

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

CARACTERIZACIÓN DE LOS O-OUGOSACÁRIDOS DE LA
INMUNOGLOBULINA A1 MONOMÉRICA, POLIMÉRICA Y
MACROMOLECULAR DEL SUERO DE PACIENTES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 2

POR

ANA LOURDES MATA PINEDA


TESIS APROBADA POR LA

CORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN CIENCIAS

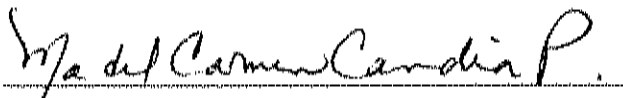
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Ana Lourdes Mata Pineda, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dra. Luz Vázquez Moreno

Director de Tesis




Dra. María del Carmen Candía Plata



M.C. Ana María Guzmán Partida



Dr. Mauro Valencia Juillerat

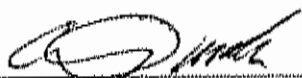


Dr. Jesús Hernández López

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 credito 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. Alfonso A. Gardea Béjar

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**: por las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo**: por ser la institución donde aprendí a descubrir el mundo de la investigación.

A la Universidad de Sonora, en especial al **Laboratorio de la Especialidad de Inmunoematología**: por las facilidades brindadas para usar las instalaciones y el equipo del laboratorio.

A la **Dra. Luz Vázquez**: por permitirme formar parte de su equipo de trabajo durante los últimos 5 años, mil gracias Dra. por su apoyo, sus clases y sus conocimientos.

A **Carmen Candia**: por creer en mí y ser en muchos momentos mi fuente de conocimiento, fuerza, ejemplo, apoyo y amistad, gracias por enseñarme tanto maestra Carmen !!!.

A la Casa del Diabético en especial al **Dr. Holguín** y a **Pedro**: por su valiosa cooperación al brindarnos las muestras de estudio para este trabajo.

A mi **Comité de tesis**: por su ayuda y consejos que fueron esenciales para el mejoramiento de este trabajo.

A mi equipazo de laboratorio los "**Sefarosos**": Judith, Oscar, Luis, Claudia, Adriana y Axel por su linda amistad y grandiosa colaboración.

A **Cuquis** y **Ana Guzmán**: por su constante apoyo, amistad y sabios consejos que han sido indispensables en mi formación, mil gracias.

A **Gaby**: por darme su mano en momentos oportunos.

A mi equipo de estudio: **Javier, Diana y Alfonso** fue maravilloso aprender y trabajar con ustedes.

A mis amigos **Araceli, Yeren, Erik, Gabriel, Consuelo, Nidia, Hector, Juan Pablo, Alejandra, Felipe y Jorge**: sinceramente gracias por darme lo mejor de su cariño y apoyo. Ustedes le dieron un toque especial a estos dos años de mi vida, por que compartimos momentos muy bonitos, los quiero mucho!

DEDICATORIA

A **Dios**: Infinitas gracias...

A mi **madre**: Te amo y admiro, a ti debo lo que soy por que tu visión es mi felicidad.

A mis **Hermanos**: con amor por que hacen especial mi vida.

A **Octavio**: por ser mi angelito que me cuida, gracias por todo..!

A **Rebeka y Chava**: mis amigas y mi apoyo incondicional.

A **Mariela**: gracias amiga por tu comprensión durante todo este tiempo, te quiero muchisimo.

A **Daniel, Itzia, Reyna, Alexa, Diana, Delia**: a ustedes mis amigos de siempre.

A mis **compañeros de generación**: por brindarme su amistad y compartir este tiempo conmigo.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	3
Aspectos Clínicos de la Diabetes Mellitus Tipo 2	3
Etiología	4
IgA1 en la Diabetes Mellitus Tipo 2 y Alteración en los O-oligosacáridos que la conforman	5
Estructura y Función de la IgA1	7
Métodos para la Caracterización de Carbohidratos.....	15
Ensayos con leclinas.....	15
Espectrometría de masas	16
Electroforesis de carbohidratos asistida con un fluroforo y sus aplicaciones	17
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Selección de Sujetos	19
Toma de Muestra	20
Determinación de HbA1	20

CONTENIDO

(continuación)

Cuantificación de la IgA1 Sérica	21
Purificación de la Inmunoglobulina A1 (IgA1)	22
Aislamiento de las inmunoglobulinas totales	22
Aislamiento de la inmunoglobulina A	23
Purificación de la inmunoglobulina A1	24
Evaluación de la Pureza de la IgA1	25
Separación de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular	25
Ensayos de Afinidad de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular por Lectinas	26
Caracterización de los O-oligosacáridos de la IgA1 por Electroforesis de Carbohidratos Asistida con un Fluoróforo (FACE)	27
Preparación de la muestra	27
Liberación de los O-oligosacáridos de la IgA1	27
Re-N-acetilación	27
Reacción de marcado	28
Electroforesis	28
Preparación de estándares electroforéticos	29
Identificación de las bandas de los O-oligosacáridos de la IgA1	29

CONTENIDO

(continuación)

RESULTADOS	30
Concentración de IgA1 Sérica	30
Aislamiento de Inmunoglobulinas Séricas Totales	30
Aislamiento de Inmunoglobulina A	33
Purificación de la IgA1	33
Evaluación de la pureza de la IgA1	36
Separación de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular de.....	36
Ensayos de afinidad de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular por Lectinas	39
Caracterización de los O-oligosacáridos por Electroforesis de Carbohidratos Asistida con un Fluoróforo (FACE)	44
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIÓN	54
BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Representación esquemática de la IgA1 humana monomérica constituida Por dos cadenas pesadas polipeptídicas (H) y dos cadenas ligeras (L) .	10
2. Estructura de la región bisagra de la IgA1 humana	11
3. Estructura de los O-oligosacáridos de la región bisagra de la IgA1	14
4. Niveles de la IgA1 serica total en dos grupos de estudio	31
5. Aislamiento de inmunoglobulinas humanas séricas en Sefarosa-6B allamente acetilada	32
6. Aislamiento de la IgA en Agarosa-anti IgA	34
7. Cromatograma de la purificación de la inmunoglobulina A1 sérica	35
8. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y reductoras al 10%	37
9. Cromatograma de una corrida de filtración en gel, para la separación de las formas de IgA1	38
10. Relación de las diferencias de absorbancias de pacientes y controles de las fracciones de IgA1 hacia la lectina jacalina	40
11. Relación de las diferencias de absorbancias de pacientes y controles de las fracciones de IgA1 de hacia la lectina SNA	41

LISTA DE FIGURAS

(continuación)

12. Relación de las diferencias de absorbancias de pacientes y controles de las fracciones de IgA1 hacia la lectina MMA	43
13. Estándares utilizados para la identificación de los O-oligosacáridos de la IgA1	45
14. Identificación de las bandas de O-glicanos en electroforesis de carbohidratos (FACE)	46
15. Identificación de la banda correspondiente al antígeno T de la IgA1	47
16. Análisis por FACE de los O-glicanos de la IgA1 en diabetes mellitus tipo 2 y sujetos control	49

RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un síndrome metabólico crónico en el que aparecen múltiples alteraciones bioquímicas y metabólicas; entre éstas, se encuentra el incremento en los niveles de IgA1 sérica, que se presenta aún en sin infección, y es de origen es incierto. En este trabajo, se caracterizaron los O-oligosacáridos de las tres fracciones de la IgA1 sérica (monomérica, polimérica y macromolecular) de pacientes con DM2 y fueron comparados con los de un grupo de personas sanas del mismo sexo y edad. Esto con el fin de encontrar una posible explicación al aumento de la IgA1 en base a cambios en su estructura O-oligosacárida.

Se cuantificaron los niveles de IgA1 sérica en 9 pacientes diabéticos y 9 personas sanas, encontrándose un aumento significativo en las concentraciones de IgA1 en el grupo de pacientes comparado con el grupo de personas sanas ($p < 0.01$).

La IgA1 fue purificada en tres pasos cromatográficos utilizando: Sefarosa-6B altamente acetilada, agarosa-anti-IgA, Agarosa-jacalina y posteriormente fraccionada por cromatografía de exclusión en IgA1 monomérica, polimérica y macromolecular. Los oligosacáridos de las fracciones obtenidas fueron caracterizados utilizando tres lectinas: Maackia amurensis (MMA), Sambucus nigra (SNA) y Artocarpus Integrifolia (Jacalina).

Los resultados obtenidos con los lectinoensayos indicaron que la fracción polimérica de los pacientes presentó un aumento en el contenido de ácido siálico $\alpha 2,3$ y $\alpha 2,6$ y una disminución en el contenido de galactosa en los O-oligosacáridos. La fracción monomérica solo presentó aumento de ácido siálico $\alpha 2,3$, con respecto al grupo control. Por lo tanto, este estudio demuestra que la fracción polimérica contribuye mayoritariamente al aumento de ácido siálico en la IgA1 en estos pacientes.

fracción polimérica contribuye mayoritariamente al aumento de ácido siálico en la IgA1 en estos pacientes.

Los oligosacáridos de la IgA1 nativa de un subgrupo de cinco pacientes y cinco controles, también fueron analizados por electroforesis de carbohidratos, encontrándose información comparable a la generada a partir de los ensayos con lectinas.

Esta información sugiere que el aumento de la IgA1 sérica en los pacientes diabéticos podría explicarse con base en la hipersialilación de las diferentes fracciones de esta molécula, principalmente de la polimérica. El aumento de ácido siálico permite suponer la existencia de un proceso que evita la interacción de la IgA1 con receptores que llevan a cabo su tratamiento contribuyendo, de esta manera, al aumento en sus niveles séricos.

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades con un elevado índice de mortalidad a nivel mundial es la diabetes mellitus tipo 2 (ALAD, 1995). La diabetes tipo 2 se caracteriza por un aumento permanente en la concentración de glucosa sanguínea. Es un trastorno plurimetabólico, originado por factores genéticos y desencadenado por factores que se relacionan con el estilo de vida del individuo (American Diabetes Association, 1999).

Este síndrome tiene una evolución clínica insidiosa, caracterizada por la aparición progresiva de diversos cambios metabólicos que originan las complicaciones vasculares. Dichas complicaciones van alterando paulatinamente la funcionalidad de diversos órganos y sistemas vitales para el organismo. Entre las complicaciones vasculares de mayor impacto en la sobrevida de los pacientes diabéticos se encuentran las complicaciones cardiovasculares, la nefropatía, la neuropatía y la retinopatía (American Diabetes Association, 1999).

A diferencia de la diabetes mellitus tipo 1, la diabetes mellitus tipo 2 no se caracteriza por ser una enfermedad de tipo autoinmune (Mahhan *et al*, 1999). Sin embargo, se ha visto una marcada elevación en los niveles séricos de IgA en una gran proporción de pacientes diabéticos tipo 2, proponiéndose además un papel importante de esta inmunoglobulina en la patogénesis de las complicaciones vasculares (Candia-Plata *et al*, 2000; Figueredo *et al*, 1996; Gill *et al* 1981; Rodríguez *et al*, 1996; Vázquez-Moreno *et al*, 2001; Vázquez-Moreno *et al*, 1999).

El aumento en los niveles de IgA se presenta aún sin infección (Candia-Plata, 2000; Ohmuro *et al*, 1993) y su etiología se desconoce. Por otro lado, se

sabe que esta inmunoglobulina es altamente glicosilada (Abbas *et al*, 1999; Mattu *et al*, 1998) y que presenta en su estructura N y O-glicanos (Hiki *et al*, 1996; Iwase *et al*, 2001; Mattu *et al*, 1998; Tora o *et al* 1977), los cuales mantienen la estabilidad y conformación de la glicoproteína (Gou-Fu, 1995) e influyen en su vida media. El estado de glicosilación de glicoproteínas séricas como la IgA1 refleja las condiciones bioquímicas y fisiológicas del organismo, por lo tanto cambios en su composición pueden estar relacionados con alteraciones anatómicas y funcionales, como las que se presentan en la nefropatía por IgA (Allen *et al*, 1999; Leung *et al* 1999; Tomana *et al*, 1999), la artritis reumatoide (Field *et al*, 1994; Gornik *et al*, 1999) y el síndrome de Henoch-Shönlein (Saulsbury, 1997). En la diabetes mellitus tipo 2, el subtipo IgA1 juega un papel importante en el incremento de IgA sérica total (Candía-Plata, 2000; Ohmuro *et al*, 1993). Los análisis de la IgA1 con lectinoensayos, han demostrado que la fracción polimérica de la IgA1 presenta O-glicanos hipersialilados. Se ha propuesto que este cambio podría estar implicado en la reducción del aclaramiento hepático de la molécula, lo que explicaría parcialmente el aumento de IgA1 en el torrente circulatorio (Candía-Plata, 2000; Vázquez-Moreno *et al*, 2001).

Hasta ahora, no se han demostrado alteraciones significativas en los O-glicanos de la IgA1 monomérica y macromolecular, ni su posible relación con el aumento de la IgA1 sérica total en la diabetes mellitus tipo 2. De ahí se derivó el objetivo de este trabajo, que consistió en caracterizar los O-glicanos de estas fracciones, y corroborar los cambios ya encontrados en la fracción polimérica de esta molécula. Esto se realizó en un grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con niveles elevados de IgA1 sérica, utilizando ensayos con lectinas y electroforesis de carbohidratos (FACE).

ANTECEDENTES

Aspectos Clínicos de la Diabetes Mellitus Tipo 2

La diabetes tipo 2, es una enfermedad crónica caracterizada por el aumento crónico de la glucosa en plasma (hiperglicemia), acompañado de signos y síntomas como polidipsia, glucosuria, poliuria, lipemia y polifagia entre otros (American Diabetes Association, 1999).

La diabetes mellitus tipo 2 puede ser el resultado de defectos bioquímicos múltiples, entre los que sobresale el síndrome de resistencia a la insulina, que trae como consecuencia el deterioro del metabolismo de la glucosa (Brody, 1999). Los niveles de insulina endógena pueden ser normales, bajas o elevados pero son inadecuados para superar la resistencia concomitante a la hormona (Mahhan *et al*, 1999). Estos pacientes generalmente requieren insulina exógena hasta los estadios tardíos de la enfermedad (Cervený *et al*, 1998).

La diabetes mellitus frecuentemente produce complicaciones tardías como retinopatía, nefropatía, neuropatía y enfermedades vasculares (American Diabetes Association, 1999; Brody, 1999; King *et al*, 1994). Entre los factores relacionados con estas complicaciones se encuentran la hiperglicemia (Actis y Rebolledo, 2000; Brownlee, 1995; Ceriello, 2003; Murakami y Shima, 1995), el estado de estrés oxidativo (Abbott *et al*, 1995; Bhoraskar *et al*, 1997; Cunnigham *et al*, 1995; López-Virella *et al*, 1999; Pieper *et al*, 1995; Olcsyk *et al*, 1994), la subutilización tisular de glucosa (Murakami y Shima, 1995) y los productos de glicación avanzada (Schmid *et al*, 1999).

En la diabetes mellitus tipo 2 se han encontrado otras anomalías bioquímicas, como lo es el incremento de ácido siálico plasmático, el cual es considerado como un buen predictor de riesgo cardiovascular (Chen *et al*, 1996; Crook *et al*, 2001; Crook *et al*, 2000; Deepa *et al*, 1998). Adicionalmente se ha encontrado que en los pacientes diabéticos existe un incremento significativo en los niveles de IgA1 sérica, comparado con los niveles de sujetos no diabéticos (Ardawi *et al*, 1994; Candia-Plata *et al*, 2001; Candia-Plata, 2000; Eguchi *et al*, 1995; Gill *et al*, 1981; Vázquez-Moreno *et al*, 2001; Rodríguez-Segade *et al*, 1991). Este fenómeno aún sin infección (Gill *et al*, 1981; Candia-Plata, 2000; Vázquez-Moreno *et al*, 1999), sin embargo, poco se sabe acerca de su origen y significado patogénico.

Etiología

Aunque se han identificado diversas alteraciones genéticas relacionadas con defectos en la secreción de la insulina y/o resistencia a ella, se sabe que la diabetes tipo 2 es un síndrome multifactorial. Es decir, además del componente genético están involucrados otros factores, relacionados con el estilo de vida, como elementos desencadenantes principales (Braunwald *et al*, 2000; Candia-Plata, 2000). Sin embargo, una vez establecida la diabetes, la hiperglucemia resultante se vuelve persistente (Mahhan *et al*, 1999) e interviene en forma decisiva en el desarrollo de las complicaciones vasculares (Borak, 1998).

La etiología genética de la diabetes mellitus tipo 2 es conocida solo parcialmente, sin embargo se han encontrado defectos en la secreción de insulina, el gen glucocinasa (Aitman *et al*, 1995; Murakami y Shima, 1995) y el gen transportador de glucosa hepático (Glut 2 por sus siglas en inglés) (Matsubara *et al*, 1995). Los defectos en la secreción y acción de la insulina se

pueden acompañar de anomalías a nivel del receptor de la insulina o alteraciones en los procesos transductores. Por ejemplo, en el mecanismo de la tirosina cinasa o en el mecanismo final de acción de la insulina (Montgomery *et al*, 1993). Otras mutaciones se relacionan con los genes que codifican para enzimas como la glicerol fosfato deshidrogenasa (Brody, 1999).

Diversos estudios demuestran que los factores de riesgo no genéticos son de gran importancia para el origen de la enfermedad y entre ellos se encuentran el sedentarismo y la obesidad visceral (Fujimoto *et al*, 1997; Hanson *et al*, 1995).

IgA1 en la Diabetes Mellitus Tipo 2 y Alteración en los Oligosacáridos que la Conforman.

El aumento en los niveles séricos de IgA se presenta en una gran proporción de los pacientes diabéticos tipo 2 y puede incrementarse hasta un 40%. Esta elevación se encuentra tanto en diabéticos que inician su padecimiento después de los 65 años de edad, como en los pacientes que tienen complicaciones vasculares (Candia-Plata *et al*, 2001; Cheta *et al*, 1982; Eguchi *et al*, 1995; Figueredo *et al*, 1996; Koschinsky *et al*, 1997; Rodríguez *et al*, 1996; Triolo *et al*, 1987). Otros investigadores han demostrado que el subtipo IgA1 específicamente es el que se encuentra elevado (Candia-Plata, 2000; Kanauchi *et al*, 2000; Ohmuro *et al*, 1993) y que la IgA1 polimérica contribuye significativamente al incremento de la IgA total (Candia-Plata, 2000; Triolo *et al*, 1984), sin embargo también la fracción monomérica está elevada (Candia-Plata, 2001).

Los resultados obtenidos por Vázquez-Moreno y *et al*, (2001), indican que la concentración de la IgA1 sérica está elevada en los pacientes diabéticos tipo 2, aún antes de presentarse las manifestaciones clínicas de las complicaciones vasculares (Candia-Plata *et al*, 2001; Candia-Plata, 2000; Vázquez-Moreno *et al*, 1999), debido tal vez al impacto metabólico temprano de la diabetes mellitus tipo 2 (Candia-Plata *et al*, 2001). Otra de las anomalías bioquímicas en estos pacientes es el aumento en los niveles de ácido siálico plasmático, el cual es considerado un buen predictor de riesgo vascular a pesar de que se desconoce el origen de su elevación (Chen *et al*, 1996; Crook *et al*, 2001; Deepa *et al*, 1998).

Algunos investigadores proponen que existe una relación entre el aumento de IgA1 y el desarrollo de las complicaciones vasculares (Candia-Plata, 2000; Vazquez-Moreno *et al*, 2001). Esto, debido a que se han identificado complejos inmunes con IgA en suero y en los glomérulos (Eguchi *et al*, 1995; Triolo *et al*, 1987). Adicionalmente, se han identificado autoanticuerpos IgA, que están dirigidos contra moléculas involucradas en las complicaciones vasculares (Candia-Plata *et al*, 2001; Eguchi *et al*, 1995; Figueredo *et al*, 1996; Koschinsky *et al*, 1997; Triolo *et al*, 1987; Triolo *et al*, 1984), por ejemplo hacia la lipoproteína de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés; Caceres y Mata, 2001). Esta información sugiere que hay una estrecha relación entre el incremento de IgA sérica y el desarrollo de las complicaciones vasculares.

La nefropatía por IgA es un padecimiento que pueden desarrollar los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Kanauchi *et al*, 2000; Siu-Ka *et al*, 2001; Young *et al*, 1999). En esta enfermedad, la IgA1 presenta una alteración en los O-oligosacáridos que incrementa su afinidad hacia componentes de la matriz extracelular renal y la disminuye con los receptores (Leung *et al*, 1998). Entre, éstos últimos, se encuentran los asialoglicoreceptores (ASGP, por sus siglas en inglés) hepáticos involucrados en la remoción de la molécula (Mattu *et al*, 1998).

Por lo tanto, una consecuencia de esta alteración podría ser la disminución en el aclaramiento de IgA1, debido a la falla en el reconocimiento por parte de estos receptores. Esto contribuiría directamente al incremento en los niveles de IgA1 en el torrente circulatorio en la nefropatía por IgA (Leung *et al*, 2002).

En la nefropatía por IgA, la alteración en los O-oligosacáridos de la IgA1 parece promover su agregación o actuar como autoantígeno formando complejos inmunes con IgG. La IgA macromolecular, es fácilmente atrapada en el mesangio renal provocando su deposición y favoreciendo las complicaciones funcionales renales (Allen *et al*, 2001; Allen *et al*, 1999; Leung *et al*, 2001; Rocatello *et al*, 1993).

En un estudio realizado (Candia-Plata, 2000; Vázquez-Moreno *et al*, 2001) se hicieron ensayos de afinidad a lectinas, en los se generó información importante sobre los cambios en los O-oligosacáridos de la IgA1. En tales experimentos se demostró que la IgA1 polimérica sérica de los pacientes diabéticos presenta un elevado contenido de ácido siálico, lo cual explicaría parcialmente el aumento de la molécula en el suero de estos pacientes, ya que el exceso de ácido siálico podría estar enmascarando a la molécula, evitando su aclaramiento por parte de los asialoglicoreceptores hepáticos (Candia-Plata, 2000). Teóricamente, la hipersialilación de la IgA1 polimérica podría contribuir también a la acumulación renal de la molécula.

Estructura y Función de la IgA1

La IgA, uno de los cinco tipos de inmunoglobulinas que existen, es un componente relativamente menor de la inmunidad humoral sistémica que constituye el 10-15% de los anticuerpos circulantes. Sin embargo esta

inmunoglobulina desempeña un papel de extrema importancia en la inmunidad de las mucosas (Abbas, 1999). Considerando a la IgA circulante y la IgA de las mucosas, la IgA es la más abundante de las inmunoglobulinas, ya que tiene un índice de síntesis que excede al del resto de las inmunoglobulinas juntas (Stites, 1999).

La IgA interactúa con receptores específicos ($Fc\alpha$) 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 clásica. La activación de la ruta alterna del complemento por IgA continúa siendo un tema controversial (Mattu *et al*, 1998).

La IgA del torrente circulatorio es sintetizada, en su mayoría, como monómero en médula ósea. La de origen mucoso es sintetizada principalmente como dímeros y multímeros con la propiedad de enlazarse al componente secretor de las células epiteliales. Esto le confiere la capacidad de transportarse hacia las mucosas (Stites, 1999).

La IgA1 monomérica es una molécula de aproximadamente 165 kDa, que consta de dos cadenas pesadas idénticas de aproximadamente 56 kDa, designadas como $\alpha 1$ y dos cadenas ligeras idénticas, ya sean kappa (κ) ó lambda (λ), de aproximadamente 26 kDa (Figura 1). Estas se encuentran unidas entre sí por puentes disulfuro localizados en la región flexible de la cadena pesada, conocida como región bisagra. Esta última está formada por aproximadamente 12 aminoácidos susceptibles a escisiones enzimáticas o químicas. La IgA1 también posee una región constante (Fc) y una región variable (Fab) que es el sitio de unión al antígeno. Esta inmunoglobulina está constituida además por 4 dominios formados por puentes intracatenarios, dos de

los cuales están en la región variable y dos en la región constante o Fc (Stites, 1999).

La IgA1, comparada con la IgA2, presenta una región bisagra (Figura 2) con un contenido abundante en prolina que le confiere flexibilidad y la hace susceptible a la escisión por proteasas bacterianas (Stites, 1999). Otra característica que hace distintas a estas moléculas entre sí es la diferencia en cantidad y composición de los carbohidratos de las cadenas laterales que contienen (Basset *et al*, 1999; Novak *et al*, 2000; Stites, 1999).

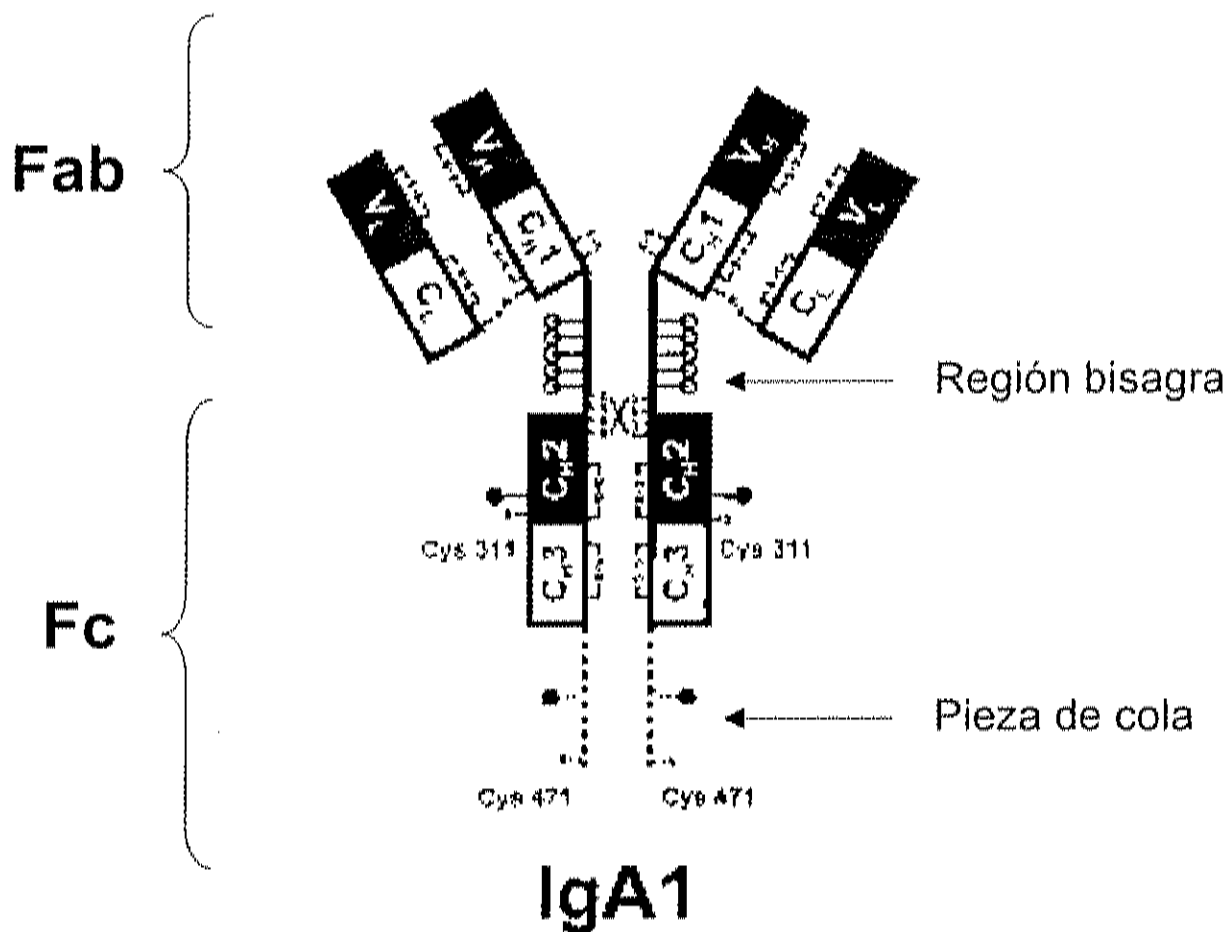


Figura 1. Representación esquemática de la IgA1 humana monomérica, constituida por dos cadenas polipeptídicas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L). Las cadenas a su vez, presentan dominios constantes (C) y dominios variables (V). Los sitios de glicosilación conservados se localizan en la región bisagra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

Fuente: Modificada de Boehm *et al*, 1999

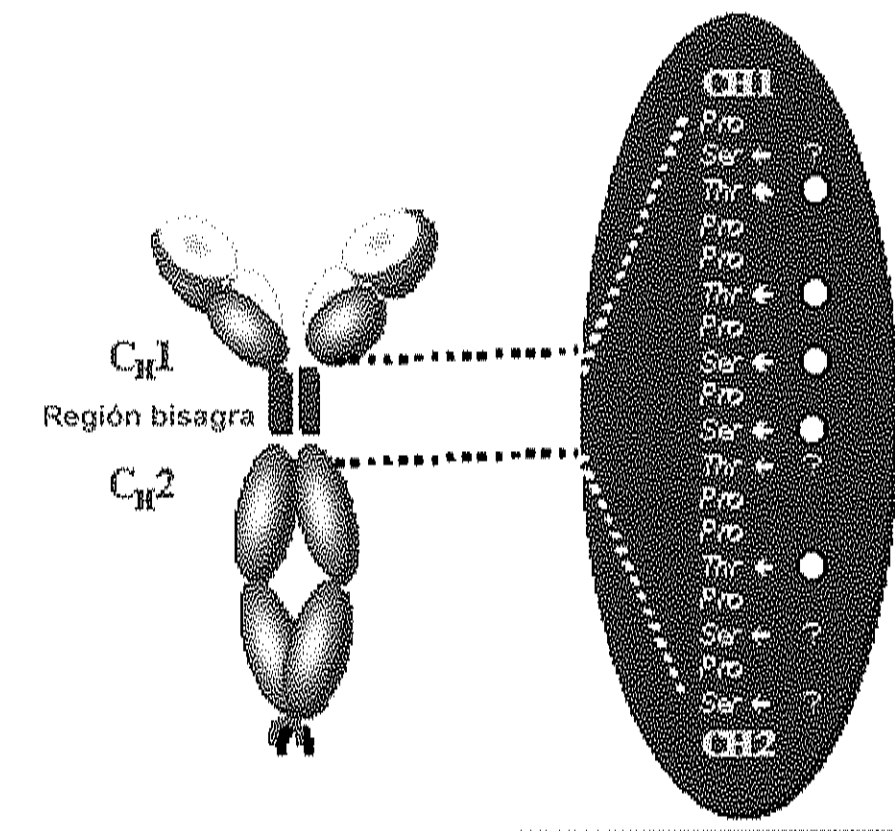


Figura 2. Estructura de la región bisagra de la IgA1 humana. Cinco aminoácidos (señalados con flecha y círculo abierto), están ocupados con O-glicanos. Existen además cuatro sitios potenciales de O-glicosilación.

Fuente: Modificado de Allen *et al*, 1999.

La forma de IgA1 predominante en el suero es la monomérica y posee una extensión de 18 aminoácidos en el carbono del último dominio de la cadena pesada, conocida como pieza de cola (Figura 1) que participa en la polimerización de la IgA1. También contiene un residuo de cisteína penúltima que se une a la cadena J, permitiendo la formación de dímeros o polímeros de IgA1 (Sørensen *et al*, 1999; Yoo *et al*, 1999). Por el contrario, la IgA2 existe principalmente en forma polimérica. En general, la polimerización de ambas subclases de IgA, facilita su funcionamiento en las mucosas, y su propiedad de enlazar y aglutinar antígenos. Además, la unión de la IgA con el componente secretor (SC) la hace menos susceptible a la digestión proteolítica intestinal (IgA/SC) debido a su rigidez (Stites, 1999)

La subclase IgA1 es de especial interés porque contiene tanto N-oligosacáridos como O-oligosacáridos (Figura 1) (Mattu *et al*, 1998). La región bisagra de la IgA1 además de ser una secuencia rica en residuos de prolina, presenta nueve sitios potenciales de O-glicosilación de los cuales cinco están ocupados. Los O-oligosacáridos de la región bisagra se localizan en los aminoácidos Thr²²⁶, Ser²³⁰ y Ser²³² y los residuos de Thr²²⁵, Thr²³⁶ están parcialmente ocupados (Mattu *et al*, 1998; Novak *et al*, 2000). La estructura de estos O-oligosacáridos presenta un ácido siálico terminal, precedido por una galactosa y hacia el interior un residuo de N-acetilgalactosamina (Figura 3). Cuando los O-oligosacáridos pierden ácido siálico, la IgA1 puede enlazarse al receptor de asialoglicoproteínas del hígado, el cual tiene la función de remover glicoproteínas de la circulación para su posterior catabolismo (Basset *et al*, 1999; Novak *et al*, 2000; Loomes *et al*, 1991; Spiess, 1990).

Por otro lado, se ha demostrado mediante estudios de precipitación de la IgA1 con la lectina *Artocarpus Integrifolia* (jacalina), que los sitios responsables de la interacción entre estas dos moléculas son los O-oligosacáridos localizados en Ser²³⁰ y/o Ser²³² de la región bisagra de la IgA1 (Skea *et al*, 1998). Los O-

oligosacáridos se sintetizan sobre los grupos hidroxilo de serina o treonina, sin importar su secuencia y pueden presentarse en cinco estructuras básicas pequeñas y suelen ser di, tri y tetrasacáridos (Mattu *et al*, 1998; Novak *et al*, 2000). Su síntesis y procesamiento se realiza solamente en el aparato de Golgi (Steen *et al*, 1998)

En condiciones fisiológicas, los oligosacáridos estabilizan a las proteínas, manteniendo su solubilidad y facilitando su transporte en la célula. Además influyen en su tiempo de vida media, previenen la agregación proteica y la proteólisis, también facilitan el reconocimiento ligando receptor, así como la interacción entre células (Steen *et al*, 1998; Turner, 1992).



Figura 3. Estructura de los O-oligosacáridos de la región bisagra de la IgA1.
Fuente: Modificado de Allen *et al*, 1999.

Métodos para la Caracterización de Carbohidratos

En los últimas décadas se ha reconocido la importancia fisiológica y bioquímica de la expresión de los procesos de glicosilación de proteínas y lipidos (Köttgen *et al*, 1993), no solamente en condiciones fisiológicas, sino también en diversas patologías. Hay evidencias de que los cambios en los procesos de glicosilación normal se traducen en alteraciones en la función de ciertas moléculas. Las alteraciones en los carbohidratos de las glicoproteínas reflejan los cambios en el medio ambiente donde las proteínas son glicosiladas, y por ello se cree que podrían servir como herramientas de diagnóstico en algunas enfermedades (Sumar *et al*, 1993). Por ejemplo en la artritis reumatoide se ha identificado una disminución en el contenido de galactosa en la inmunoglobulina IgG, y se propone que esta alteración influye en los cambios articulares de esta enfermedad (Field *et al*, 1994; Youings *et al*, 1994). La nefropatía por IgA es otra enfermedad en la que se ha demostrado que existe un aumento del monosacárido N-acetilgalactosamina en la inmunoglobulina A (Allen *et al*, 1999). Presentándose como consecuencia un cuadro clínico en el que existe una deposición de IgA1 en el mesangio renal provocando inflamación y daños glomerulares (Allen *et al*, 1999; Feehally *et al*, 1999).

Ensayos con lectinas

Actualmente existe una amplia variedad de técnicas disponibles para identificar cambios en la glicosilación de las glicoproteínas, entre ellas se han desarrollado las que hacen uso de las lectinas (Sumar *et al*, 1993). Las lectinas son proteínas de origen vegetal, microbiano o animal, que tienen la propiedad de reconocer carbohidratos o secuencias de carbohidratos con gran especificidad (Nangia-Makker *et al* 2002, Saso *et al*, 1998). Debido a estas características, las

lectinas han sido acopladas a distintas técnicas. Por ejemplo, han sido inmovilizadas en matrices cromatográficas con el fin de purificar o identificar oligosacáridos, sin embargo estos métodos aún son costosos cuando se comparan con los tradicionales (Köttgen *et al*, 1993). En contraparte cuando las lectinas han sido utilizadas en ensayos tipo ELISA (por sus siglas en inglés enzyme-linked immunosorbent assay) han reducido significativamente el costo de los ELISAS convencionales (Sumar *et al*, 1993). Además los lectinoensayos en placa tienen gran sensibilidad por lo que requieren cantidades pequeñas de muestra (0.2µg/mL) (Cullina y Grealley, 1993), (0.1µl/mL) (Vázquez-Moreno *et al*, 2001). Otras ventajas incluyen el análisis simultáneo de varias muestras y costos bajos (Köttgen *et al*, 1993). Es probable que, en el futuro, su uso conduzca al desarrollo de buenos métodos de diagnóstico de gran sensibilidad y especificidad, con lo que será más fácil diagnosticar diversas enfermedades.

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas se caracteriza por su alta sensibilidad (rango de picomoles) y su capacidad de identificar cuantitativa y cualitativamente mezclas de sustancias. Es útil también para estimar la masa molecular de algún compuesto y de los fragmentos que lo constituyen. Esta información facilita la identificación de la estructura de las moléculas, de ahí que esta técnica sea ampliamente aplicada en la caracterización de proteínas y carbohidratos (U.A., 1998).

Uno de los métodos más utilizados para la caracterización de biopolímeros, es la espectroscopía de masas láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI-MS, por sus siglas en inglés) (Dell *et al*, 1994). En esta técnica se utiliza un láser de luz UV, que al incidir sobre la muestra la ioniza migrando a través de 2 electrodos de acuerdo a su carga y masa molecular. La

identificación de las moléculas se hace en el cromatograma resultante y las de igual masa se observan como un solo pico (Karas y Bahr, 1993).

El método MALDI-MS presenta ciertas ventajas, como tolerar bajas concentraciones de sales (mM) y la utilización de pequeñas cantidades de reactivos. Sin embargo, la gran desventaja es que la operación de los instrumentos y la interpretación de los espectros requiere la presencia de un especialista entrenado. Además, para MALDI-MS el equipo tiene un costo poco accesible (Dell *et al*, 1994).

Electroforesis de carbohidratos asistida con un fluoróforo (FACE) y sus aplicaciones

FACE (Electroforesis de carbohidratos asistida con un fluoróforo, por sus siglas en inglés) es una técnica de análisis de carbohidratos desarrollada por Jackson en 1990. En esta técnica que combina el alto poder de resolución de la electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés) con la sensibilidad y visibilidad de los métodos fluorescentes. Los carbohidratos deben ser marcados con un fluoróforo, que hace que los carbohidratos sin carga adquieran carga negativa y migren en un campo eléctrico. El fluoróforo más utilizado para marcar es el ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico (ANTS), el cual forma una base de schiff con el extremo reductor de los carbohidratos, esta unión es estabilizada por aminación reductiva utilizando cianoborohidruro de sodio posteriormente, los oligosacáridos marcados son separados por PAGE bajo condiciones adecuadas y detectados y cuantificados por la fluorescencia generada, utilizando luz UV (Gou-fu, 1997). Esta técnica permite revelar rápidamente información estructural de los oligosacáridos de las glicoproteínas (Raju *et al*, 2000) gracias a que puede ser combinada con la liberación secuencial de los componentes de N-oligosacáridos u O-oligosacáridos (Gou-fu, 1997; Raju *et al*, 2000).

Otra de las grandes ventajas de FACE es su utilidad para analizar carbohidratos de distintas fuentes y la posibilidad de reutilizar la muestra en posteriores experimentos. Además, este sistema no necesita separar los oligosacáridos cargados de los no cargados, simplificando así su secuenciación. Finalmente, la capacidad de analizar múltiples muestras en el mismo gel (Gou-Fu, 1997) hacen de éste, un sistema útil para complementar el análisis de carbohidratos por otros métodos. Por estas razones, en este trabajo será empleado con el fin de complementar la información derivada del análisis con lectinas de la IgA1 sérica de pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de Sujetos

Se seleccionó aleatoriamente un grupo de once pacientes con diabetes tipo 2, entre los que asisten al Grupo Diabético 2000 A.C. de Hermosillo Sonora. El diagnóstico de la diabetes tipo 2, 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 1998 Expert Committé in the Diagnosis and Clasification of Diabetes Mellitus).

Al momento de realizar el estudio, el grupo de pacientes contaba con edades entre los 30 y 70 años y un tiempo medio de evolución de la enfermedad de 10 años. Antes de la toma de muestra sanguínea, se verificó mediante un estudio clínico, el estado de compensación metabólico de los pacientes y se descartó la presencia de infecciones agudas o crónicas, al menos durante 2 meses antes del estudio. El grupo control, fue integrado por nueve 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, descartando la presencia de cualquier complicación de tipo cardiovascular o renal. También se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa (TGO), en la que se les proporcionó una carga oral de 75 g 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 1998 Expert Comittee on the Diagnosis and Clasification of Diabetes Mellitus).

Toma de Muestra

Las muestras sanguíneas de ambos grupos de estudio, fueron obtenidas por punción venosa, en tubos vacutainer con y sin anticoagulante. Esto con el fin de utilizar la sangre total para la determinación de la hemoglobina glicada y el suero para la cuantificación proteica total y de la IgA1. El resto del suero fue utilizado para la purificación de la IgA1. La separación del suero del paquete globular se realizó por centrifugación a 3,000 rpm a una temperatura de 4°C. Posteriormente se determinó la concentración proteica total por la técnica de Bradford a 595 nm (Bradford, 1976), utilizando como proteína estándar, albúmina sérica bovina (SIGMA). El suero fue almacenado en alícuotas de 1 mL a -20°C, hasta su posterior utilización.

Determinación de HbA1

El primer análisis realizado fue la determinación de la hemoglobina glicada en cada una de las muestras, utilizando cromatografía de intercambio catiónico. Esto con la finalidad de estimar al grado de control glicémico de los pacientes diabéticos y del grupo control. Para el análisis se utilizaron columnas precalibradas y soluciones amortiguadoras comerciales con un método certificado comercialmente (SIGMA Diagnostics 441) que correlaciona con el método de referencia Bio-Rad Diamat.

Cuantificación de la IgA1 Sérica

En los pacientes diabéticos, una de las anomalías bioquímicas es el incremento significativo ($p < 0.001$) en la concentración de la IgA1 sérica (Candia-Plata, 2000; Vázquez-Moreno *et al*, 2001). Para asegurar la presencia de esta elevación exclusivamente en el grupo de pacientes con diabetes, se cuantificó a la inmunoglobulina en ambos grupos de estudio y se hizo una comparación estadística analizando las diferencias de medianas entre un mismo grupo y entre grupos, utilizando la prueba de rangos de Kruskal-Wallis de una vía, con el programa NCSS 6.0.

Antes de determinar la concentración de IgA1, las proteínas del suero fueron reducidas (Heremans, 1974) con ditioneitol 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. La cuantificación de la IgA1 sérica se realizó utilizando la técnica de ELISA aprovechando su afinidad por la lectina jacalina.

Se preparó una solución de jacalina de 100 $\mu\text{g/mL}$ en carbonato, pH 9.6, y se aplicaron 100 μl por pozo en una placa de poliestireno. Después de incubar la placa durante 12 h a 4°C (Cullina y Greally, 1993), 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 1 h. Posteriormente, el suero en dilución 1:200 fue incubado durante 1.5 h y la interacción jacalina-IgA1 fue revelada con un antisuero primario anti-IgA1 humana, desarrollado en borrego (The Binding Site, Inc., CA, USA) el cual fue diluido 1/1,000 durante 1.5 h a temperatura ambiente. Para revelar la interacción se utilizó un 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 ortofenilendiamina como sustrato a 450 nm (Microplate Reader, Modelo 450, BioRad, CA, USA). La curva estándar, de 0.36 a 46 $\mu\text{g/mL}$, fue preparada con IgA humana comercial con una concentración de 19.3 mg/mL (The Binding Site Inc., CA, USA).

Purificación de la Inmunoglobulina A1

La purificación de la IgA1 se realizó en 3 etapas cromatográficas en secuencia: en la primera etapa se aisló a las inmunoglobulinas totales a partir del suero, utilizando un adsorbente hidrofóbico de Sefarosa-6B altamente acetilada. En la segunda etapa, con un adsorbente de afinidad de agarosa anti-IgA, se aisló a la inmunoglobulina A a partir de las inmunoglobulinas totales. Finalmente, también por cromatografía de afinidad, utilizando una matriz de agarosa-Jacalina, se purificó a la IgA1 a partir de la fracción de IgA total.

Aislamiento de las inmunoglobulinas totales

El aislamiento de las inmunoglobulinas totales, se llevó a cabo a partir del suero de los pacientes diabéticos y controles, mediante cromatografía de hidrofobicidad. Se utilizó una matriz hidrofóbica de Sefarosa-6B altamente acetilada (Vázquez-Moreno L. *et al*, 1992), que fue sintetizada a partir de 188ml del gel de Sefarosa-6B CL deshidratado (Pharmacia Biotech., Uppsala Sweden). El gel fue lavado sucesivamente con 188 mL de etanol al 95%, 188 mL de acetona y 188 mL de piridina. Posteriormente fue transferido a una solución de 124 mL de anhídrido acético y la suspensión fue agitada por 12 h, a una

velocidad de 40 rpm y temperatura ambiente. El gel acetilado, fue lavado con 367 mL de etanol seguido por 188 mL de ácido acético al 10% y 2.6 L de agua.

El gel acetilado fue empacado utilizando un sistema de baja presión en una columna para cromatografía de 2.5 x 13 cm y equilibrado con 5 volúmenes de una solución de Na_2SO_4 0.5 M, en solución reguladora de fosfatos salina 20 mM (PBS), pH 7.6. El volumen de la cama cromatográfica con el gel ya equilibrado fue de 21 mL.

Se aplicaron 2mL (120 mg de proteína) de suero a la fase estacionaria sintetizada, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, previamente diluido 1:1 con Na_2SO_4 1 M, en PBS, pH 7.6. La adsorción de las inmunoglobulinas al gel se promovió con la solución de equilibrio (Na_2SO_4 0.5 M), y la elución de las proteínas adsorbidas se logró en un solo paso con PBS, pH 7.2 (Candia-Plata, 2000). Se colectaron fracciones de 6 mL, lavando finalmente la columna con una solución de Guanidina-HCl 4M, pH 7.6 (solución de regeneración). El aislamiento de las inmunoglobulinas fue monitoreado a 280 nm.

Aislamiento de la inmunoglobulina A

El aislamiento de la inmunoglobulina A sérica se llevó a cabo a partir de la fracción de las inmunoglobulinas totales, utilizando un gel de agarosa con anti-IgA como ligando preparado con 13 g de 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 122 mg de una solución de anti-IgA humana (The Binding Site, Inc., CA, USA) en presencia de polietilenglicol al 6% (Candia-Plata, 2000; Lihme *et al*, 1986;). El exceso de grupos activos fue bloqueado con una solución de etanolamina 0.2 M, pH 9, durante 16 horas.

La matriz de agarosa anti-IgA, fue empacada en un sistema de baja presión a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, en una columna para cromatografía de 1.5 x 13 cm y equilibrada con 5 volúmenes de una solución de PBS, pH 7.2. Se obtuvo un volumen de cama de 13 mL.

Se aplicaron en promedio 20 mg de inmunoglobulinas séricas totales (dializadas contra PBS, pH 7.2), a la columna de agarosa anti-IgA, a un flujo de 0.5 mL/min. La adsorción de la IgA al gel se promovió con la solución de equilibrio (PBS, pH 7.2) (Candia-Plata, 2000; Vázquez-moreno *et al*, 2001), eluyendo posteriormente con glicina ácida, pH 2.6. Se colectaron fracciones de 1.5 mL que fueron neutralizadas con Trizma base, 0.1 M, pH 8.0. El aislamiento de la IgA fue monitoreado espectrofotométricamente a 280 nm.

Purificación de la inmunoglobulina A1

La purificación de la IgA1 sérica, se llevó a cabo a partir de la fracción de la inmunoglobulina A total, utilizando un gel de agarosa-Jacalina (Aucunturier *et al*, 1988; Biwenga *et al*, 1989; Candia-Plata, 2000; Do y Lee, 1998; Hiki *et al*, 1996; Hortin y Trimple 1990; Iwase *et al*, 1999; Skea *et al*, 1988), preparado de acuerdo al procedimiento descrito para el acoplamiento de la anti-IgA (Lihme *et al*, 1986), pero utilizando polietilenglicol al 20 %. Se acoplaron 120 mg de la proteína (SIGMA, Chemical Co. St. Louis, MO, USA) a 3 g de gel de agarosa (Kem-En-Tec., denmark), obteniéndose así una fase estacionaria de 3 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 13.5 cm obteniéndose un volumen de cama de 3mL. El adsorbente fue equilibrado con 5 volúmenes de una solución de PBS, pH 7.2.

Se aplicaron 2.3 mg de IgA sérica dializada contra PBS, pH 7.2, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La adsorción de la IgA1 a la matriz fue promovida con la solución de equilibrio (PBS, pH 7.2), eluyendo en un solo paso

con una solución de Galactosa 0.8 M. Para regenerar el adsorbente, la IgA1 remanente fue removida con Glicina ácida, pH 2.6 (Candía-Plata, 2000) y equilibrado nuevamente con PBS, pH 7.2. Se colectaron fracciones de 1.5 mL y se monitorearon a 280 nm.

Evaluación de la Pureza de la IgA1

La pureza de las fracciones obtenidas en cada una de las etapas cromatográficas, fue evaluada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970), electrotransferencia e inmunodetección, utilizando anti-IgA1, anti-IgA2 y anti-IgG humana como antisueros primarios (The Binding Site, Inc., USA).

Separación de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular

La separación de las formas monoméricas, de las poliméricas y macromoleculares de IgA1, se realizó mediante cromatografía de filtración en gel, utilizando Biogel A (Bio-Rad, USA) con un rango de exclusión de 10,000-500,000 Daltons, y un volumen de cama de 118 mL (1cm de diámetro X 150 cm). Se utilizó PBS 20 mM pH 7.2, como solución de corrida. La corrida cromatográfica fue llevada a cabo a 0.5 mL/min, colectando fracciones de 2 mL y monitoreando su curso espectrofotométricamente a 280 nm.

Ensayos de afinidad de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular por Lectinas

Las lectinas presentan la propiedad de reconocer específicamente a carbohidratos, por lo tanto son consideradas, como una herramienta útil para la elucidación de estructuras de oligosacáridos (Cummings, 1994), entre ellos los O-glicanos de la IgA1 (Candia-Plata, 2000; Vázquez-Moreno *et al*, 2001). Las tres lectinas que se utilizaron para el análisis de los O-oligosacáridos de la IgA1 nativa son: *Artocarpus Integrifolia* (Jacalina), *Maackia amurensis* (MMA) y *Sambucus nigra* (SNA), las cuales fueron adquiridas ya biotiniladas (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA.). El análisis de interacción de la IgA1 con las lectinas fue realizado mediante lectinoensayos en placas de poliestireno (Vázquez-Moreno *et al*, 2001).

La IgA1 nativa (10 $\mu\text{g/mL}$ en TBS, pH 7.5) fue inmovilizada (1 μg en 100 μL) en placas de poliestireno por espacio de 3 h a temperatura ambiente, en amortiguador de carbonatos, pH 9.6. Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con albúmina de suero bovino (BSA) al 1% p/v y Tween 0.05% v/v en PBS, pH 7.2 e incubadas con las lectinas biotiniladas (0.1 μg en 100 μL) durante 2 h a temperatura ambiente. Esta concentración fue definida en un estudio previo (Candia-Plata, 2000). La interacción entre la IgA1 y la lectina fue revelada con avidina-peroxidasa (1/2,000 en PBS, pH 7.2), en presencia de peróxido de hidrógeno y ortofenilendiamina como sustrato a 450 nm (Microplate Reader, Modelo 450, Bio Rad, CA, USA) y las diferencias entre las relaciones de absorbancia de los ensayos de la IgA1 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.

Caracterización de los O-oligosacáridos de la IgA1 por Electroforesis de Carbohidratos Asistida con un Fluoróforo (FACE)

Este método fue utilizado con el fin de estimar las diferencias de la fracción O-oligosacárida de la IgA1 sérica total en un grupo de cinco pacientes diabéticos tipo 2, con relación a un grupo controles sanos pareados por edad y sexo.

Preparación de la muestra

La IgA1 (1 mg), purificada de ambos grupos de estudio, fue dializada exhaustivamente contra agua ultra pura con el fin de eliminar totalmente sales. Posteriormente la muestra fue llevada completamente hasta sequedad liofilizandola durante 24 horas.

Liberación de los O-oligosacáridos de la IgA1

Para la liberación intacta de los O-oligosacáridos de la IgA1, la muestra previamente liofilizada fue mezclada con 50 μ l de hidrazina anhidra (Sigma-Aldrich Co.), rociada con N_2 (Allen *et al*, 1999; Merry *et al*, 2002; Patel *et al*, 1993; Royle *et al*, 2002) e incubando durante 3 h a 60°C en un baño de arena (Patel *et al*, 1993). Finalmente la hidrazina fue removida, secando la muestra en una consola de secado (CS) durante 16 h.

Re-N-acetilación

Los grupos amino primarios de los O-oligosacáridos fueron Re-N-acetilados, ya que los grupos acetilo pueden perderse durante la hidrazinólisis (O'Neill *et al*, 1996). La reacción se llevó a cabo por la adición de 125 μ l de $(NH_4)_2CO_3$ 0.1 M y 12.5 μ l de anhídrido acético concentrado (Sigma Chemical

Co.) (Allen *et al.* 1999; Royle *et al.* 2002); e incubando en un baño de hielo durante 30 min. Posteriormente esta solución se llevó hasta sequedad, utilizando el sistema de secado CS. Finalmente para eliminar los residuos de sales, la muestra fue lavada con 3 volúmenes de agua deionizada

Reacción de marcado

Los O-oligosacáridos liberados fueron marcados con 5 μ L de ANTS (ácido 8-aminonaftaleno-1,3,6-trisulfónico) (Molecular Probes, Eugene Oregon USA) 0.15 M en una solución de ácido acético/agua en relación 3:17 (v/v), en presencia de 5 μ L de NaCNBH₃ 1M (Sigma-Aldrich Co.) en dimetil sulfóxido (DMSO) (Jackson *et al.* 1994). Esta mezcla fue incubada toda la noche a 37°C y posteriormente fue llevada a sequedad hasta obtener la consistencia de un gel, diluyéndose con 4 μ l de agua deionizada y almacenada a -40°C.

Electroforesis

Para la identificación de los O-oligosacáridos, se prepararon geles de poliacrilamida al 30% (Jackson, 1994; Starr *et al.* 1996) 0.5 mm de grosor según el sistema Laemmli (Laemmli, 1970) sin SDS. Los geles preparados fueron montados en una minicámara de electroforesis vertical Hoefer (Instruments, San Francisco, CA USA). Las muestras de O-glicanos marcados fueron diluidos con 4 μ l de una mezcla de glicerol/agua (1:4, v/v) e inyectados en el gel utilizando una soluciones de corrida de la casa comercial Glyko, Inc. Novato, CA. La electroforesis se realizó a 20 mA durante 3 h a 4°C. A partir de 1 mg de IgA1 se logró obtener suficiente carbohidrato para realizar 1 o 2 análisis FACE, los geles fueron observados utilizando un transiluminador de luz UV con una longitud de onda de de 365 nm (ULTRA LUM, Inc. Paramount, CA) y fueron fotografiados con una cámara Fotodyne utilizando una película polaroid 667 (ISO 3200/36°).

Preparación de estándares electroforéticos

El estándar de unidades de glucosa, fue preparado a partir de la digestión de almidón (Sigma Chemical Co.) con la enzima α -amilasa de *Bacillus amyloquefaciens* (EC 3.2.1.1.) (Roche Diagnostics Co. Indianápolis, IN, USA). También se utilizaron estándares comerciales de N-acetil galactosamina (GalNAc) y del antígeno Tn (GalNAc β 1,3Gal) (Sigma Chemical Co.) para la identificación de las bandas de los O-oligosacáridos.

Identificación de las bandas de los O-oligosacáridos de la IgA1

Para identificar las diferentes isoformas de los O-oligosacáridos de la IgA1 del grupo de pacientes y control, alícuotas de 1 mg de la proteína fueron sometidas a distintos tratamientos químicos y enzimáticos:

(1) Incubación de 1 mg de IgA1 durante 1 h con ácido acético 0.2 N a 100 °C, esto con el fin de remover completamente el ácido siálico de la molécula (encontrado en posiciones α 2,3 y α 2,6).

(2) Incubación de 1 mg de IgA1 (previamente desialilada en α 2,3 y α 2,6) con la enzima β 1,3-Galactosidasa de *Streptococcus pneumoniae* recombinante en *E. Coli* (Sigma Chemical Co.), en solución de fosfato / ácido cítrico, pH 4.

Los O-oligosacáridos derivados de los diferentes tratamientos a los que se sometió la IgA1 fueron inyectados en los geles de poliacrilamida a la par con los estándares comerciales (GalNAc y GalNAc β 1,3Gal), utilizando las condiciones anteriormente mencionadas.

RESULTADOS

Concentración de IgA1 Sérica

Los resultados de los ensayos, mostraron que existe un incremento significativo en la concentración de IgA1 en el suero de los pacientes con diabetes tipo 2 (2.66 ± 0.93 mg/mL; $p < 0.001$) con respecto a la de los controles (1.76 ± 0.62 mg/mL) (Figura 4). Además como se observa en la gráfica existe una dispersión de los datos lo que indica la amplia variabilidad biológica que puede existir en las concentraciones de la IgA1 sérica en ambos grupos.

Aislamiento de Inmunoglobulinas Séricas Totales

El adsorbente hidrofóbico de Sefarosa-6B, presentó una capacidad de 3.1 mg/mL bajo condiciones saturantes de proteína, lo que representa una capacidad 2 veces mayor a la reportada anteriormente en este tipo de adsorbente (Vázquez-Moreno *et al*, 2001). Se aplicaron en promedio 120 mg de proteína total por corrida cromatográfica. En el cromatograma (Figura 5), se pueden observar dos fracciones, la primera que corresponde a la fracción de lavado (proteínas no adsorbidas), y la segunda corresponde a la fracción de elución (inmunoglobulinas séricas totales). Se obtuvieron en promedio 20 mg de inmunoglobulinas totales por corrida cromatográfica.

RESULTADOS

Concentración de IgA1 Sérica

Los resultados de los ensayos, mostraron que existe un incremento significativo en la concentración de IgA1 en el suero de los pacientes con diabetes tipo 2 (2.66 ± 0.93 mg/mL; $p < 0.001$) con respecto a la de los controles (1.76 ± 0.62 mg/mL) (Figura 4). Además como se observa en la gráfica existe una dispersión de los datos lo que indica la amplia variabilidad biológica que puede existir en las concentraciones de la IgA1 sérica en ambos grupos.

Aislamiento de Inmunoglobulinas Séricas Totales

El adsorbente hidrofóbico de Sefarosa-6B, presentó una capacidad de 3.1 mg/mL bajo condiciones saturantes de proteína, lo que representa una capacidad 2 veces mayor a la reportada anteriormente en este tipo de adsorbente (Vázquez-Moreno *et al*, 2001). Se aplicaron en promedio 120 mg de proteína total por corrida cromatográfica. En el cromatograma (Figura 5), se pueden observar dos fracciones, la primera que corresponde a la fracción de lavado (proteínas no adsorbidas), y la segunda corresponde a la fracción de elución (inmunoglobulinas séricas totales). Se obtuvieron en promedio 20 mg de inmunoglobulinas totales por corrida cromatográfica.

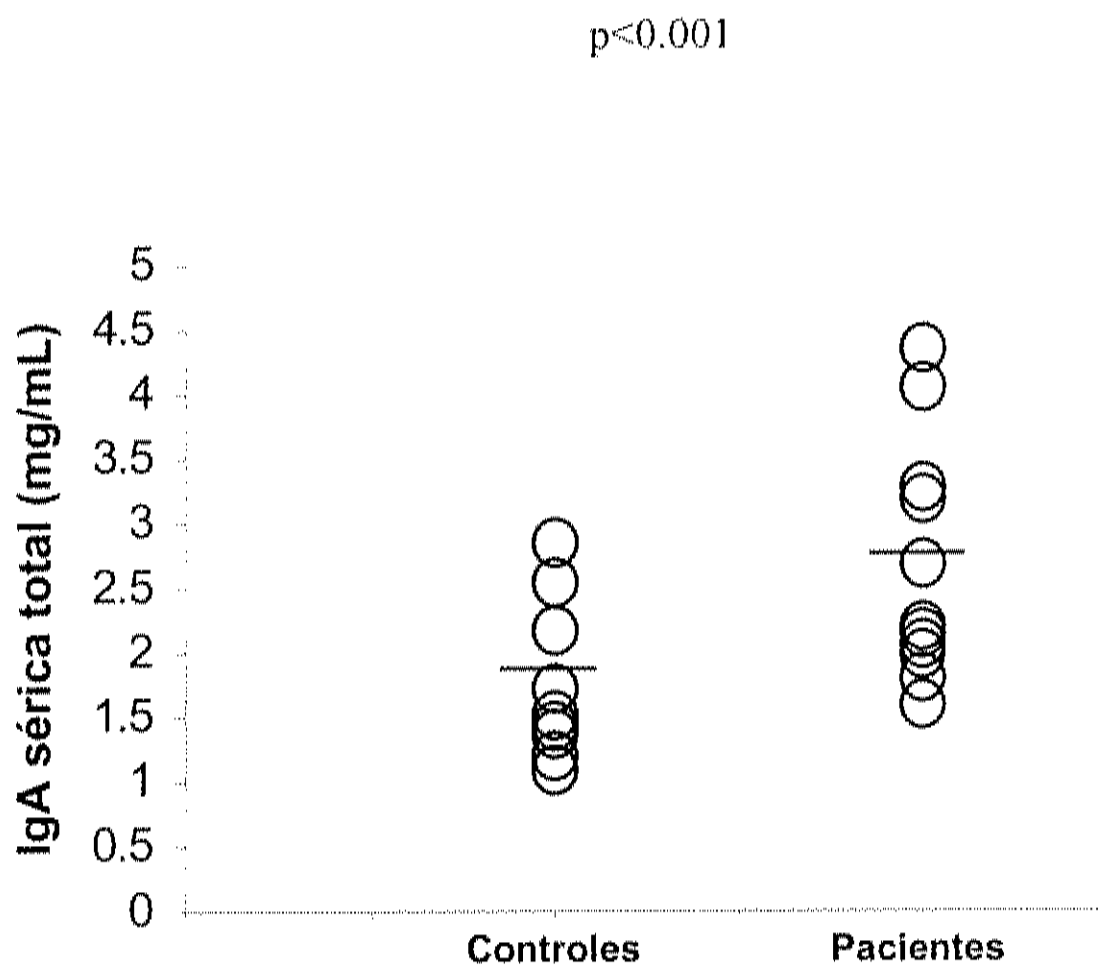


Figura 4. Niveles de IgA1 sérica total en los dos grupos de estudio. Cada círculo representa a un individuo. La barra señala la media de cada grupo, calculada por transformación logarítmica. La concentración de IgA1 en los pacientes, fue significativamente mayor que la de los controles.

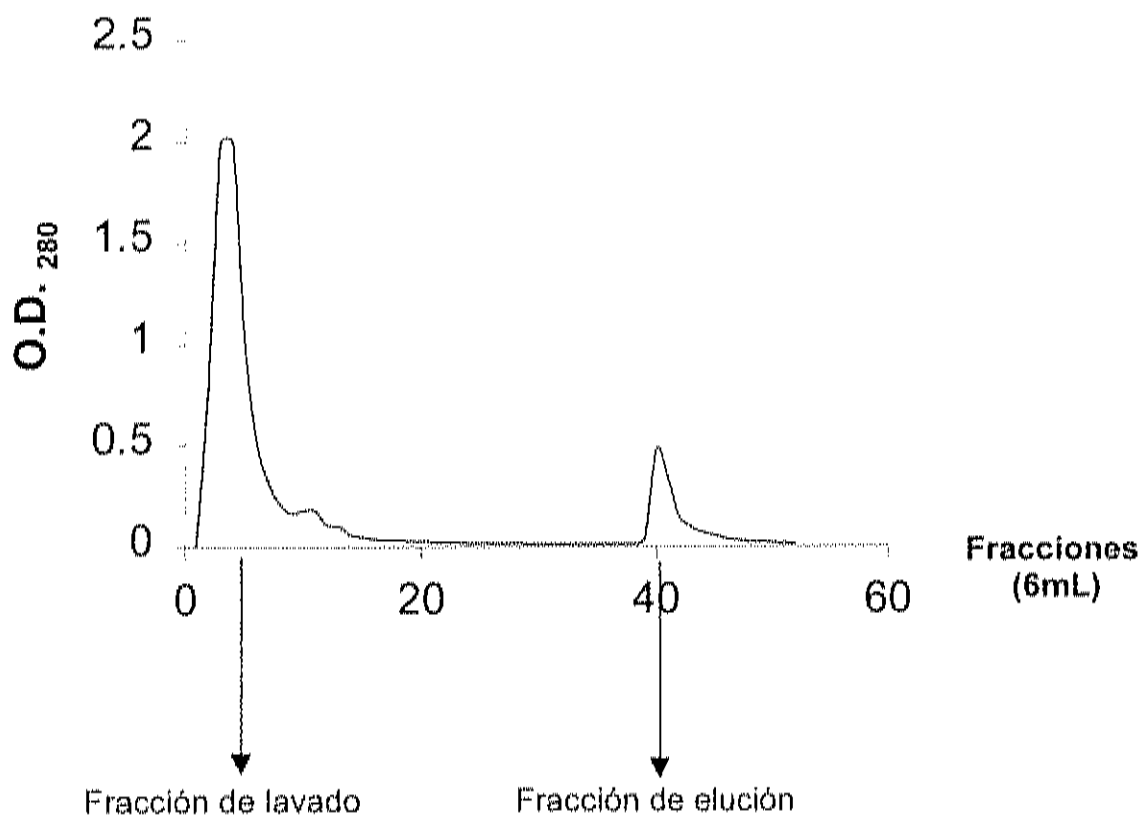


Figura 5. Aislamiento de inmunoglobulinas humanas séricas en Sefarosa-6B altamente acetilada. La solución proteica (120 mg) fue aplicada con Na_2SO_4 1M (fracción de lavado) y lavada con Na_2SO_4 0.5 M, pH 7.6. Las inmunoglobulinas fueron eluidas con PBS 20 mM, pH 7.2 (Fracción de elución).

Aislamiento de Inmunoglobulina A

El aislamiento de IgA total fue realizado utilizando una columna de agarosa anti-IgA, aplicándose en promedio 20 mg de inmunoglobulinas totales y recuperando en promedio 2.3 mg de IgA total. La recuperación de la proteína cargada fue del 100% y el porcentaje de IgA contenida en la fracción de elución fue mayor al 90%, garantizando así la recuperación de la mayor parte de las poliformas de IgA sérica. En el cromatograma (Figura 6) pueden observarse dos picos el primero corresponde a la fracción de lavado y el segundo a la fracción de elución a pH 2.6, que corresponde a las proteínas de interés.

Purificación de la IgA1

El adsorbente agarosa-jacalina, es un método ampliamente usado en procesos de separación en un solo paso de la IgA1; sin embargo se ha demostrado que la jacalina tiene también afinidad por otras glicoproteínas séricas, por ejemplo: el inhibidor C1, la gonadotropina coriónica, plasminógeno, factor de coagulación X, fetuina e IgD (Candia-Plata, 2000). Por ello, y para garantizar la pureza de la fracción IgA1, en este trabajo se emplearon las dos etapas cromatográficas previamente mencionadas antes de utilizar el adsorbente agarosa-jacalina.

Se aplicaron en promedio 2.3 mg de IgA total por corrida cromatográfica. Los picos observados en el cromatograma (Figura 7) corresponden a la fracción de lavado, que contiene IgA2, y a la fracción de elución eluida con galactosa 0.8

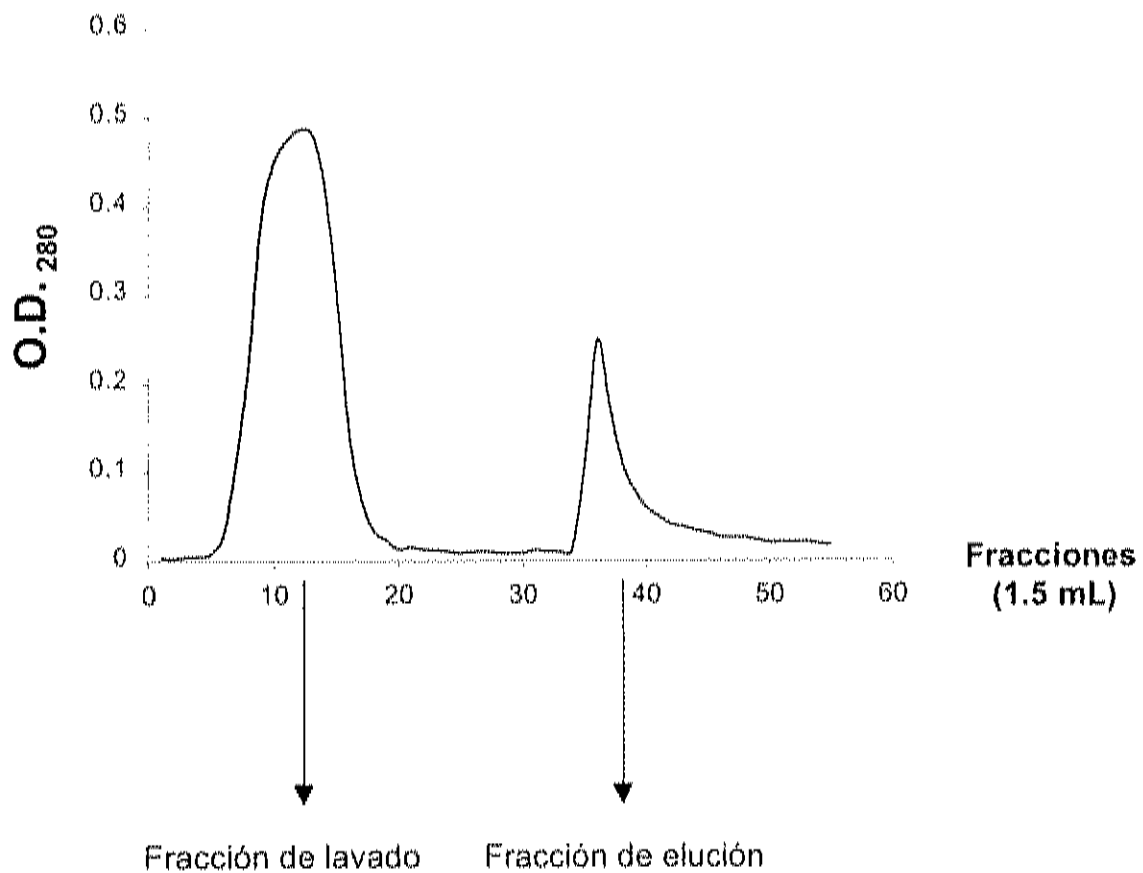


Figura 6. Aislamiento de IgA en agarosa anti-IgA. La solución de inmunoglobulinas (20 mg) fue aplicada y lavada con PBS pH 7.2 (Fracción de lavado); la IgA fue eluida con glicina-HCl pH 2.6 (Fracción de elución).

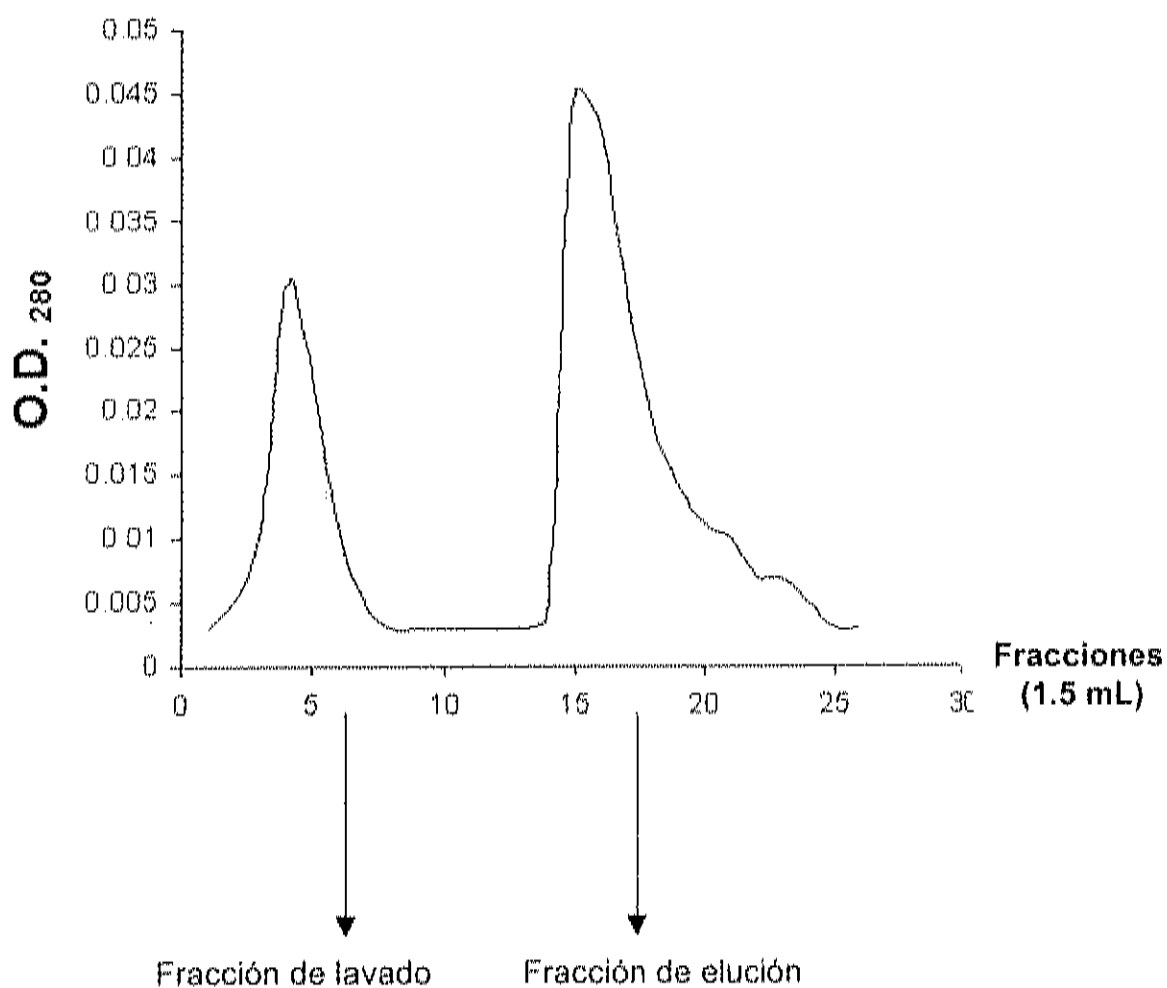


Figura 7. Cromatograma de la purificación de la inmunoglobulina A1 sérica. La solución de IgA total (2.3 mg), fue aplicada a la columna y las proteínas (IgA2) no adsorbidas al gel (Fracción de lavado) se removieron con PBS, pH 7.2. La fracción de IgA1 fue eluída con galactosa 0.8 M (Fracción de elución).

0.8M que contiene IgA1. La cuantificación de estas fracciones indicó que en promedio la fracción de elución contenía 1.09 mg de IgA1, que representa más del 47% de la IgA cargada a la columna y, por lo tanto, garantiza que la IgA1 obtenida está representada por una población amplia de poliformas.

Evaluación de la Pureza

La pureza de las fracciones de lavado y elución de las etapas cromatográficas, fue evaluada por SDS-PAGE (Figura 8), electrotransferencia e inmunodetección utilizando sueros anti-IgA1, anti-IgA2 y anti-IgG. Únicamente la fracción de elución obtenida en agarosa Jacalina (Figura 8, carril d) o generó señal con los antisueros anti-IgA2 y anti-IgG.

Separación de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular

La separación de las formas monomérica, polimérica y macromolecular de la IgA1 se realizó mediante cromatografía de filtración en gel (Bio Gel A; Bio Rad, USA), aplicando la fracción de elución obtenida en agarosa-jacalina (Figura 9). La recuperación de proteína en todas las corridas cromatográficas fue superior al 95 %.

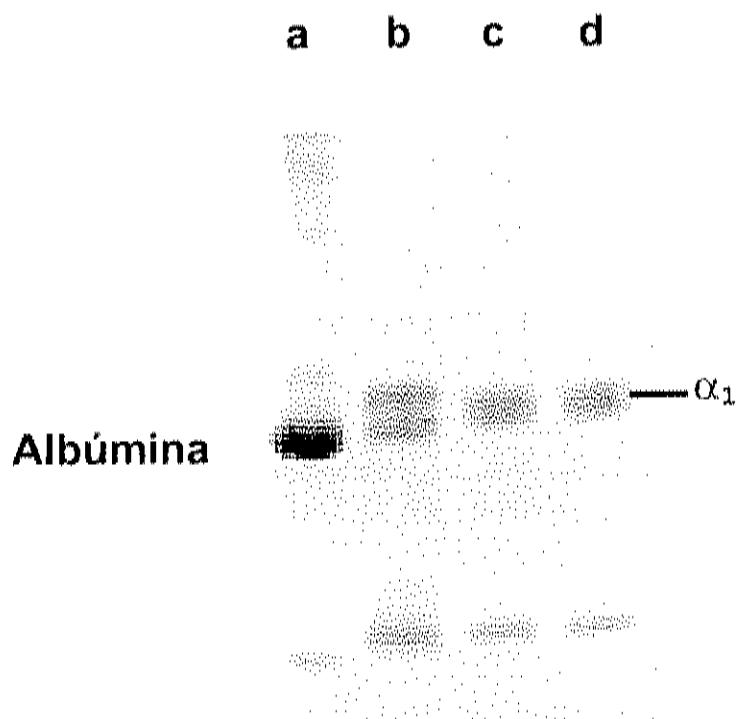


Figura 8. Electroforesis, en condiciones desnaturalizantes y reductoras, al 10%. El primer carril corresponde a suero humano (a) del cual se aislaron las inmunoglobulinas totales (b), utilizando Sefarosa-6B altamente acetilada, posteriormente la IgA (c) fue aislada de las inmunoglobulinas totales usando agarosa anti-IgA y la IgA1 (d) fue obtenida con agarosa-jacalina.

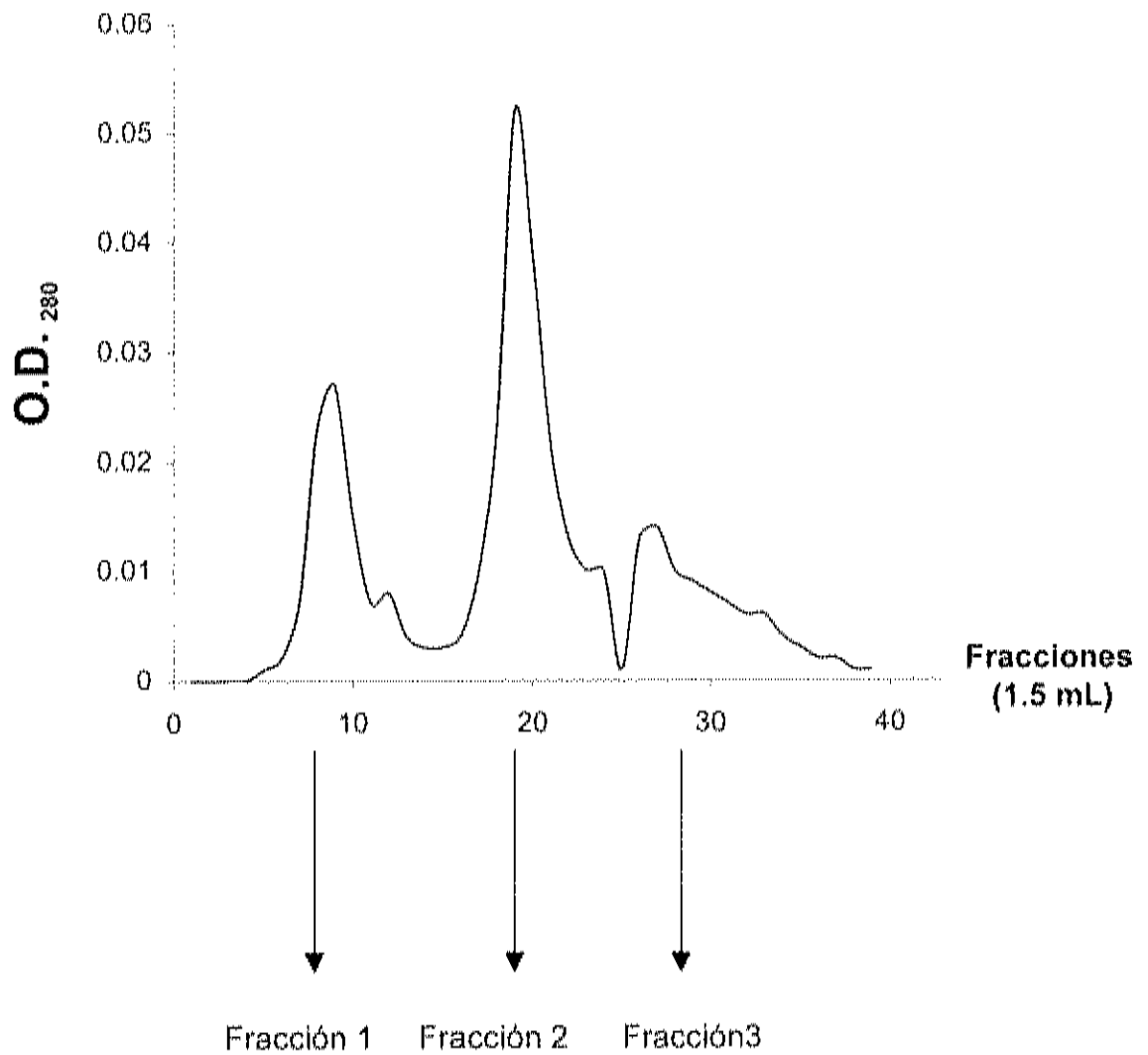


Figura 9. Cromatograma de una corrida de filtración en gel, para la separación de las formas de IgA1. La IgA1 macromolecular (Fracción 1), la IgA1 polimérica (Fracción 2) y la IgA1 monomérica (Fracción 3).

Ensayos de afinidad de la IgA1 Monomérica, Polimérica y Macromolecular por Lectinas

La finalidad de los lectinoensayos fue la de identificar cambios en los O-oligosacáridos de las diferentes fracciones de la IgA1 de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Estas diferencias fueron detectadas a partir de las absorbancias (a 450 nm) generadas por la interacción entre la IgA1 monomérica, polimérica y macromolecular de los controles y los pacientes, y las lectinas MMA, SNA y jacalina. Los resultados evidenciaron una disminución significativa ($p < 0.001$) en los niveles de galactosa terminal de la IgA1 polimérica de los pacientes con respecto a la de los controles (Figura 10). La afinidad reducida de esta fracción protéica hacia la lectina Jacalina, que reconoce *Gal* β 1,3 *GalNAc*, indica que los O-oligosacáridos son los afectados. Sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la afinidad con IgA1 monomérica y macromolecular de pacientes y controles hacia esta lectina.

El análisis de respuesta generada por la interacción de la IgA1 polimérica de pacientes y controles, con la lectina SNA indica que existen diferencias significativas ($p < 0.001$) en el contenido de ácido siálico en posición α 2,6 de los O-oligosacáridos, presentando mayor afinidad hacia esta lectina únicamente la fracción polimérica de los pacientes. No se observaron diferencias en las fracciones monomérica y macromolecular de ambos grupos (Figura 11).

Los resultados de la interacción de las fracciones de la IgA1 de ambos grupos hacia la lectina MMA, mostraron que las fracciones monomérica y polimérica de los pacientes, presentan gran afinidad hacia esta lectina. Esto indica que existe un aumento en el contenido de ácido siálico en posición α 2,3 de ambas fracciones. Las diferencias de afinidad fueron significativamente

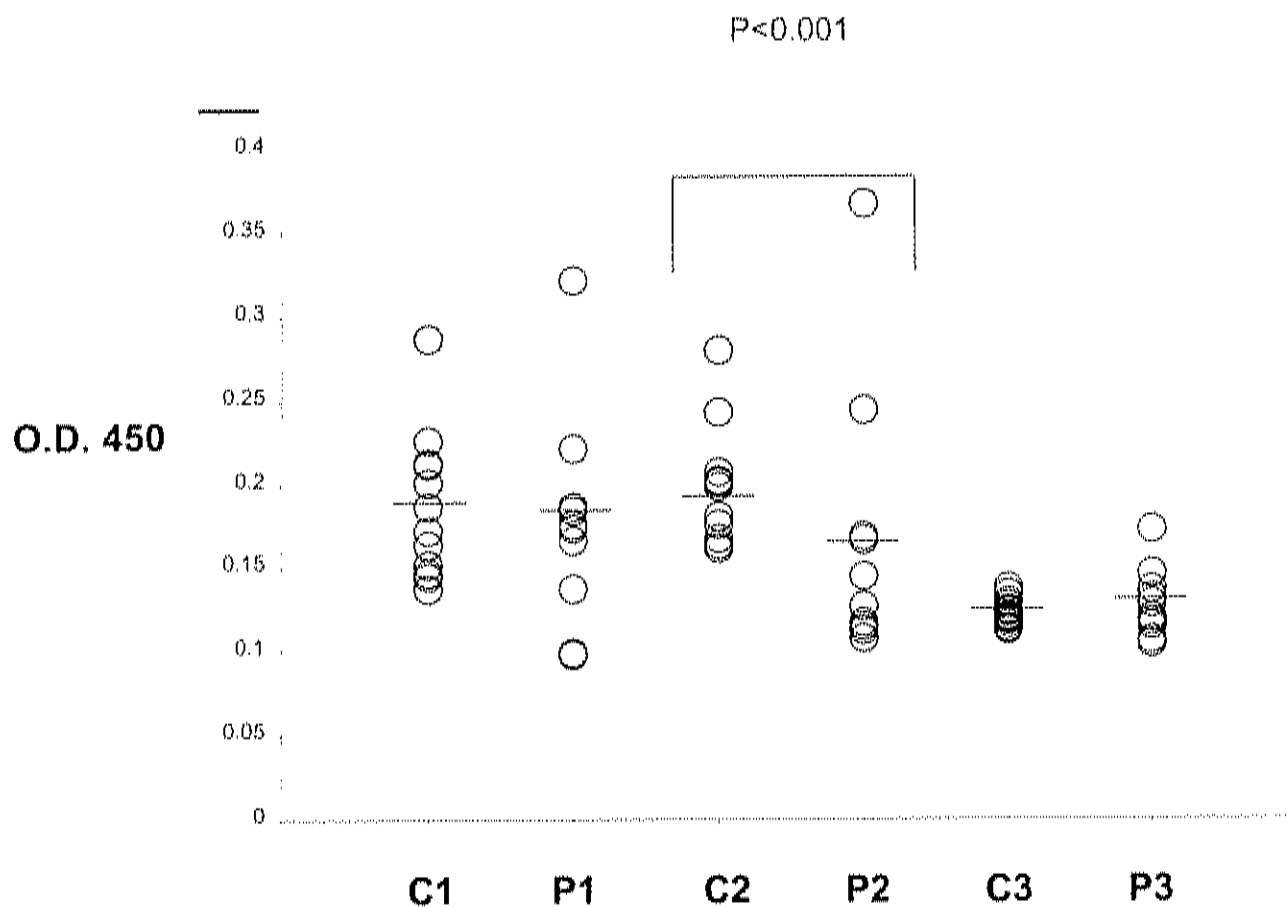


Figura 10. Relación de las diferencias de absorbancias de pacientes y controles de las fracciones de la IgA1 hacia la lectina Jacalina. Las dos primeras columnas corresponden a la fracción monomérica de los controles (C1) y de los pacientes (P1); La tercera y cuarta columna corresponden a la fracción polimérica de los controles (C2) y los pacientes (P2) y por último, las columnas cinco y seis corresponden a la fracción macromolecular de los controles (C3) y los pacientes (P3). La afinidad de la IgA1 polimérica de los pacientes hacia la lectina Jacalina fue menor ($p < 0.001$) comparada con la fracción polimérica de los controles.

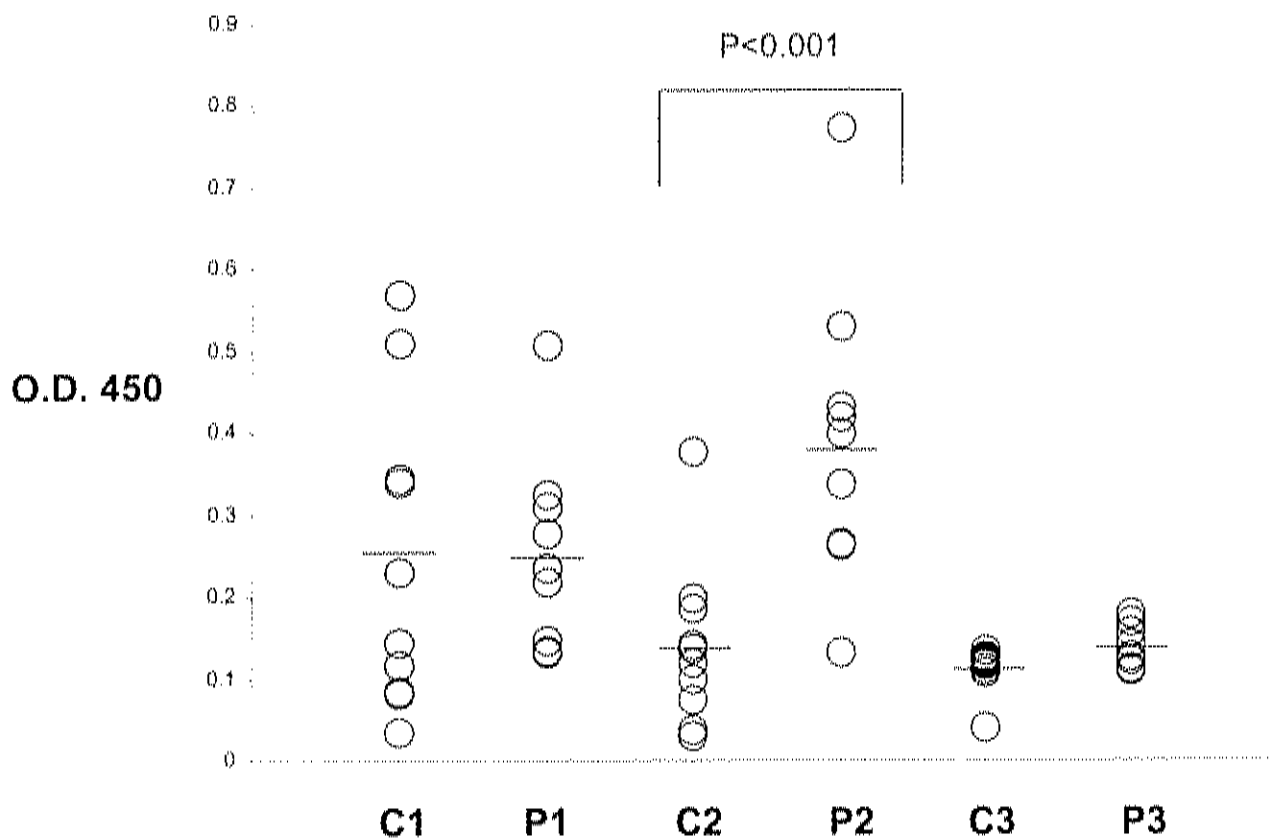


Figura 11. Relación de las diferencias de absorbancias de pacientes y controles de las fracciones de IgA1 hacia la lectina SNA. Las dos primeras columnas corresponden a la fracción monomérica de los controles (C1) y de los pacientes (P1); la tercera y cuarta columna corresponden a la fracción polimérica de los controles (C2) y los pacientes (P2) y por último, los carriles cinco y seis corresponden a la fracción macromolecular de los controles (C3) y los pacientes (P3). Únicamente existieron diferencias significativas ($p < 0.001$) en la afinidad a la lectina en la fracción polimérica.

mayores ($P < 0.001$) en los pacientes diabéticos, con respecto a la de los controles (Figura 12). No se observaron diferencias en la fracción macromolecular del grupo de pacientes con respecto al grupo control.

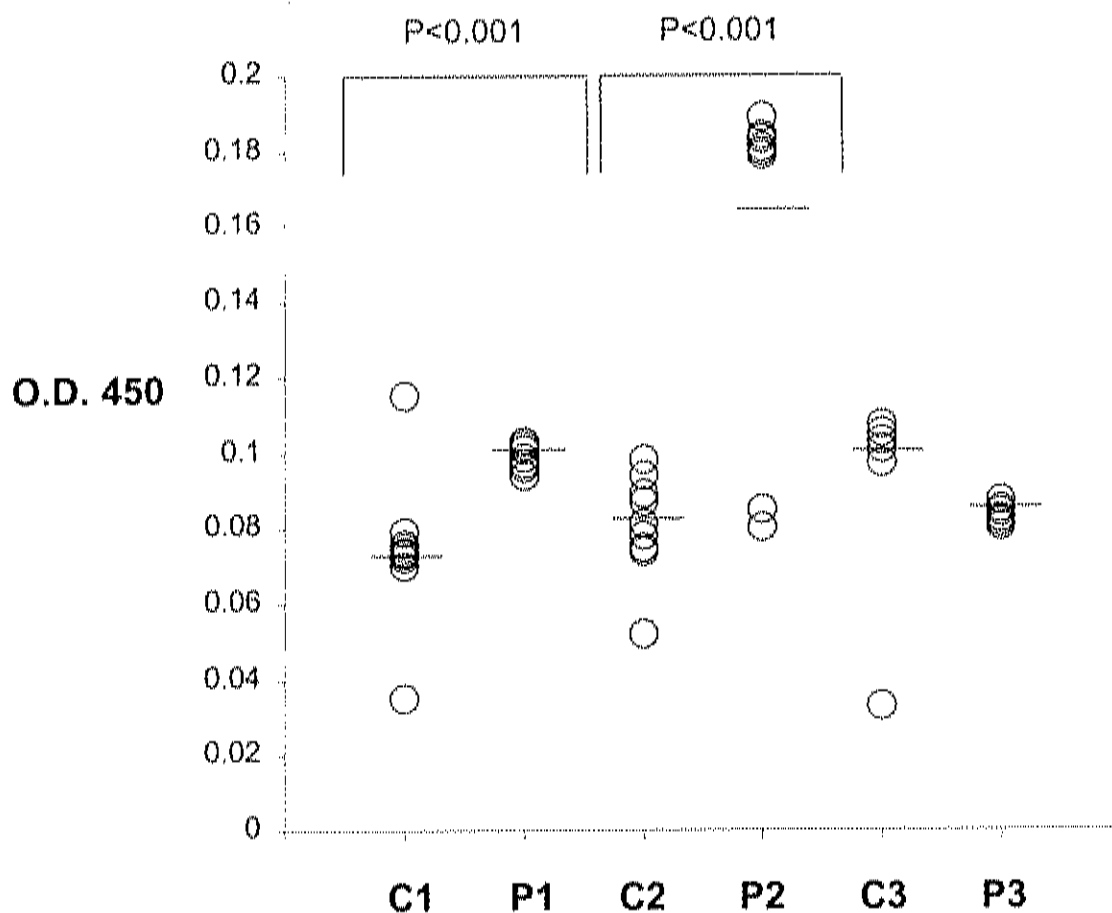


Figura12. Relación de las diferencias de absorbancias de pacientes y controles de las fracciones de IgA1 hacia la lectina MMA. Las dos primeras columnas corresponden a la fracción monomérica de los controles (C1) y de los pacientes (P1); La tercera y cuarta columna corresponden a la fracción polimérica de los controles (C2) y los pacientes (P2) y por último, los carriles cinco y seis corresponden a la fracción macromolecular de los controles (C3) y los pacientes (P3). La afinidad de la IgA1 monomérica y polimérica de los pacientes fue significativamente mayor ($p < 0.001$) que la afinidad de la lectina hacia las fracciones monomérica y polimérica del grupo control.

Caracterización de los O-oligosacáridos por Electroforesis de Carbohidratos Asistida con un Fluoróforo (FACE)

La hidrazinólisis de la IgA1 nativa produjo cuatro bandas de O-oligosacáridos (Allen *et al*, 1999), que se muestran con números arábigos en el carril d de la figura 13. En el gel de poliacrilamida también se observan algunas bandas que son productos de degradación (Patel *et al*, 1993) (Figura 13 carril d) de la muestra, debido al proceso químico de hidrazinólisis (Karlson y Packer, 2002; Merry *et al*, 2002; O'Neill *et al*, 1996; Patel *et al*, 1993).

Las posiciones de los O-oligosacáridos Gal β 1,3 GalNAc y GalNAc de las muestras de estudio fueron identificadas utilizando estándares comerciales de estos azúcares libres (Figura 14 carril a). El tratamiento de la IgA1 con ácido acético 0.2N produjo la desaparición de las bandas 1 y 3 (Figura 14 carril c) que de acuerdo con Allen *et al* (1999), corresponden a O-oligosacáridos bisialilado y monosialilado respectivamente. Por otro lado el tratamiento de la IgA1 desialilada con β 1,3-galactosidasa, produjo una disminución en la intensidad de la banda 2 (Figura 15 carril b), confirmando así que esta banda corresponde al disacárido GalNAc 1,3Gal (llamado también antígeno T) (Allen *et al*, 1999).

Los O-oligosacáridos de la IgA1 fueron analizados en 5 pacientes diabéticos tipo 2 y 5 controles por FACE. En ambos grupos de estudio se lograron identificar las bandas que corresponden a las cuatro O-glicofomas de la IgA1 (Figura 16 bandas 1, 2, 3 y 4). Las muestras fueron aplicadas en el gel y comparadas en forma pareada por su similitud en edad y sexo. Como se puede observar, la O-glicofoma más abundante en ambos grupos corresponde a la estructura monosialilada (Figura 16, banda 3); esto coincide con los resultados reportados por Mattu (*et al*, 1998) para el análisis de la IgA1. Tanto en la forma

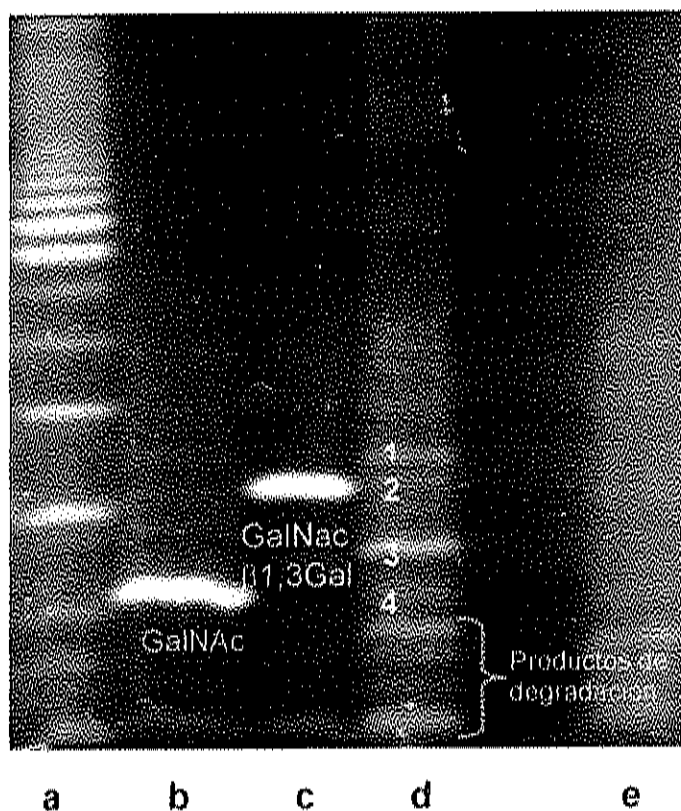


Figura 13. Estándares utilizados para la identificación de los O-oligosacáridos de la IgA1. Un estándar de almidón (a) fue utilizado como referencia para asegurar la homogeneidad en la estandarización de la preparación de los geles e identificar la posición de migración de los azúcares *GalNAc* (b) y *GalNAc*β1,3*Gal* (c). Los O-glicanos de la IgA1 (d) fueron aplicados al gel después de tratar la proteína con hidracina. Se identificaron cuatro bandas para los O-glicanos (1, 2, 3 y 4), lo señalado en corchete corresponden a los productos de degradación. Finalmente para corroborar que las bandas identificadas correspondían a los O-glicanos de la IgA1, se inyectó un control negativo (e).

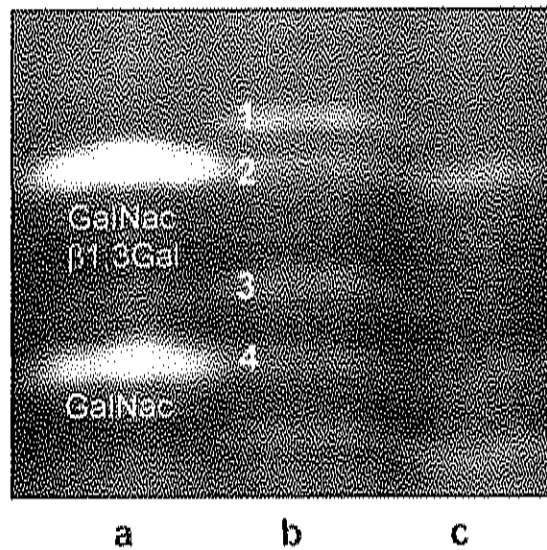


Figura 14. Identificación de las bandas de O-glicanos en electroforesis de carbohidratos (FACE). El carril (a) contiene los azúcares libres del disacárido *GalNAcβ1,3Gal* (en la parte superior) y el monosacárido *GalNAc* (banda inferior). En el carril (b) se aplicaron los O-glicanos provenientes de la IgA1 nativa, en el carril (c) se aplicaron los O-glicanos provenientes de la IgA1 desialilada completamente con ácido acético 0.2N.

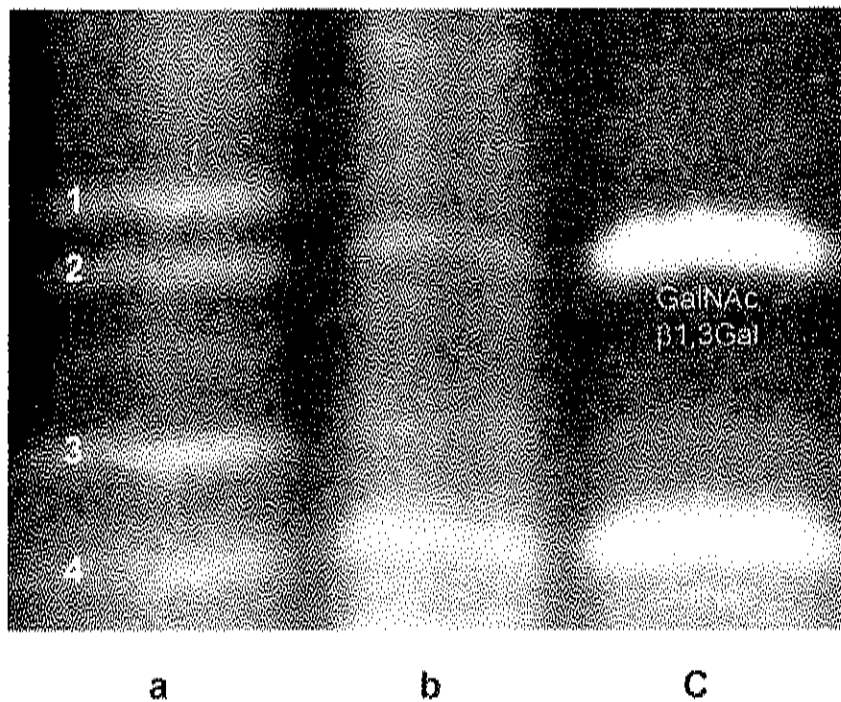


Figura 15. Identificación de la banda correspondiente al antígeno T de la IgA1. En el carril (a) se aplicaron los O-glicanos provenientes de la IgA1 nativa. En el carril (b) se aplicaron los O-glicanos provenientes de la IgA1 desialilada y digerida con una β -galactosidasa. El carril (c) contiene los azúcares libres del disacárido *GalNAc* β 1,3*Gal* y el monosacárido *GalNAc*.

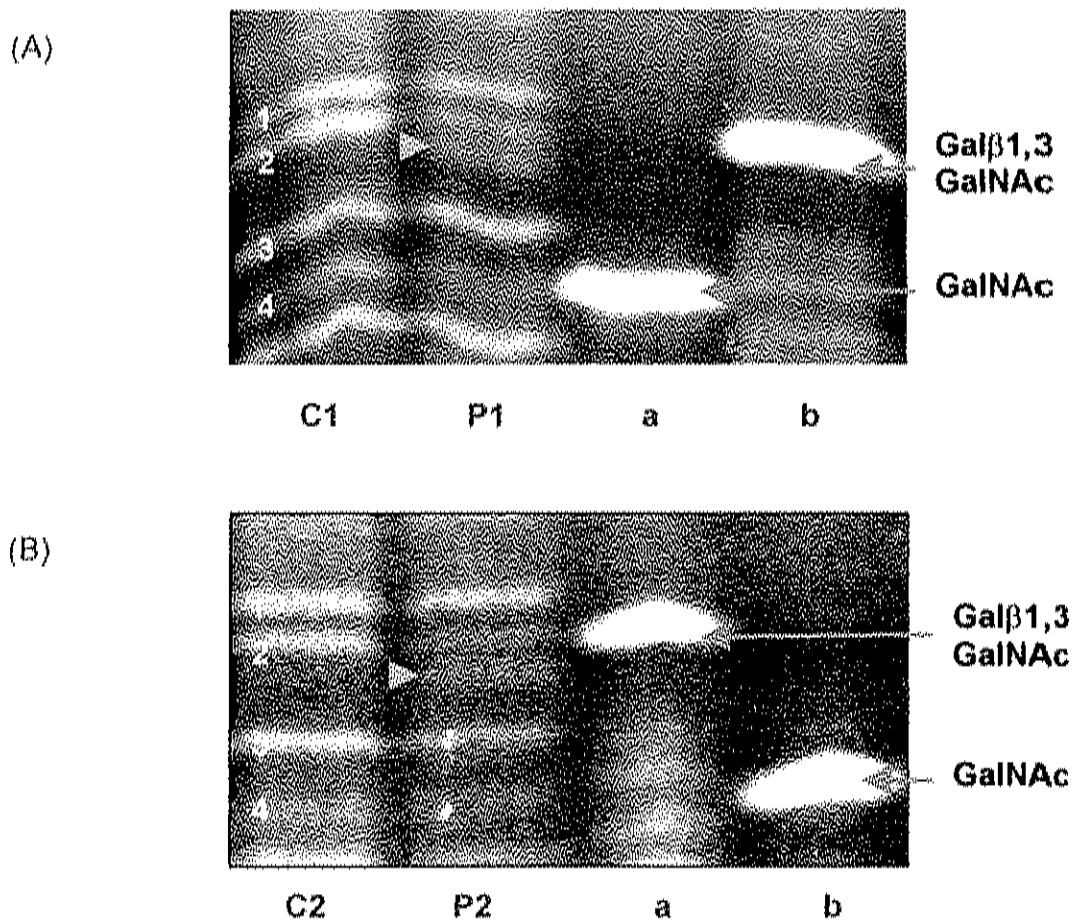


Figura 16. Análisis por FACE de los O-glicanos de la IgA1 en diabetes mellitus tipo 2 y sujetos control. Los carriles C1 y C2 corresponden a los controles, los carriles P1 y P2 corresponden a los pacientes diabéticos tipo 2. En los carriles (a) y (b) se aplicaron estándares de O-oligosacáridos (*GalNAc* y *Galβ1,3GalNAc*). Como se puede observar en los pacientes se presentó una disminución en la intensidad de la banda que corresponde al antígeno T (*Galβ1,3GalNAc*); indicado con flecha se observa una banda adicional en los carriles P1 y P2 que no fue observada en los carriles C1 y C2.

monosialilada como en la bisialilada (Figura 16, banda 1) no se observaron diferencias entre pacientes y controles en el contenido de estas bandas. Tampoco se observaron diferencias en la banda cuatro (*GalNAc* o llamado también antígeno Tn). Sin embargo, la banda dos que corresponde al antígeno T (*GalNAc* β 1,3 *Gal*), es menos intensa en los pacientes que en los controles, lo que sugiere que hay menor cantidad de galactosa expuesta en la IgA1 de los pacientes con respecto a la IgA1 de los controles.

Una banda adicional fue observada en las muestras de los pacientes (Figura 16 señalada con flecha), localizada debajo de la banda que corresponde al antígeno T, la cual probablemente (por su posición) corresponde a isoformas sialiladas. Esto último sugiere que la reducción en la intensidad de la banda del antígeno T podría darse a expensas de la aparición de mayor número de isoformas encontradas en los pacientes.

DISCUSIÓN

En la actualidad, la diabetes mellitus tipo 2 es la enfermedad crónica degenerativa con mayor índice de morbilidad y mortalidad en el mundo, cuyo impacto se deriva de las complicaciones vasculares que produce. Al mismo tiempo, durante la evolución de la enfermedad, se producen cambios bioquímicos, como la elevación persistente de la IgA1 sérica (Ardawi *et al*, 1994; Eguchi *et al*, 1995; Figueredo *et al*, 1996; Gill *et al*, 1981; Rodríguez-Segade *et al*, 1996; Triolo *et al*, 1984). Sin embargo, existen pocos estudios que se han dedicado a explorar la existencia de cambios en la estructura de esta glicoproteína y sólo se han explicado de forma parcial (Candia-Plata, 2000; Vázquez-Moreno *et al*, 2001).

Normalmente, los procesos de degradación y síntesis de la IgA1, mantienen reguladas las concentraciones de esta molécula en el torrente circulatorio. Por ello, algunos autores proponen que el aumento de IgA1 sérica en los pacientes con diabetes, es debido a una disminución en su aclaramiento plasmático. Una pieza fundamental para que se realice normalmente este proceso, es la participación de los O-oligosacáridos que están unidos covalentemente a la IgA1. Los asialoglicoreceptores hepáticos llevan a cabo el reconocimiento de estos carbohidratos para proseguir con la internalización de la molécula y finalmente llevar a cabo su degradación (Rocatello *et al*, 1993). Esto se realiza cuando existe una pérdida de ácido siálico terminal en los O-oligosacáridos de la molécula, esto provoca una exposición mayor de un residuo de galactosa (Chaung *et al*, 1997; Iwase *et al*, 1999; Leung *et al*, 1999). Por ello, cambios sutiles en la estructura de los O-oligosacáridos de la IgA1, tales como el

aumento de ácido siálico, podrían repercutir en su aclaramiento y explicar su aumento en circulación.

Existen pocos estudios que han tratado de explicar el origen de la elevación de la IgA1 a partir de la detección de cambios estructurales en los oligosacáridos de la molécula. Entre los pocos cambios detectados se encuentra el aumento de ácido siálico en la IgA1 polimérica (Vázquez-Moreno *et al*, 2001). Sin embargo la IgA1 monomérica constituye la fracción mayoritaria en el suero y aún no ha sido caracterizada. Por ello en este estudio se diseñó un esquema de purificación óptimo para obtener a la IgA1 monomérica, polimérica y además la fracción macromolecular. Esto permitió conocer de forma particular, la participación de cada fracción en el incremento de IgA1 sérica total, con base en la detección de cambios en sus O-oligosacáridos.

Se cuantificaron los niveles de IgA1 a partir del suero de un grupo de 11 pacientes diabéticos y 9 sujetos control. Los resultados indicaron que en el grupo de pacientes existe un aumento significativo ($p < 0.001$) de esta molécula, estos datos coinciden con los reportados por Ohmuro y col., 1993; y Vázquez-Moreno y col., 2001. Esto que confirma la importante participación de el subtipo IgA1 en el incremento de IgA total (Ohmuro *et al*, 1993; Vázquez-Moreno *et al*, 2001).

La purificación de IgA1 sérica, fue realizada mediante un esquema de tres etapas cromatográficas. En la primera etapa, se utilizó cromatografía de interacciones hidrofóbicas (Sefarosa-HA) y en la segunda etapa y tercera etapas se utilizó cromatografía de afinidad biológica para purificar a la IgA1 sérica con agarosa anti-IgA y agarosa-jacalina respectivamente. Con este esquema la pureza de la IgA1 obtenida en este trabajo fue alta, y la recuperación de las fracciones de IgA1 mayor al 95% con respecto a cantidad de muestra aplicada.

Para estudiar las posibles diferencias en la glicosilación de las fracciones de la IgA1 de pacientes y controles, se realizaron lectinoensayos en placa

utilizando tres lectinas con afinidad hacia O-glicanos. La reacción positiva con la lectina jacalina indica la presencia del antígeno $GalNAc\beta 1,3Gal$ sin ácido siálico terminal (Hiki *et al*, 1996; Leung *et al*, 1999) y una reacción positiva con la lectina SNA indica la presencia de ácido siálico terminal en $\alpha 2,6$ ligado a galactosa y con MMA indica la presencia de ácido siálico terminal en $\alpha 2,3$ ligado a galactosa (Leung *et al*, 1998). Los resultados obtenidos en los lectinoensayos indican que la fracción polimérica de los pacientes, presentó una mayor afinidad hacia las lectinas MMA y SNA ($p < 0.001$) y menor afinidad hacia la lectina jacalina, con respecto a la fracción polimérica de los controles. Esto indica que la fracción polimérica de los pacientes presenta un aumento de ácido siálico en posiciones $\alpha 2,6$ y $\alpha 2,3$ y una disminución en el contenido de galactosa terminal. El único cambio detectado en la fracción monomérica de los pacientes fue un aumento en el contenido de ácido siálico en posición $\alpha 2,3$, comparando esta fracción con la de los controles. Esto indica que las fracciones monomérica y polimérica de los pacientes diabéticos están contribuyendo a que exista una alteración en la microheterogeneidad de los O-glicanos de la IgA1.

Los datos generados coinciden con los obtenidos por Vázquez-Moreno y *col* (2001), ya que su estudio indica que la fracción polimérica está hiersialilada. Sin embargo, el hallazgo en este estudio fue detectar que la fracción monomérica también está contribuyendo al incremento de ácido siálico en la IgA1.

FACE logró ser una herramienta útil para lograr la caracterización de carbohidratos en la IgA1 nativa. Pese a que este es el primer reporte en el que se muestra el análisis de O-glicanos en la IgA1 de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 mediante esta técnica, la información generada fue de gran relevancia. Los resultados obtenidos por FACE indican que en la IgA1 nativa de los pacientes existe una disminución del O-oligosacárido que contiene galactosa

terminal. La disminución en la exposición de este monosacárido podría explicarse en base a que existe un aumento de ácido siálico en las diferentes fracciones de IgA1, que podría estar provocando el enmascaramiento del monosacárido de galactosa. Además los análisis con lectinas indican que la fracción polimérica es la que contribuye mayoritariamente a este efecto. Por otro lado es de gran importancia indicar que en el perfil electroforético de los O-glicanos de los pacientes, apareció una banda extra que fue ausente en las muestras de los controles. Este indicio podría ser postulado como un marcador bioquímico en esta enfermedad, de ahí deriva la importancia de realizar más estudios en cuanto a la caracterización de carbohidratos no solo en los de tipo "O" si no también en los de tipo "N" . Así como también analizar la actividad de glicosiltransferasas involucradas en los procesos de glicosilación de la molécula de IgA1.

CONCLUSIÓN

Los análisis de lectinas y FACE demostraron que existe una alteración en la microheterogeneidad de la IgA1 de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con respecto a la de los controles. Con los resultados generados se concluye, que dos de las tres fracciones de la IgA1 de los pacientes están hipersialiladas (monomérica y polimérica). Sin embargo la fracción polimérica de los pacientes diabéticos tipo 2 presenta el mayor grado de sialilación. Estos resultados sugieren que el aumento de ácido siálico de la IgA1 podrían enmascarar los residuos de galactosa terminal en los O-oligosacáridos. Ello podría evitar la interacción de IgA1 con los receptores que llevan a cabo su remoción, contribuyendo al aumento de la molécula en el torrente circulatorio.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas KA, Litchman HA, Pober SJ. 1999. Inmunología celular y molecular. Mc Graw Hill. 3^a ed. Madrid, España. Pp: 58-69.

Actis DS, Rebolledo OR. 2000. La glicación y la glicoxidación de las lipoproteínas su importancia en la diabetes mellitus. *Med.* 60(5): 645-656.

Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. 1995. Serum paraoxanose activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(11):1812-8.

ALAD.1995. Consenso sobre prevención, control y tratamiento de la diabetes mellitus no insulino dependiente. Antártica S.A.C.I.F.E. Buenos Aires, Argentina. Pp:7-62.

Altman TJ, Todd JA. 1995. Molecular genetics of diabetes mellitus. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 9(3):631-56

Allen AC, Balley ÉM, Barrat J, Buck KS, Feehally J. 1999. Analysis of IgA1 O-glycans in IgA Nephropathy by Fluorophore-Assisted Carbohydrate Electrophoresis. *J Am Soc Nephrol.* 10:1763-1771.

Allen AC, Bailey EM, Brenchley PC, Buck KS, Barrat J, Feehally J. 2001. Mesangial IgA1 in IgA nephropathy exhibits aberrant O-glycosilation: Observations in three patients. *Kidney Int.* 60:969-973.

American Diabetes Association. 1999. Accesado en:
<http://www.diabetes.org/main/type2/complications/complications.jsp>, 15-abr-02.

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

Aucunturier 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.* 113:185-191.

Bardor M, Cabanes-Machetau M, Faye L, Lerouge P. 2000. Monitoring the N-glycosilation of plant glycoproteins by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis. *Electrophoresis.* 21(12):2550-2556.

Basset C, Devauchelle V, Durand V, Jamin C, Pennec Y-L, Youinou P, Dueymes M. 1999. Glycosylation of Immunoglobulin A Influences Its Receptor Binding. *Scand J Immunol.* 50:572-579.

Biwenga J, Hiemstra PS, Steneker I, Daha MR. 1989. Binding of human IgA1 fragments to jacalin. *Mol Immunol.* 26(3):275-281.

Borak G, Hirsch IB. 1998. The Effects of Improved Glycemic Control on Complications in Type 2 Diabetes. *Arch Int Medicine.* 158:134-140.

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.

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.* 72:248-254.

Braunwald E, Facui AS, Hauser SL, Jameson JL, Kasper DL, Long DL. 2002. Harrison: Principlos de Medicina Interna. McGraw Hill Interamericana. 15^{va} ed. Vol II: 2467-2499.

Brody, T. 1999. Nutritional Biochemistry. Academic Press. 2^a ed. San Diego, California. Pp:171-174, 357-360.

Brownlee M. 1995. Advanced protein glycosilation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med.* 46: 223-34

Candia-Plata M, Jiménez P, Sánchez SA, Carvajal DA, Villarreal GJ, Vázquez-Moreno L. 2001. Niveles elevados de IgA en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 no complicados. *Biotecnia.* 3(1):12-16.

Candia-Plata M. 2000. Caracterización de los Oligosacaridos del Fc de la IgA1 Sérica de Pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2. Tesis doctoral. CIAD, A.C. Pp: 1-36.

Ceriello A. 2003. The possible role of postprandial hyperglycaemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetol.* 46(1):M9-M21.

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

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):130-134.

Cheta D, Mihaescu S, Mihalache N. Immunoglobulin A in diabetics. 1982. *Med Interne.* 20(1):15-17.

Crook MA, Pickup JC, Lumb PJ, Georgino F, Web DJ, Fuller JH. 2001. relationship Between Plasma Sialic Acid Concentration and Microvascular and Macrovascular Complications in Type 1 Diabetes. *Diab Care.* 24:316-322.

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

Cummings R. 1994. Use of Lectins in Analysis of Glycoconjugates. En: Guide to TECHNIQUES IN GLYCOBIOLOGY. Lennarz W y Hart G (Eds), Academic Press, Inc. San Diego, CA. P. 66-85

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

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* 41:165-169.

Dell A, Reason JA, Kay-Hoo K, Panico M, McDowell AR, Morris RH. 1994. Mass Spectrometry of Carbohydrate-Containing Biopolymers in Guide to Techniques in Glycobiology. Academic Press, Inc. San Diego, California. Pp:108.

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

Eguchi K, Yagame M, Susuki 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):42-48.

Feehally J, Allen S. 1999. Structural features of IgA molecules which contribute to IgA nephropathy. *J Nephrol*. 12(2). 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: 261-275.

Figueredo A, Ibarra JL, Rodriguez A, Molino AM, Gomez E, Fernandez A, Patiño R. 1996. Increased serum levels of IgA antibodies to hsp-70 protein in patients with diabetes mellitus: their complications. *Clin Immunol Immunopathol.* 79:252-255.

Fujimoto W, Boyko E, Chen KW, Leonetti D, Newell L, Wahl P. 1995. Visceral adiposity, blood pressure, and glucose are independent risk factors for coronary heart disease. 16th International Diabetes Federation Congress. Abstracts, *Diabetologia supplement:* 0109.

Ganong WF. 1998. Fisiología Médica. Antonio Lemus Gamboa. 16^a ed. México. Pp: 383-384.

Gill CW, Bush SW, Burleigh WM, Cooke GD. 1981. Elevation of IgA Levels in the Non-insulin-dependent (type II) Diabetic Patient. *Diabetes Care.* 4(6): 636-639.

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

Gou-Fu H. 1995. Fluorophore-assited carbohydrate electrophoresis Technology and applications. *J Chromatog B.* 705: 89-103.

Gou-Fu H. 1997. Analysis of Protein-Carbohydrate Interactions by FACE/Gel Retardation Assay. En: A Laboratory Guide to Glycoconjugate Analysis. Jackson P y Gallagher J (Eds). Birkhäuser Verlag. Germany. p.349-350.

Hanson RL, Elston RC, Pettitt DJ, Bennett PH, Knowler WC. 1995. Segregation analysis of non-insulindependent 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-*et al.*, 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.* 7:955-960.

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

Iwase H, Tanaka A, Hiki Y, Kokubo T, Sano T, Ishii-Karakasa I, Hisatani K, Kobayashi Y, Hotta K. 2001. Analysis of the microheterogeneity of the IgA1 Hinge Glycopeptide Having Multiple O-Linked oligosaccharides by Capillary Electrophoresis. *Anal Biochem.* 288:22-27.

Iwase H, Ohkawa S, Ishii-Karasaka I, Hiki Y, Kokubo T, Sano T, Tanaka A, Toma K, Hotta K. 1999. Study of the relationship between sticky human

serum IgA1 and its O-glycan glycoform. *Biochem Biophys Res Comm.* 261:472-477.

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.* 728:175-183.

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.

Jackson P. 1994. the Analysis of Fluorophore-Labeled Glycans by High-Resolution polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal Biochem.* 216:243-252.

Jímenez PM y Sánchez SA. 1997. Influencia del Nivel de Control Glicémico sobre la Concentración de Inmunoglobulinas Séricas en Pacientes con Diabetes Mellitus no Insulinodependientes. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora. Pp: 51.

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):153-161.

Kanauchi M, Kawano T, Dohi K. 2000. Serum IgA levels in patients with diabetic nephropathy and IgA nephropathy superimposed diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 48(2):113-118.

Karas M, Bahr U. 1993. Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Bioorganic Molecules en Spectroscopic Methods and Analysis. Humana Press. New Jersey, E.U.A. Pp: 215-227.

Koschinsky 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.* 14:81-85.

Köttgen AE, Hell KB, Müller C, Tauber R. 1993. Glycoprotein-Lectin-Immunoabsorbent Assay (GLIA). En: Lectins and Glycobiology. Springer-Verlag press, Germany. p:141

Laemli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T₄. *Nature.* 227:680-685.

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.

Leung CK, Tang CW, Chan TM, Lui SL, Lai KR. 2002. Increased Sialylation of polymeric λ -IgA1 in Patients With IgA Nephropathy. *J Clin Lab Anal.* 16:11-19

Leung J, Tang S, Fai M, Mao T, Neng K. 2001. Charge-dependent binding of polymeric IgA1 to human mesangial cells in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 59:277-285.

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

Loomes ML, Stewart WW, Mazengra LR, Senior WB, Kerr AM. 1991. Purification and characterisation of human immunoglobulin IgA1 and IgA2 isotypes from serum. *J Immunol Methods.* 141:209-218.

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

Mahhan KL, Escott SS. 1999, *Nutricion y Dietoterapia de Krause.* Mc Graw Hill. 9^a ed. México. Pp: 700-721.

Matsubara A, Tanizawa Y, Matsutani A, Kaneko T, Kaku K. 1995. Séquence 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 T, Pleass R, Willis A, Killian M, Wormald M, Lellouch A, Rudd P, Woof J, Dwek R. 1998. The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc and the role of N-Glycosylation on Fc α receptor interactions. *J Biol Chem.* 273:2260-2272.

Merry AH, Neville DCA, Royle L, Matthews B, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM. 2002. Recovery of Intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans Released from Glycoproteins by Hidrazinolisis. *Anal Biochem.* 304:91-99.

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.

Miranova M, Klein RL, Virella GT, Lopes VM. 2000. Anti- modified LDL-containing immune complexes, and suceptibility of LDL to in vitro oxidation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 49:1033-1041.

Montgomery R, Conway T, Spector A. 1993. Bioquimica casos y texto. Times Mirror de España. 5ª ed. Barcelona, España. Pp: 657-713.

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

Nangia-Makker P, Conklin J, Hogan V, Raz A. 2002. carbohydrate-binding proteins in cancer, and their ligands as therapeutic agents. *Trends in Mol Med.* 8(4): 187-191.

Novak J, Tomana M, Killian M, Coward L, Kulhavy R, Barnes S, Mestacky J. 2000. Heterogenelty of O-glycosylation in the hinge región of human IgA1. *Mol Immunol.* 37:1047-1056.

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

O'Neill RA. 1996. Enzymatic release of oligosaccharide from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis. *J Chromatogr.* 720:201-215.

Olczyk K, Hoscielniak-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 Białymst.* 39:93-9.

Patel T, Bruce J, Merry A, Bigge C, Wormald M, Jaques A, Parekh R. 1993. Use of Hydrazine to Release Intact and Unreduced Form both N- and O-Linked Oligosaccharides from Glycoproteins. *Biochem.* 32:679-693.

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.

Raju TS. 2000. Electrophoretic Methods for the Analysis of N-Linked Oligosaccharides. *Anal Biochem.* 283:125-132.

Rocatello D, Piccioto G, Torchio M, Ropolo R, Ferro M, Franceschini R, Quattrocchio G, Cacace R, Sena L, Guiseppe PF, Guiseppe P. 1993. Removal Systems of Immunoglobulin A and Immunoglobulin A Containing Complexes in IgA Nephropathy and Cirrhosis Patients. *Lab Invest.* 69(6):714-722.

Rodriguez SS, Félix CM, Carnero A, Lorenzo M, Alban A, Quintero 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):1064-1067.

Royle L, Mattu TS, Hart E, Langridge IJ, Merry HA, Murphy N, Harvey JD, Dwek AR, Rudd MP. 2002. Analytical and Structure Database Provides a Strategy for Sequencing O-Glycans from Microgram quantities of Glycoproteins. *Anal Bioch*: 304:70-90.

Saso L, valentini G, Giardino AM, Spadaro A, Riccieri V, Zoppini A, Silvestrini B. 1998. Changes of glycosilation of serum proteins in psoriatic arthritis, studied by enzyme-linked lectin assay (ELLA), using concanavalin A. *Biochem Mol Biol Int*. 46(5): 867-75.

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

Schimd A, Yan SD, Wautier JL, Stern D. 1999. Activation of receptor for advanced glycation end products. A mecahnism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 84: 489-497.

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.

Siu-Ka M, Ping-Nam W, Kin-Yee L, Tong GM, Wong AK. 2001. Prospective study on renal outcome of IgA nephropathy superimposed on diabetic glomerulosclerosis in type 2 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplat*. 16:1183-1188.

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

Spliss M. 1990. The asialoglycoprotein receptor: a model for endocytic transport receptors. *Biochem.* 29 (43): 10009-10016.

Starr CM, Masada RI, Hague C, Skop E, Klock JC. Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis in the separation, analysis, and sequencing of carbohydrates. 1996. *J Chromatogr.* 720:295-321.

Sørensen V, Sundvold V, Michaelsen ET, Sandlie I. 1999. Polymerization of IgA and IgM: Roles of cys³⁰⁹/cys⁴¹⁴ and the secretory tailpiece. *J Immunol.* 162: 3448-3455.

Steen PV, Rudd PM, Dwek RA, Opdnakker G. 1998. Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 33(3):151-208.

Stites DP. 1999. Inmunología Básica y Clínica. El Manual Moderno. 9^a ed. México. Pp: 109-112, 225-235.

Sumar N, Bodman KB, Rudd PM. 1993 Glycoprotein-Lectin-Immunoabsorbent Assay (GLIA) en Lectins and Glycobiology. Springer-Verlag press, Germany. pp:158

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

Tiran A, Piever T, Tiran B, Halwachs-Baumann G, Dobnig H, Grubelnig H, Wilders-Truschnig MM. 1994. Automated determination of glycosylated hemoglobin: comparative evaluation of five assay systems. *J Clin Lab Anal.* 8(3):128-134.

Tomana M, Novak J, Julina BA, Matousvic 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.

Toraño A, Tsuzukida Y, Yu-Sheng VL, Putnam FW. 1997. Location and structural significance of the oligosaccharides in human IgA1 and IgA2 immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(6): 2301-2305

Triolo G, Giardina E, Scarantino G, Seddio G, Bomplani G. 1989. Detection of anti-phospholipid (cardiolipin, phosphatidylserine) antibodies in the serum of patients with non insulin-dependent diabetes mellitus (type 2) and macroangiopathy. coexistence of anti-platelet reactivity. *Diabetes Res.* 10(2):63-7.

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):116-169.

Triolo G, Giardina E, Zarcone MR, Giordano C, Rinaldi A, Bomplani GD. 1984. Contribution of secretory IgA, polymeric IgA and IgA/secretory component-containing circulating immune complexes to the serum hyper-IgA in diabetes mellitus. *Diabetology.* 27:157-159.

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

Universidad de Alicante. Espectrometría de masas. 1-Oct-1998 Accesado en: <http://www.ua.es>

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, Candia-Plata MC, Robles BM. 2001 Hypersialylated Macromolecular Serum Immunoglobulin A1 in Type 2 Diabetes Mellitus. *Clin Biochem*. 33:1-7.

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

Yoo E, Coloma MJ, Trinh KR, Nguyen QT, Uyen L, Vuong C, Morrison LS, Chintalacharuvu RK. 1999. Structural requirements for polymeric immunoglobulin assembly and association with J chain. *J Biol Chem*. 274: 33771-33777.

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

Young LE, Hee CC, Ok CS. 1999. Immunoglobulin A Nephropathy in Patients With Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *J Korean Med Sci.* 14:582-585.

Young LE, Hee CC, Ok CS. 1999. Immunoglobulin A Nephropathy in Patients With Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *J Korean Med Sci.* 14:582-585.