS-PAGE, Western-blotting, and

ELISA, using goat antihuman IgA1 and peroxidase-labeled antihuman IgG (The Binding Site) as a primary antisera.

2.5. Obtention and purification of hinge and Fc fragments

Pure IgA1 (0.5 mg/mL in 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1 mol/L NaCl, pH 7.5) was incubated with the IgA protease from *Neisseria gonorrhoeae* (Boehringer Mannheim) for 16 h at 37 °C. Enzyme was used 1/250 of the substrate by weight.

The Fc fragment was further purified to homogeneity by gel filtration-HPLC [10], using two TSK SW3000G-XL (300 × 7.8 mm) columns in tandem. The columns were equilibrated with 0.1 mol/L sodium phosphate, 0.15 mol/L sodium chloride buffer, pH 7.2, and run at a flow rate of 0.25 mL/min. Purity of Fc fragment was confirmed by 12.5% SDS-PAGE.

The hinge fragment was obtained from the trypsin digest of the IgA1 according to method from Iwase *et al.* [14]. Two mg of desalted and lyophilized IgA1 were denatured and reduced as mentioned [14] and alkylated with 40 mM iodacetamide in 0.4 mol/L Tris-HCl, pH 8.6, for 30 min in darkness at room temperature [27]. Reduced and alkylated IgA1 was dissolved in 640 µL of 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 2 µg/µL urea [14]. Eighty µL of a trypsin (Sigma) solution (2 µg/µL) in 0.05 mol/L Tris-HCl buffer, 0.05 mol/L CaCl₂, pH 8.0, were added and incubated for 12 h at 37 °C. The reaction mixture was diluted, with 0.175 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.6, to 0.36 mol/L urea and applied to a jacalin-agarose column (2 mL of volume bed) equilibrated with 0.175 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.6. After washing unbound trypsin digest, hinge fragment was eluted with 0.5 mol/L galactose in 0.175 mol/L Tris-HCl buffer, pH 7.6. Hinge containing fraction was further desalted by using a 9.5 mL Bio-Gel P4 column.

2.6. Carbohydrate analysis

Enzyme-linked lectin assays (ELLA) were developed as described by Goodarzi & Turner *et al.* [28]. Biotinylated SNA, MAA, and PNA, lectins (Oxford GlycoSystems) were used to search for differences in sialylation among patients and controls according to Leung *et al.* [16]. SNA lectin requires the presence of a sialic acid residue at the C-6 position of the terminal β-galactose or β-N-acetylgalactosamine residue for binding [29] while MMA lectin binds to terminal sialic acid (α2-3)-linked to galactose [16,29]. MMA does not bind to isomers in which sialic acid is linked α2-6 to galactosyl residues [29]. PNA lectin binds to sialic-free Galβ1-3GalNAc [16] and to sialic free Galβ1-3GlcNAc [30].

RCAI lectin (Sigma) and ECA lectin (and Oxford GlycoSystems) were used to complete the information related to the sialylation of terminal residues. RCAI agglutinin recognizes the sequence Galβ1-4GlcNAc on N-linked chains [29,31]. A strong reactivity with this lectin indicates

that the N-linked chains are completely glycosylated [30, 31]. Also, RCAI reacts with terminal galactose exposed on O-linked oligosaccharide chains [30,31]. ECA lectin interacts with tetra- and tri-antennary oligosaccharides containing Galβ1-4GlcNAc linked units at the nonreducing end [30]. Both, RCAI and ECA lectins react strongly with sialic-free oligosaccharides that present [1-4] β-linked galactose residues accessible to the lectin [30,31].

To screen for sialylation of native IgA1, ELISA plates were initially coated with 100 µL of a solution of IgA1 (10 µg/mL) in TBS, pH 7.5. The IgA1 solution was serially diluted until 1 pg/mL and incubated for 12 h at 4 °C. Wells were blocked with TBT, pH 7.5, for 3 h, and further incubated with 100 µL of the biotinylated lectins at 10 µg/mL in TBS, pH 7.5, for 1 h at r.t. After washing with TBT, pH 7.5, the plates were incubated with avidin-peroxidase (1/1000 in TBS, pH 7.5) for 1 h at r.t. O-phenyldiamine was used to reveal the lectin binding after stopping the reaction and the plates were read at 450 nm.

ELLA for Fc and hinge fragments were developed as described above with the indicated differences in the coating procedure. The Fc-lectin assay was performed by coating the microtitre plates with 100 µL of a Fc solution (3 µg/mL in 0.1 mol/L sodium phosphate, 0.15 mol/L sodium chloride buffer, pH 7.2) and incubating the plates for 16 h at r.t. For the hinge-lectin assay, 100 µL of a hinge solution (3 µg/mL in 0.36 mol/L urea, Tris/HCl 0.175 mol/L, pH 9.6) was applied into the ELISA wells and incubated for 24 h at 4 °C.

The OD (at 450 nm) ratios of SNA ELLA to PNA ELLA and of MMA ELLA to PNA ELLA were used to determine the sialylation of the IgA1 samples [16]. The relative content of sialic acid α2-6 and sialic acid α2-3-linked to N- and/or O-oligosaccharides was indirectly determined by the OD ratio of SNA ELLA to MMA ELLA. ECA/SNA, ECA/MAA, RCAI/SNA, and RCAI/MMA binding ratios were also obtained to determine the relative content of free-sialic terminal residues. Kruskal-Wallis test was used to measure statistical significance.

3. Results

The concentration of serum IgA1 from 23 patients with Type 2 diabetes mellitus (DM) and 23 healthy controls was quantified as a jacalin-bound serum protein [21]. Results (Fig. 1) showed that serum IgA1 levels of patients were higher (2.62 ± 1.48 g/L) than serum IgA1 from controls (1.46 ± 1.47 g/L; $p < 0.001$).

Six patients with an average serum IgA1 level of 2.9 ± 0.97 g/L and 4 controls (1.81 ± 0.91 g/L) were selected among the 46 subjects. Purification of IgA1 was achieved from serum of the 10 subjects by using a three-step chromatographic scheme. SDS-PAGE showed a pure IgA1 protein from the last chromatographic step (Fig. 2). Fraction 2d gave no reaction with anti-IgG (data not shown).

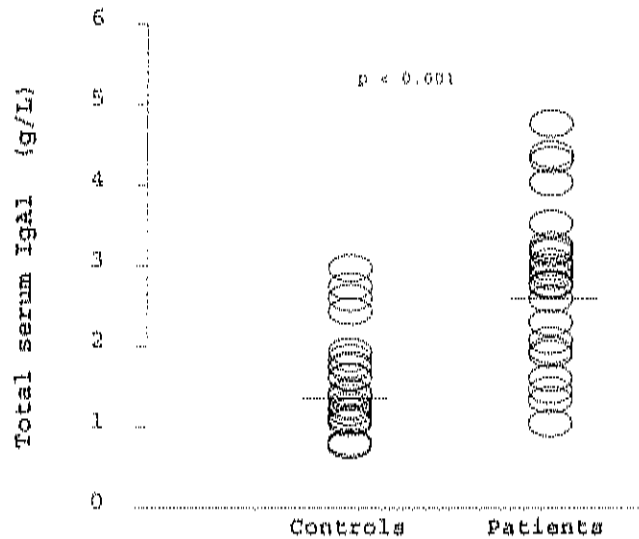


Fig. 1. The total serum IgA1 in the two starting study groups. Each circle represents a subject and the bar indicates the mean level for the group calculated by log transformed data.

By using a jacalin-agarose column, IgA1 was then fractionated into jacalin low- (eluted with 0.025 mol/L galactose), medium- (eluted with 0.1 mol/L gal), and high-affinity IgA1 (eluted with 0.8 mol/L gal; Fig. 3). Radial immunodiffusion and ELISA of the different fractions demonstrated that the jacalin high-affinity IgA1 constituted up to 25% of the total IgA1 from patients, whereas in controls only up to 14%. Native-PAGE showed that macromolecular IgA1 was the main component of the jacalin high-affinity fraction (Fig. 4), while jacalin medium-affinity IgA1 had abundant dimers and trimers of IgA1. Low-affinity fraction had a high content of monomeric IgA1.

3.1. Lectin-affinity assays with native IgA1

The three affinity fractions to jacalin were tested for their reactivity to five lectins. Low-affinity (rich in monomeric

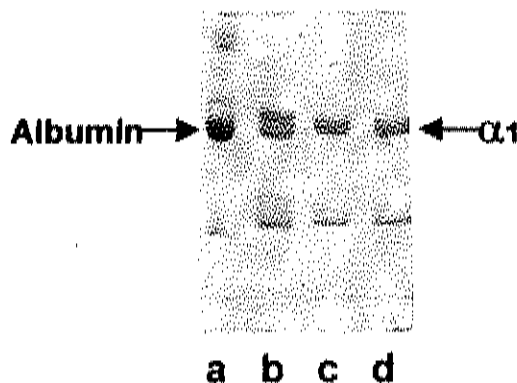


Fig. 2. SDS-PAGE (12.5%) of purified IgA1. Human serum (a) was loaded into highly acetylated Sepharose 6B to isolate total immunoglobulins (b). IgA (c) was isolated from immunoglobulins by using anti-IgA-agarose, and pure IgA1 (d) was obtained by using jacalin-agarose.

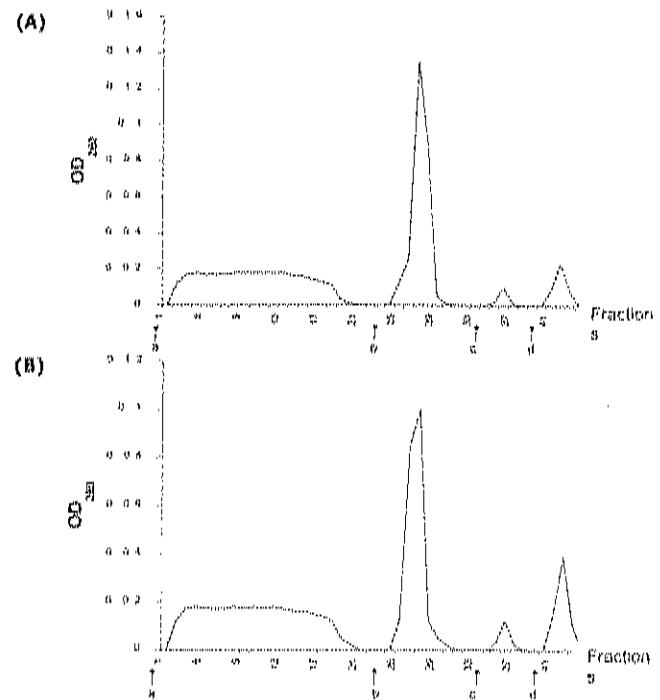


Fig. 3. Purification of serum IgA1 by jacalin agarose. IgA (2 mg) from anti-IgA-agarose was applied to the column (a) and the flow-through obtained with PBS, pH 7.2. Jacalin low-affinity IgA1 and Medium affinity IgA1 were eluted with 0.025 M galactose (b) and 0.1 M galactose (c) respectively. Jacalin high affinity fraction, eluted with 0.8 M galactose (d) constituted up to 14% and 25% of the eluted IgA1 from controls (A) and patients (B) respectively.

IgA1) and medium-affinity (mostly dimers and trimers of IgA1) showed no significantly differences among patients and controls. On the contrary, serum high-affinity IgA1 fraction from patients showed significantly higher binding to lectin SNA than high-affinity IgA1 fraction from controls (Fig. 5).

As shown in Fig. 6 and Table 1, SNA/PNA binding ratio obtained with the high-affinity fraction (mostly macromo-

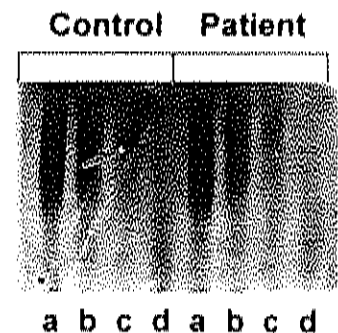


Fig. 4. Native-PAGE (4–15%) of the three affinity fractions to jacalin. Low-affinity fraction (a) was enriched with monomeric IgA1. Abundant dimers and trimers of IgA1 constituted the medium-affinity fraction (b). Macromolecular IgA1 (c) mostly constituted the high-affinity fraction. Residual protein (d) eluted from the column at pH 3.6. The same electrophoretic pattern was obtained in patients and in controls.

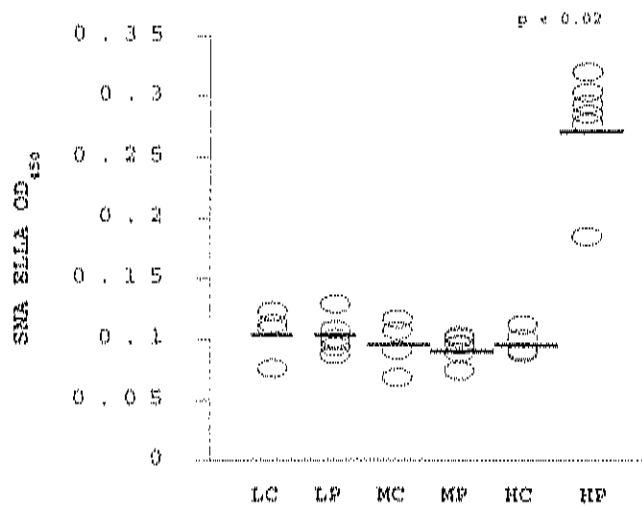


Fig. 5. Binding of SNA lectin to jacalin low-affinity IgA1 (L), jacalin medium-affinity IgA1 (M), and high-affinity IgA1 (H). Significantly difference in binding to SNA was observed among controls (C) and patients (P) only with the high-affinity IgA1 fraction.

lecular IgA1) from patients was significantly higher than controls. Also, the SNA/MMA binding ratio of macromolecular IgA1 from the patients was significantly higher than that from controls, while no significant difference was observed among MMA/PNA binding ratio among patients and controls. At the same time, the ECA/SNA, ECA/MMA, RCAI/SNA, and RCAI/MMA were significantly lower than those from controls (Figure 7 and Table 1) were.

3.2. Lectin-affinity ratios from Fc and hinge fragments

Lectin assays performed with the Fc fragments obtained from the macromolecular IgA1 agreed with data from the native IgA1. The SNA/PNA and SNA/MMA binding ratios from patients were significantly higher than those from

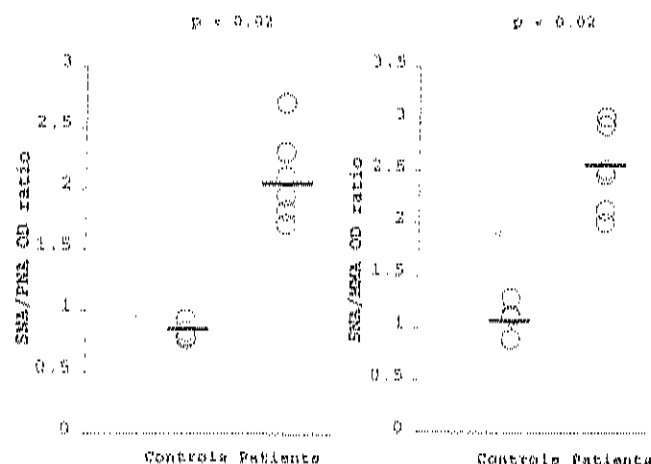


Fig. 6. The binding of SNA to macromolecular IgA1 from patients was significantly higher than that from controls, and strongly affected the SNA/PNA and SNA/MMA ratios. The bar indicates the mean calculated by log transformed data.

Table 1
OD binding ratios of lectins of native macromolecular IgA1

	Patients ^a	Controls ^b	<i>p</i>
SNA/PNA	2.09 (± 0.36)	0.83 (± 0.07)	<0.02
SNA/MMA	2.52 (± 0.04)	1.10 (± 0.16)	<0.02
MMA/PNA	0.77 (± 0.13)	0.76 (± 0.08)	=0.80
ECA/SNA	0.55 (± 0.09)	2.13 (± 0.31)	<0.02
ECA/MMA	1.45 (± 0.24)	2.40 (± 0.35)	<0.05
RCAI/SNA	0.33 (± 0.04)	1.06 (± 0.46)	<0.02
RCAI/MMA	1.19 (± 0.24)	1.41 (± 0.35)	<0.05

Values are expressed as mean \pm SD. Mean level of the group was calculated by log transformed data.

^a Six individuals constituted the patients group.

^b Four control healthy subjects.

controls (Table 2) were. Also, ECA/SNA, RCAI/SNA, and RCAI/MMA binding ratios from patients were significantly lower than that from controls. Similar as the results from native macromolecular IgA1, no difference was observed in MMA/PNA binding ratio among Fc from patients and controls.

On the contrary, the lectin assays developed for the hinge fragments showed a markedly difference in the MMA/PNA binding ratio among patients and controls (Table 3), whereas the difference in SNA/PNA binding ratio was less evident. The RCAI/SNA and RCAI/MMA binding ratios

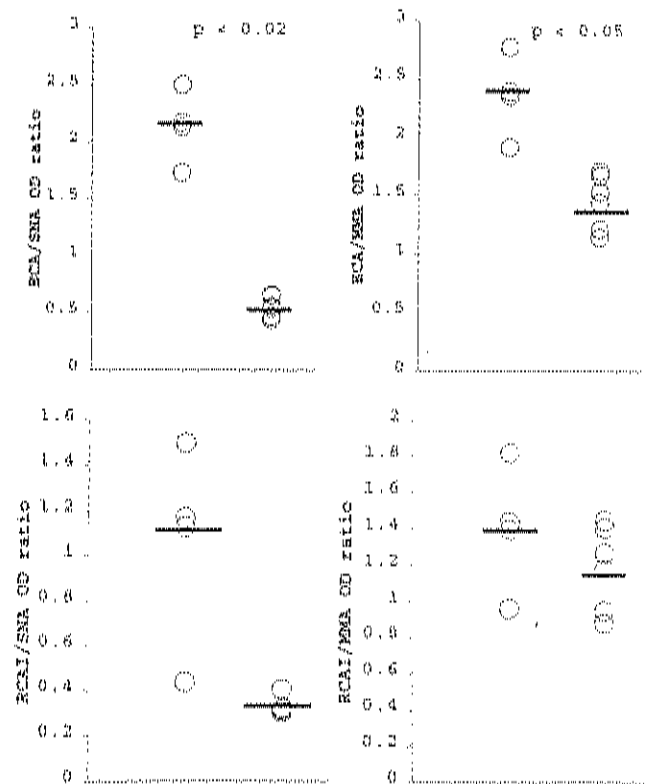


Fig. 7. The significantly higher binding of macromolecular IgA1 from patients to SNA influenced the ECA/SNA, ECA/MMA, RCAI/SNA, and RCAI/MMA binding ratios. The bar indicates the mean calculated by log transformed data. P, patients; C, controls.

Table 2
OD binding ratios of lectins of Fc fragments from macromolecular IgA1

	Patients ^a	Controls ^b	<i>p</i>
SNA/PNA	3.47 (±0.80)	0.94 (±0.07)	<0.02
SNA/MMA	4.60 (±1.04)	1.07 (±0.08)	<0.02
MMA/PNA	0.73 (±0.06)	0.90 (±0.06)	>0.71
ECA/SNA	0.27 (±0.06)	0.85 (±0.06)	<0.02
ECA/MMA	1.28 (±0.24)	1.89 (±0.06)	<0.05
RCAI/SNA	0.57 (±0.09)	1.53 (±0.15)	<0.02
RCAI/MMA	1.15 (±0.17)	1.80 (±0.12)	<0.05

Values are expressed as mean ± SD. Mean level of the group was calculated by log transformed data.

^a Six individuals constituted the patients group.

^b Four control subjects.

were both significantly lower in DM patients than the respective binding ratios from controls. Finally, in the hinge fractions, the SNA/MMA binding ratio was similar among patients and controls.

4. Discussion

Several studies have shown that Type 2 diabetes mellitus (DM) patients present increased levels of serum IgA [1–7]. Also a significant elevation in the IgA1 subclass appears to be part of this phenomenon [8]. Presently, it is not known whether IgA high levels are a result of an increased production or a deficient clearance mechanism. Removal of IgA from the blood stream strongly depends on the glycan structure of the molecule. Most receptors involved in IgA recognition are sensitive to carbohydrate changes at the oligosaccharide moiety, particularly to the presence of sialic acid.

After confirmation that DM patients involved in this study also had elevated concentrations of serum IgA1, the immunoglobulin was purified by using a three-step chromatographic scheme with jacalin-agarose as a final step. This procedure eliminated the potential interference due to the presence of contaminating serum glycoproteins (C1 inhibitor, and fetuin, among others) that react with jacalin [33].

Table 3
OD binding ratios of lectins of hinge fragments from macromolecular IgA1

	Patients ^a	Controls ^b	<i>p</i>
SNA/PNA	5.86 (±0.48)	4.48 (±0.36)	<0.02
SNA/MMA	7.19 (±0.48)	6.57 (±0.36)	=0.39
MMA/PNA	1.26 (±0.48)	0.65 (±0.36)	<0.02
RCAI/SNA	0.59 (±0.07)	0.90 (±0.10)	<0.02
RCAI/MMA	0.47 (±0.09)	1.02 (±0.11)	<0.02

Values are expressed as mean ± SD. Mean level of the group was calculated by log transformed data.

^a Six individuals constituted the patients group.

^b Four control healthy subjects.

IgA1 was separated into three fractions with differential affinities (low, medium and high) toward jacalin. Electrophoretic analysis show that the low-affinity fractions contained mostly monomeric forms of IgA1, as had been previously reported by Hiki *et al.* [34]. The medium-affinity fraction was enriched with dimmers and trimmers, while mainly macromolecular IgA1 constituted the high-affinity fractions. The macromolecular fraction was larger in patients' than in controls' sera. Triolo *et al.* [7] have found that in diabetes up to 87% of IgA, including both IgA1 and IgA2 subclasses are polymeric. These authors suggested that a defective mechanism of hepatobiliary transport might underlay the increased levels of polymeric IgA in DM patients.

In the present study, hypersialylation determined by enzyme-lectin affinity assays was found in patient's native IgA1. Only the macromolecular fraction had a high content of α [2–6] sialic acid linked to terminal galactose and N-acetylgalactosamine of N- and O-oligosaccharides. This increase in α [2–6] sialic acid, as indicated by SNA/PNA and SNA/MMA binding ratios, was also confirmed by its influence in ECA and RCAI lectins recognition.

Abnormal aggregation of IgA1 has been reported associated to glycosylation profile changes. A decrease in the terminal sialic acid linked to oligosaccharides located at the hinge region may induce a conformational instability leading to aggregation of IgA1 into polymers [13]. On the contrary, hypersialylation of IgA1 appears to cause elevation of polymeric IgA1 in patients with IgA nephropathy [16]; a disease superimposed with Type 2 DM in a number of patients [15].

Fc regions derived from protease treated IgA1 and containing N-oligosaccharides were also α [2–6] hypersialylated. SNA/PNA and SNA/MMA binding ratios were significantly higher in the patients' Fc fragments than in those from controls, while the MMA/PNA showed no difference. On the other hand, α [2,3] and α [2–6] sialylation from hinge fragments from patients' IgA1 were significantly higher than those from controls were. These results indicated that the increased levels of sialic acid in IgA1 depends on both, the high content of sialic acid α [2–6] and α [2,3] linked to glycans. Also, the hypersialylation of the IgA1 from patients relay not only on sialic acid bound to the Fc but also to that one linked to the hinge region.

Although the exact level of the sialic acid bound to the glycans have not well determined, the sialylation status of the IgA1 is considered to have a profound effect on the interaction of the molecule with specific cellular receptors that mediate its clearance from the plasma [16]. A significantly reduction in the sialic content seems to be essential for the majority of the glycoproteins to be removed from the plasma, it may be the same for the IgA1.

In healthy subjects, the IgA aggregates are cleared from the blood circulation exclusively by the liver [35]. Fractions of these polymeric IgA1 are linked to the secretor component, and mainly removed by the hepatobiliary system. Other macromolecular IgA1 fractions seem to be cleared by

asialoreceptors involved in the general clearance mechanism used for asialoglycoproteins by the liver [35]. Therefore, it might be expected that the high content of sialic acid linked to IgA1 could bear a considerable implication on the high levels of serum IgA1 in DM patients, the masking effect of sialic acid may hinder its clearance by the asialoglycoprotein receptor.

References

- [1] Ardawi MS, Nasrat HA, Bahnassy AA. Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients. *Diabet Med* 1994;11:384–7.
- [2] Rodríguez-Segade S, Carrina MF, Paz JM, Del Río R. Abnormal serum immunoglobulin concentrations in patients with diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1991;203:135–42.
- [3] Rodríguez-Segade S, Carrina MF, Camero A, et al. High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus: age-wise distribution and relation to chronic complications. *Clin Chem* 1996;42:1064–7.
- [4] Eguchi K, Yagame M, Suzuki D, et al. Significance of high levels of serum IgA and IgA-class circulating immune complexes (IgA-CIC) in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabet Complications* 1995;9:42–8.
- [5] Figueredo A, Ibarra JL, Rodríguez A, et al. Increased serum levels of IgA antibodies to hsp 70 protein in patients with diabetes mellitus: their relationship with vascular complications. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;79:252–5.
- [6] Triolo G, Giardino E, Rinaldi A, Bonplani GD. IgA- and insulin-containing (C3-fixing) circulating immune complexes in diabetes mellitus. *Clin Immunol Immunopathol* 1984;30:169–77.
- [7] Triolo G, Giardino E, Rinaldi A, Bonplani GD. Serum hyper IgA in diabetes mellitus. I. Increase in the proportion of the polymeric to the monomeric form. *Boll Ist Sieroter Milan* 1984;63:173–4.
- [8] Ohnuro H, Tomino Y, Tsushima Y, Shimizu M, Kuramoto T, Koide H. Elevation of serum IgA1 levels in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 1993;63:355.
- [9] Allen AC. Methodological approaches to the analysis of IgA1 O-glycosylation in IgA nephropathy. *J Nephrol* 1999;12:76–84.
- [10] Mann TS, Pleass RJ, Willis AC, et al. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fcα receptor interactions. *J Biol Chem* 1998;273:2260–72.
- [11] Tomana M, Novak J, Julina BA, Matosovic K, Konecny K, Mestecky J. Circulating immune complexes in IgA nephropathy consist of IgA1 with galactose-deficient hinge region and antiglycan antibodies. *J Clin Invest* 1999;104:73–81.
- [12] Fechal J, Allen SC. Structural features of IgA molecules which contribute to IgA nephropathy. *J Nephrol* 1999;12:66–75.
- [13] Iwase H, Ohkawa S, Ishii-Karakusa I, et al. Study of the relationship between sticky human serum IgA1 and its O-glycan glycoform. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:472–7.
- [14] Iwase H, Tanaka A, Hiki Y, et al. Aggregated human serum immunoglobulin A1 induced by neuraminidase treatment had a lower number of O-linked sugar chains on the hinge portion. *J Chromatog B* 1999;724:1–7.
- [15] Kananechi M, Kawano T, Dohi K. Serum IgA levels in patients with diabetic nephropathy and IgA nephropathy superimposed on diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;48:113–8.
- [16] Leung JCK, Poon PYK, Neng Lai K. Increased sialylation of polymeric immunoglobulin A1: Mechanism of selective glomerular deposition in immunoglobulin A nephropathy? *J Lab Clin Med* 1999;133:152–60.
- [17] Chen JW, Gal MA, Yokoyama H, Jensen JS, Deckert M, Parving HH. Raised serum sialic acid concentration in NIDDM patients with and without diabetic nephropathy. *Diabet Care* 1996;19:130–3.
- [18] World Health Organisation. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus: Second Report, Technical Report Serial No. 727. Geneva: World Health Organization, 1985.
- [19] National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039.
- [20] The report of the 1995 Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabet Care* 1997;20:1183.
- [21] Cullin MJ, Greally JP. A novel lectin-based enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of IgA1 in serum and secretory IgA1 in secretions. *Clin Chim Acta* 1993;216:23–38.
- [22] Vázquez-Moreno L, Porath J, Schlüter SF, Marchalosis JI. Purification of a novel heterodimer from shark (*Carcharhinus plumbeus*) serum by gel-immobilized metal chromatography. *Comp Biochem Physiol* 1992;103B:563–8.
- [23] Vázquez-Moreno L, Calderón de la Barea AM, Robles-Burgueño R. Comparison of divinylsulphone-activated agarose with different matrix materials to purify lectins by affinity chromatography. In: Van Driessche E, Franz S, Beeckmans U, et al., editors. *Lectins: Biology, biochemistry, clinical biochemistry*. Vol. 5. Hellerup, Denmark, 1993. pp. 110–4.
- [24] Roque-Barralira M, Campos-Neto A, Jacafin. An IgA-binding lectin. *J Immunol* 1985;124:2596–600.
- [25] Hiki Y, Kokubo T, Iwase H, et al. Underglycosylation of IgA1 hinge plays a certain role for its glomerular deposition in IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:760–9.
- [26] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [27] Gird FRN. Methods of enzymology. Carboxy-methylation 1972; XXV:424–38.
- [28] Goodarzi MT, Turner GA. A lectin method for investigating the glycosylation of nanogram amounts of purified glycoprotein. *Glycoconj J* 1997;14:493–6.
- [29] Endo T. Fractionation of glycoprotein-derived oligosaccharides by affinity chromatography using immobilized lectin columns. *J Chromatog A* 1996;720:251–61.
- [30] Wu AM, Song SC, Sugii S, Herp A. Differential binding properties of Gal/GalNAc specific lectins available for characterization of glyco-receptors. In *J Biochem Biophys* 1997;34:61–71.
- [31] Debray H, Decout D, Strecker G, Spik G, Montreuil J. Specificity of twelve lectins towards oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur J Biochem* 1981;117:41–55.
- [32] Wold AE, Moras C, Svanborg C, Mestecky J. Lectin receptors on IgA isotypes. *Scand J Immunol* 1994;39:195–201.
- [33] Hortin GL, Trimpe BL. Lectin affinity chromatography of proteins bearing O-linked oligosaccharides: application of jacalin-agarose. *Anal Biochem* 1990;188:271–7.
- [34] Hiki Y, Iwase H, Kokubo T, et al. Association of asialo-galactosyl β1-3N-acetylgalactosamine on the hinge with a conformational instability of jacalin-reactive immunoglobulin A1 in immunoglobulin nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:955–60.
- [35] Roccella D, Picciono G, Tarallo M, et al. Removal systems of immunoglobulin A and immunoglobulin A containing complexes in IgA nephropathy and cirrhosis patients. The role of asialoglycoprotein receptors. *Lab Invest* 1993;69:714–23.