



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA
División de Estudios de Posgrado

GLICOSILACION IN VITRO DE LA INMUNOGLOBULINA
G HUMANA DE SUJETOS NORMALES Y DE DIABETICOS.

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(Análisis Clínicos)

P r e s e n t a

Q.F.B. ROSENDA I. PEÑALOZA ESPINOSA

México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradezco profundamente al Dr. Fabio Salamanca Gómez, Jefe de la Unidad de Investigación Clínica en Genética Humana, Subjefatura de Investigación Científica, Centro Médico Nacional, IMSS, por su apoyo y estímulo que me ha brindado en el camino de la superación profesional.

Son también mis reconocimientos a la Dra. Ruth Román Palacios, Coordinadora de la Maestría de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, por su guía y amistad brindadas en este período de trabajo.

Mi gratitud a los colegas, compañeros y amigos, cuyo estímulo y sugerencias me ayudaron a realizar la presente tesis.

Jurado asignado:

Presidente: DR. OSCAR AMOR DODERO
1er. vocal: DRA. RUTH ROMAN PALACIOS
Secretario: M.C. ESTHER GUTIERREZ H.
Suplente: M.C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ
Suplente: DR. FABIO SALAMANCA GOMEZ

Lugar donde se desarrolló el trabajo:

Unidad de Investigación en Genética Humana, Subdirección
General Médica, Hospital de Pediatría, Centro Médico Na
cional, I.M.S.S.


Asesor de tesis: DRA. RUTH ROMAN PALACIOS

Departamento de Bioquímica
División de Estudios de Posgrado,
Facultad de Química, U.N.A.M.


Sustentante: Q.F.B. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA

CONTENIDO

- 1 INTRODUCCION
- 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- 1.2 OBJETIVOS
- 1.3 HIPOTESIS
- 2 ANTECEDENTES CIENTIFICOS
- 3 MATERIAL Y METODOS
- 4 RESULTADOS
- 5 DISCUSION
- 6 CONCLUSIONES
- 7 RESUMEN
- 8 BIBLIOGRAFIA

1.

INTRODUCCION

Hasta hace relativamente poco tiempo, se ha reconocido la importancia que tienen los azúcares unidos a las proteínas como compuestos altamente específicos que actúan como portadores de información biológica, esto es, que la especificidad de muchas glicoproteínas naturales está codificada en términos de azúcares y no sólo de amino ácidos o nucleótidos. Los azúcares pueden variar en su tipo de unión: alfa 6 beta, 1→2, 1→3, etc , y en la presencia o ausencia de ramificaciones.(1).

Actualmente, se ha comprobado que la alteración de la estructura y composición del grupo carbohidrato altera la arquitectura tridimensional de las moléculas y se ha postulado que estas alteraciones están íntimamente ligadas con los procesos de transformación maligna, como lo comprueban los resultados de aglutinación de células neoplásicas frente a lectinas tales como la concanavalina A lo que no sucede con células normales.(2).

En los últimos diez años han venido apareciendo en la literatura informes de unión no-enzimática de monosacáridos a varios tipos de moléculas y tejidos (3-11), principalmente en pacientes con diabetes mellitus. Se ha propuesto que dicho fenómeno está estrechamente relacionado a la fisiopatología del metabolismo de los carbohidratos.

Interesados en este tema, hemos querido investigar acerca de la cinética de la glicosilación no-enzimática de la inmunoglobulina G in vitro debido a su importancia en el sistema inmune y a la posibilidad de utilizarla en el control terapéutico de los pacientes con diabetes mellitus. Para ello se presenta una revisión de las glicoproteínas, tipos de azúcar que en ella intervienen, glicosilación enzimática y no-enzimática y los resultados obtenidos en el laboratorio de la unión de monosacáridos a IgG in vitro, en forma no-enzimática. Otro de los objetivos de este trabajo es el de mejorar la técnica colorimétrica hasta ahora utilizada para la cuantificación de azúcar unido a proteína no-enzimáticamente.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha propuesto que en pacientes con diabetes mellitus, las complicaciones que de ella se derivan (arterioesclerosis, microangiopatía vascular, neuropatía)(6, 7,12), pueden ser debidas a la incorporación de glucosa en forma no-enzimática a proteínas. En vista de que no se ha analizado la cinética de unión de la glucosa a la inmunoglobulina G de pacientes diabéticos, es de interés averiguar la capacidad de esta proteína de unir glucosa u otros azúcares no-enzimáticamente, con el objeto de lograr una metodología que pueda ser útil desde el punto de vista del control de los pacientes diabéticos a mediano plazo. Al profundizar en el conocimiento de esta cinética, se abre la posibilidad de investigar la función de la IgG en su actividad de anticuerpo en pacientes diabéticos.

1.2 OBJETIVOS

1. Separar la inmunoglobulina G del suero de individuos normales y de pacientes con diabetes mellitus tipos I y II.
2. Cuantificar el carbohidrato unido a la IgG in vivo.
3. Mejorar los métodos colorimétricos sugeridos para la medición de la glicosilación no-enzimática.
4. Glicosilar in vitro las inmunoglobulinas anteriormente obtenidas con glucosa, galactosa y manosa, variando la concentración de los azúcares, la temperatura de reacción y el tiempo de incubación.
5. Obtener por diferencia la cantidad de monosacáridos unidos no enzimáticamente en las diferentes IgGs.

1.3

HIPOTESIS

1. El empleo de ácidos fuertes (ácido clorhídrico) y una presión de 20 libras mejora significativamente la cuantificación de azúcares unidos no-enzimáticamente a proteínas debido a la mejor obtención del 5-hidroximetil 2-furfuraldehído.

2. La glicosilación no-enzimática in vitro de la inmunoglobulina G se incrementa al aumentar la concentración del azúcar, el tiempo de exposición y la temperatura de reacción.

GLICOPROTEINAS

Las glicoproteínas son moléculas que tienen carbohidratos unidos covalentemente a la cadena peptídica (13). El grupo carbohidrato varía de tamaño desde mono o disacáridos (p.e. mucinas y colágena)(14, 15), a polisacáridos (p.e. inmunoglobulinas, proteínas plasmáticas)(16), y están localizados en varias posiciones de la cadena polipeptídica de acuerdo a la ubicación de los amino ácidos aspargina, treonina, serina, lisina o valina. No se conocen glicoproteínas que estén construídas en bloques copoliméricos teniendo segmentos alternados de péptidos y sacáridos.

Las glicoproteínas están ampliamente distribuídas en la naturaleza: Vertebrados, invertebrados, plantas, organismos unicelulares y algunos virus (Tabla 1). En general, hay más tipos de proteínas que tienen carbohidratos que las que no los tienen. Por ejemplo, en el caso del plasma humano, de más de sesenta proteínas aisladas se han encontrado muy pocas sin carbohidrato (proteína C reactiva, lisosoma muraminidasa), lo que constituye más del cincuenta por ciento de proteínas glicosiladas del total del contenido proteico plasmático, en contraste con las proteínas del jugo pancreático bovino del cual sólo el cinco por ciento tienen residuos de azúcar. Estas proteínas incluyen a las ribonucleasas B, C y D, desoxirribonucleasas y amilasas (17-20), Figura 1.

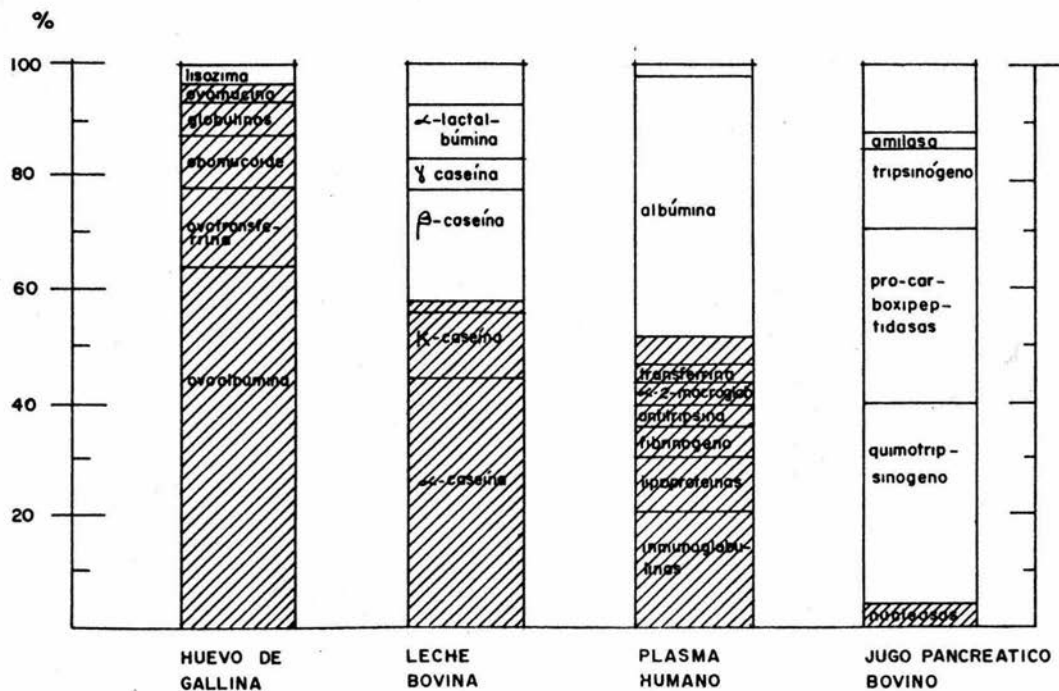
Las funciones de las glicoproteínas son diversas: Transporte, coagulación, enzimáticas, inmunológicas, algunas hormonales como las gonadotropinas hipofisarias y placentarias y la tiroglobulina; de lubricación como las mucinas y mucoproteínas; estructurales como en las membranas basales y en la pared celular de los organismos multicelulares en los que, además de servir como soporte, juegan un papel esencial en el transporte activo de moléculas, son receptoras de virus, hormonas y anticuerpos y forman parte del reconocimiento y adhesión intercelular (Tabla 1)(21).

Tabla 1.
DISTRIBUCION Y FUNCION DE ALGUNAS GLICOPROTEINAS

ORIGEN	FUNCION	EJEMPLOS
VERTEBRADOS		
Plasma	Transporte	Transferrina Ceruloplasmina Beta lipoprotefna
	Coagulación	Fibrinogeno Protrombina
	Inmunoprotección	Inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM
	Enzimas	Colinesterasa Atropinesterasa Amino-oxidasa
Secreción láctea	Transporte	Lactoferritina Lactosintetasa
Saliva	Enzima	K-casefna Alfa-amilasa
	Hipófisis	Hormona
Hígado	Enzima	Beta N-Acetilglucosaminidasa Beta Glucuronidasa
Páncreas	Enzima	Ribonucleasa Desoxirribonucleasa Lipasa
Glándula submaxilar	Lubricación y protección	Glicoprotefnas submaxilares
Estómago	Enzima	Pepsinógeno, pepsina
Pulmón	Anticoagulante	Heparina
Piel	Estructura	Colágena
Clara de huevo	Nutrición y Protección	Ovoalbúmina, ovomucoide Avidina
Yema de huevo	Nutrición	Fosfovitina
Veneno de serpientes	Enzimas	Proteinasas
INVERTEBRADOS		
	Protección	Colágena de cutícula de anélidos
	Estructura Procesos de ferti lización	Colágena Glicoprotefnas de la cubierta de erizo de mar
PLANTAS	Estructura	Glicoprotefnas de la pared celular
	Enzimas	Taka-amilasa, Glucosa-oxidasa Clorperoxidasa, Lipasa, Alfa-galactosa invertasa.
BACTERIAS	Enzimas	Difosfopiridínucleotidasa del Bacillus subtilis
	No conocida	Glicoprotefnas de la pared ce lular de E. coli
VIRUS	No conocida	Glicoprotefnas de membrana

Fig. 1

DISTRIBUCION CUANTITATIVA DE PROTEINAS EN FLUIDOS ANIMALES



Las áreas sombreadas representan las glicoproteínas. Tomado de Sharon, N. (1).

FALTA

PAGINA

7

Tabla 2.

MONOSACARIDOS CONSTITUYENTES DE GLICOPROTEINAS

Hexosas: D-Galactosa, D-Manosa, D-Glucosa.

Deoxihexosas: L-Fucosa

Hexosaminas: N-acetil D-Glucosamina, N-acetil D-Galactosamina

Acidos siálicos: ácidos Acil-Neuramfínicos.

Pentosas: D-Xilosa, D-Arabinosa

Figura 3.

CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS EN ANIMALES Y PLANTAS(20).

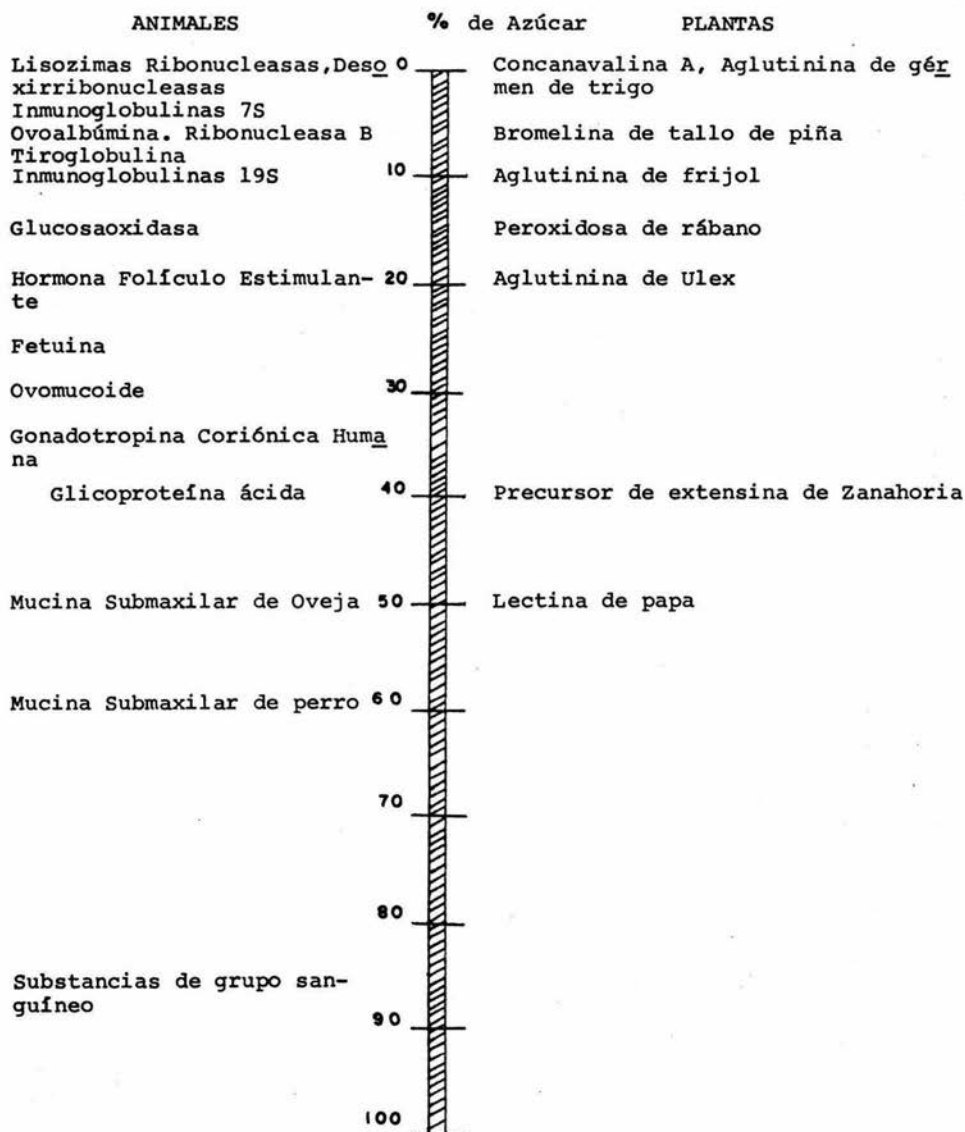


Fig. 2

Representación esquemática de una glicoproteína.

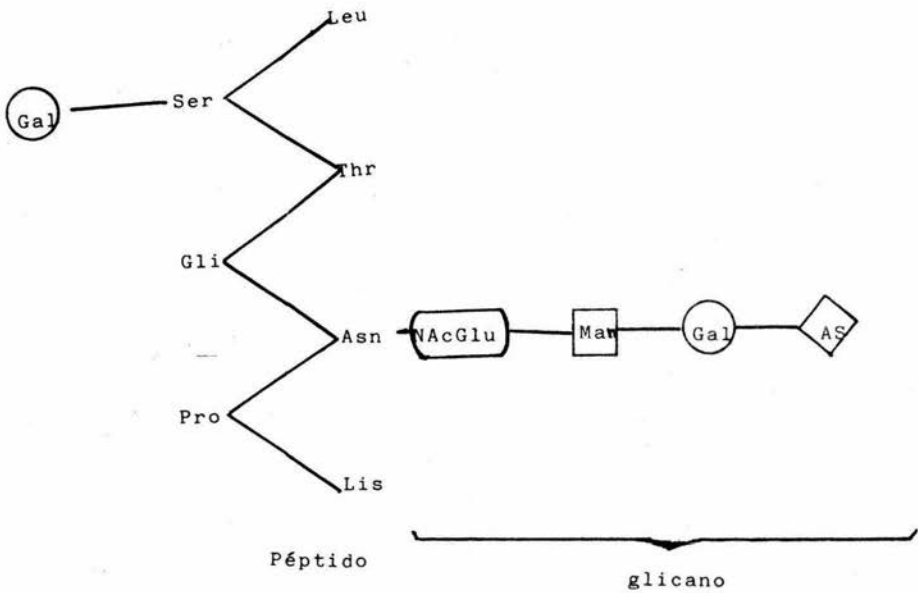
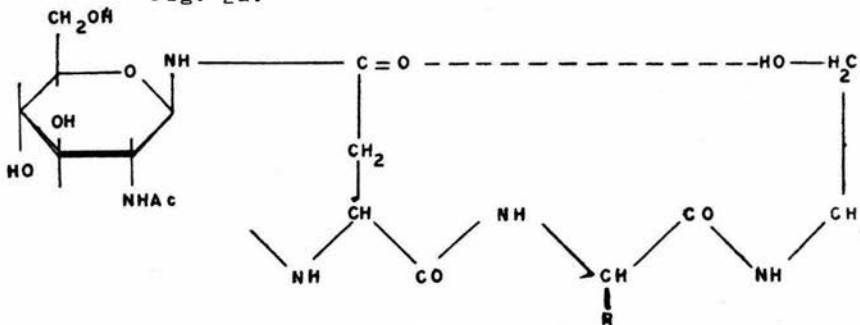
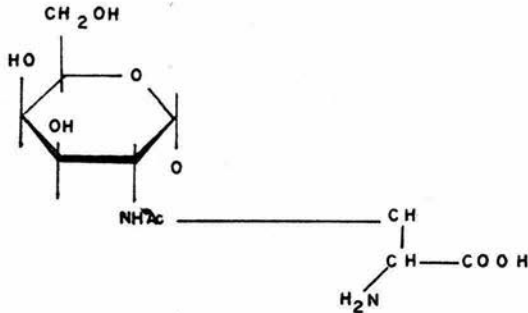


Fig. 2a.

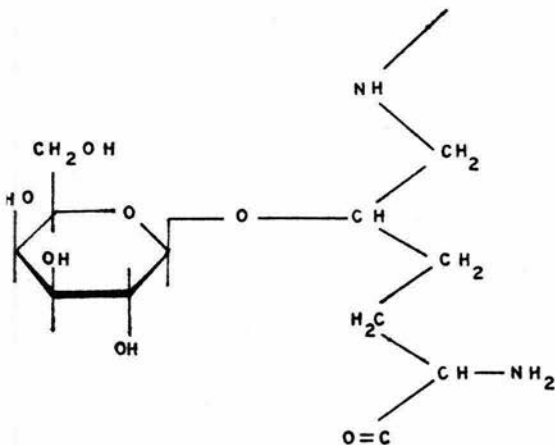


Modelo esquemático de la secuencia Asn-X-Ser encontrada en glicoproteínas conteniendo la unión NAcGlu-Asn.

Fig. 2a₁.

Unión O-glicosídica entre la N-Acetil galactosa y la serina (R=H) ó Treonina (R=CH₃) con configuración alfa.

Fig. 2b.



Unión O-glicosídica entre galactosa y 5-Hidroxilisina

licosilación de proteínas.

a biosíntesis de macromoléculas conjugadas tales como las glicoproteínas tienen algunos problemas que no se presentan en estudios de proteínas simples o polisacáridos. Uno de los problemas principales es el orden en el cual se sintetizan el grupo carbohidrato y la proteína. Otro problema es el mecanismo molecular y la localización celular en la cual se llevan a cabo estas síntesis. Algunos investigadores han informado del sitio intracelular de la biosíntesis de glicoproteínas y de la secuencia de eventos en el proceso enzimático de la unión de estas moléculas, pero poco se conoce de la estructura terciaria, plegamientos y conformación de algunas de ellas en diferentes medios (26).

Estudios en células intactas.

Primero consideraremos el lugar donde ocurre la biosíntesis de glicoproteínas en la célula. Muchos de estos conocimientos están basados en estudios en animales intactos o en órganos o en cortes de tejidos con técnicas de perfusión. Estas técnicas incluyen la exposición del tejido a monosacáridos en ausencia o presencia de inhibidores de la síntesis proteica tales como la puromicina, seguida del exámen de la incorporación del carbohidrato marcado radioactivamente unido a la proteína (27, 28). Para obtener información de la relación entre la síntesis de la cadena del carbohidrato y del polipéptido se realizan experimentos paralelos con amino ácidos marcados radioactivamente. El más comunmente usado es la leucina. La incorporación de la marca se sigue por dos métodos: a) La autorradiografía en microscopio electrónico y b) Por medición de proteínas marcadas radioactivamente en fracciones subcelulares separadas por centrifugación del homogenado de tejidos (27, 28).

Los resultados de estos experimentos indican que: a) El péptido fundamental de las glicoproteínas se une a los ribosomas que se encuentran en la membrana, y b) Que la mayor parte del carbohidrato ^{es} incorporado a la glicoproteína después de la liberación de los péptidos fundamentales de los ribosomas. De ésta manera se observó una clara separación en tiempo y en espacio entre la biosíntesis del péptido fundamental de las glicoproteínas y la bio

síntesis del carbohidrato.

El aparato de Golgi tiene un papel central en la biosíntesis de la cadena de azúcares de las glicoproteínas. Esta estructura consiste de un complejo de sacos membranosos interconectados que se encuentra presente en todas las células animales y sirve como sitio primario para la síntesis de grandes carbohidratos y para el almacenamiento de macromoléculas producidas intracelularmente. Dentro de sus funciones incluye la biosíntesis de glicoproteínas solubles, la formación de membranas para vesículas de almacenamiento y secretorias (29, 30).

La glicosilación de proteínas sigue tres vías generales (Tabla 3): a) La incorporación de manosa radioactiva a la proteína aparece en forma semejante a la incorporación de amino ácidos radioactivos: Hay una rápida incorporación a la superficie del retículo endoplásmico rugoso (RER), seguido por la transferencia a la superficie del retículo endoplásmico liso (REL) y al aparato de Golgi, apareciendo finalmente en el sitio de acumulación (Tabla 3, Forma A). La incorporación de amino ácidos y manosa es sensible a la inhibición por puromicina, por lo que se infiere que la manosa debe ser uno de los primeros monosacáridos que se une a la proteína. Estos hallazgos se reflejan en el hecho de que la incorporación de la manosa se encuentra cerca del núcleo del oligosacárido: N-acetilglucosamina-asparagina que es la región de unión, por lo que la incorporación de este monosacárido se lleva a cabo en etapa temprana del proceso biosintético poco después de que el péptido se ha unido a los ribosomas. La puromicina inhibe la formación de péptidos y subsecuentemente se carece de sustrato que actúe como aceptor de manosa. b) El ácido siálico, la L-fucosa y la D-galactosa radioactivos son incorporados primariamente a la superficie del REL y al aparato de Golgi y entonces son transferidos al sitio donde se encuentran las proteínas terminadas (Tabla 3, Forma B). Es de esperarse que los azúcares que son incorporados únicamente al final de la síntesis de las glicoproteínas sean incorporadas a las glicoproteínas al final del proceso biosintético. La incorporación de L-fucosa y D-galactosa no se inhibe apreciablemente por la puromicina, ya que hay una reserva adecuada de glicoproteínas no

Tabla 3

Incorporación del radioisótopo al interior de las glicoproteínas en los organelos (26).

Forma Tipo	Precursor radioactivo.	Tiempo en la incorporación a la glicoproteína.	Interpretación
A	Leucina Manosa		RER → Golgi → GS, EE ó MP ↑ marca
B	Acido siálico L-Fucosa Galactosa		RER → Golgi → GS, EE ó MP ↑ marca
C	Glucosamina.		RER → Golgi → GS, EE ó MP ↑ ↑ marca marca
Horas después del pulso		0 1 2 3	

Clave: RER = superficie del retículo endoplásmico rugoso
 GS = gránulos secretorios
 EE = espacio extracelular
 MP = membrana plasmática

El tiempo es idealizado para fines cualitativos, ya que hay variaciones cuantitativas apreciables del tejido entre una especie y otra.

totalmente glicosiladas en el retículo endoplásmico que actúan como aceptores para estos azúcares, o bien reflejan que su incorporación es independiente de la síntesis temprana de la proteína. Esta reserva se mantiene por largos periodos de tiempo después de que la síntesis proteica ha sido inhibida por la puromicina. Los datos anteriores comprueban que la 1-fucosa dada su estabilidad, esto es, que no se degrada fácilmente, se incorpora al final de la síntesis. Por consiguiente, si se quiere estudiar cuándo una glicoproteína ha sido sintetizada completamente, se utiliza a la fucosa como marcador radioactivo. c) La glucosamina radioactiva se incorpora simultáneamente tanto en el RER como en el REL y es transferido al sitio de proteínas terminadas (Tabla 3, Forma C), lo que está de acuerdo con el hecho de que la N-acetilglucosamina aparece localizada en tres sitios del residuo del oligosacárido, como son la región de unión N-acetilglucosamina-aspargina, el centro y el trisacárido terminal no-reductor. De esta manera la glucosamina está en todo el proceso biosintético (26).

Existe una controversia sobre si la unión N-glicosídica entre la N-acetilglucosamina y la aspargina en las glicoproteínas se forma antes de completar el péptido y liberarse del ribosoma o subsecuentemente a su terminación y liberación. Hay evidencias en células hepáticas y plasmacitomas de que cantidades pequeñas de N-acetilglucosamina se incorporan al péptido naciente en el ribosoma. Una posibilidad es que la N-acetilglucosamina-aspargina sea incorporada como tal, pero falta comprobar las "enzimas activadoras" de este complejo. (31).

Los datos cinéticos de la Tabla 3 resumen los pasos de la incorporación de monosacáridos en el residuo del oligosacárido, al mismo tiempo que los péptidos nacientes se mueven de la superficie del RER al REL, al aparato de Golgi y finalmente al sitio de acumulación de las proteínas. La naturaleza de los sitios de acumulación dependen del tejido que se estudia, por ejemplo, en tejido tiroideo el sitio de acumulación representa el almacenamiento de tiroglobulina en el coloide. En células secretoras que no almacenan las sustancias sintetizadas, el producto es secretado, p.e. en los linfocitos B, las inmunoglobulinas y en el hígado las glicoproteínas plasmáticas. En células no secretorias tales como las células HeLa y células de mucosa duodenal, la glicoproteína

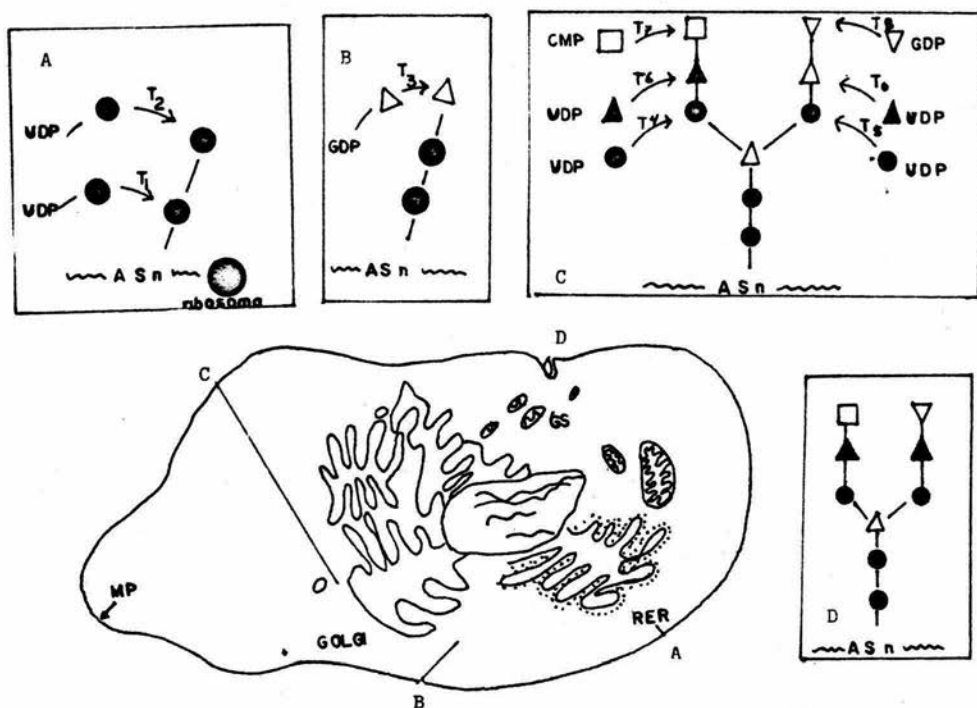
recién sintetizada se utiliza en el recambio de membranas (26). Es importante mencionar que las glicoproteínas de hígado marcadas, son liberadas a la superficie tanto del RER como del REL por desintegración ultrasónica, lo que implica que éstos materiales están en espacios cisternales del retículo endoplásmico. Sin embargo, algunas glicoproteínas recién sintetizadas son unidas firmemente a la membrana microsomal y es posible que esta diferencia en la unión a la membrana pueda reflejar el destino último de la glicoproteína, ya sea en la secreción extracelular o como parte del sistema intracelular de la membrana. La Figura 4 muestra una representación esquemática de la biosíntesis de glicoproteínas (modificación de Schachter)(28).

Algunos investigadores han señalado que la estructura de los oligosacáridos unidos a aspargina de glicoproteínas de eucariotes es heterogénea y generalmente se clasifican en dos categorías: "Alto contenido de manosa" y "Complejas". Esta diferencia reside en - que las primeras tienen varios residuos de manosa alfa unidos (dos a siete manosas en células de vertebrados, Figura 5-II), mientras que las segundas llevan otros azúcares externos tales como la N-acetilglucosamina (NAcGlu), manosa (Man), galactosa (Gal), fucosa (Fuc) y ácido siálico (AS) (Figura 5-I). Las cadenas de ambas clases exhiben microheterogeneidad, esto es, que un sólo tipo de glicoproteína purificada tiene unidades de carbohidrato de estructura relacionada pero no necesariamente idéntica (32- 34).

Numerosos experimentos en glicoproteínas de membrana, secretorias y virales, han revelado que tanto los glicanos de alto contenido de manosa como los complejos, tienen un origen biosintético común: Un oligosacárido precursor con alto contenido de manosa que se sintetiza sobre un lípido acarreador (dolicol) del cual se transfiere a la proteína aceptora. En una amplia variedad de sistemas, el oligosacárido precursor unido al lípido tiene la composición: $\text{Glu}_3\text{Man}_9\text{NAcGlu}_2$ (Figura 5-III). Este oligosacárido tiene un centro común a todos los oligosacáridos unidos a aspargina (Asn): $\text{Asn-NAcGlu}_2 - \text{Man}(\text{Man } 1 \rightarrow 6)\text{Man}(1 \rightarrow 3)$ (Figura 5-II)(35, 36).

Figura 4.

GLICOSILACION DE PROTEINAS. (28)



REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA GLICOSILACION DE PROTEINAS.

- A) Unión del polipéptido a ribosomas e incorporación de NAcGlu a asparagina por glicosiltransferasas (T1, T2), en el retículo en doplasmico rugoso (RER).
- B) Liberación del glicopéptido del ribosoma y paso al re tículo endoplásmico liso (REL) y unión de otros azúca res por transferasas (T3).
- C) Incorporación de azúcares terminales cerca del aparato de Golgi (AG) por las transferasas correspondientes (T4 - T8).
- D) Incorporación de las glicoproteínas completas a gránu los secretorios (GS) por el aparato de Golgi, que mi gran hacia la membrana plasmática (MP) para liberar a la glicoproteína al espacio extracelular.

- UDP -● = uridín difosfato NAcGlu
 UDP -▲ = uridín difosfato Gal
 GDP -△ = guanosín difosfato Man
 CMP -□ = citidín monofosfato AS
 GDP -▽ = guanosín difosfato Fuc

El lípido acarreador (dolicol) es un polisoprenoide saturado cuyo isómero más abundante contiene entre 18 y 20 unidades de isopreno en vertebrados y 15 a 16 en levaduras. El dolicol parece ser sintetizado en mitocondrias y se encuentra distribuido en el retículo endoplásmico donde están las enzimas que sintetizan el oligosacárido. Su forma activa es el pirofosfato de dolicol (36, 37).

El oligosacárido precursor se inicia cuando se unen dos moléculas consecutivas de NAcGlu a través de su forma activa, la uridíndifosfato (UDP)-NAcGlu, por una transaminasa. En seguida se unen una a una las nueve moléculas de manosa a partir de su forma activa la guanosíndifosfato (GDP)-Man y la enzima correspondiente y por último se unen tres moléculas de glucosa a partir de UDP-Glu en presencia de cationes divalentes y la transferasa adecuada para dar la molécula final: $\text{Glu}_3\text{Man}_9\text{NAcGlu}_2\text{-P-P-Dolicol}$ (34, 37).

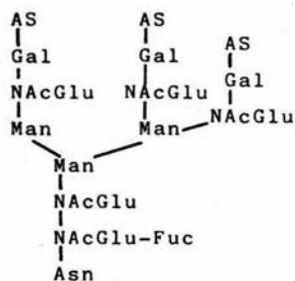
Al mismo tiempo que se forma el oligosacárido precursor, se forman las cadenas de 10-30 amino ácidos en los polisomas que se encuentran unidos a la membrana, de donde se desprende por una peptidasa para pasar al lumen del retículo endoplásmico rugoso donde son glicosiladas por la enzima dolícildifosforiloligosacárido: peptidoligosacaril transferasa. Las estructuras se continúan desarrollando rápidamente y algunas glicoproteínas adquieren finalmente una estructura terciaria que implica puentes disulfuro (37-39).

Para que el oligosacárido se una a la proteína son necesarios dos requisitos indispensables: 1. Que haya un residuo aspártico en un triplete de amino ácidos cuya secuencia sea Asn-X-Ser ó Thr, donde X puede ser cualquier amino ácido excepto ácido aspártico y 2. Que el triplete esté expuesto, esto es, que esté accesible a la enzima (40).

Se ha demostrado que la ovoalbúmina⁽³⁹⁾, las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas G de ratón (38) y las glicoproteínas del virus de estomatitis vesicular (35) se glicosilan antes de ser liberadas de los ribosomas. De acuerdo con esta información se infirió que otras glicoproteínas podrían glicosilarse de la misma manera (42-44), sin embargo hay evidencias de que los oligosacáridos se pueden unir también a la cadena polipeptídica ya termina

Figura 5

Estructura de oligosacáridos unidos a aspargina de glicoproteínas (I, II) y de un oligosacárido precursor unido a dolicol (III) (34).



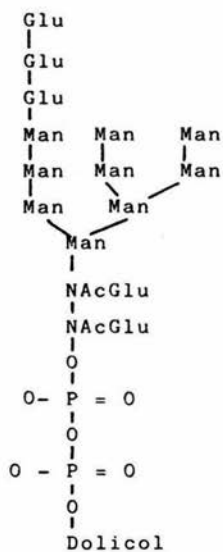
I

Estructura
"compleja"



II

Estructura
"alta manosa"



III

Oligosacárido precursor.

da (45, 46).

Inmediatamente después de transferir el oligosacárido precursor a la proteína aceptora, la población originalmente homogénea, tendrá diferentes glicanos N-unidos (Figura 6) ya que los residuos 1, 2 y 3 de la glucosa son eliminados por las glicosidasas I, II y II respectivamente, que en hepatocitos de rata se han localizado en el retículo endoplásmico rugoso y liso (47). Algunas proteínas como la tiroglobulina de ternera tienen la estructura completa del oligosacárido (48)(Figura 5-III), pero comúnmente se eliminan cuatro residuos de manosa para obtener pequeños oligosacáridos con alto contenido de manosa (Figura 5-II), o se les unen otros residuos de azúcares para obtener una estructura compleja (49)(Figura 5-I).

El primer paso para la conversión de oligosacárido de "alta manosa" a "complejo", se cataliza por una N-acetilglucosaminiltransferasa I que se une a la NAcGlu a $\text{Man}_5\text{NAcGlu}_2$ (Figura 7d), después de lo cual la "manosidasa tardía" libera dos manosas terminales (Figura 7e). El producto de la reacción d y e de la Figura 7 se procesan rápidamente, aunque se han encontrado como tales en la rodopsina (50-55).

El producto de la manosidasa tardía y de la N-acetilglucosaminiltransferasa: $\text{NAcGlu}_2\text{Man}_3$, es un sustrato para tres enzimas: 1. La N-acetilglucosaminiltransferasa II que la convierte a $\text{NAcGlu}_2\text{Man}_3\text{NAcGlu}_2$ (Figura 7-I); 2. la fucosiltransferasa que adiciona una alfa-1-6-Fuc al residuo NAcGlu (reducido terminal) y 3. una galactosaminiltransferasa que forma uniones Gal-alfa-1-4 a los residuos NAcGlu no reducidos.

El esquema de la figura 7 es una simplificación del proceso. No toma en cuenta la existencia de uniones alternativas, procesos incompletos o conversión a otro tipo de oligosacáridos complejos de los cuales muchos de ellos tienen más de dos ramificaciones.

El estudio de las glicosiltransferasas purificadas con respecto al orden de los sustratos potenciales, ha sugerido que el orden en que actúa una enzima individual puede determinar la estructura final del oligosacárido, ya que una clona de células tiene oligosacáridos de diferente composición.

Se ha observado que otros factores tales como la estructura de

Figura 6

Secuencia propuesta para la unión de los oligosacáridos unidos a un lípido en células de ovario de Hamster chino (34).

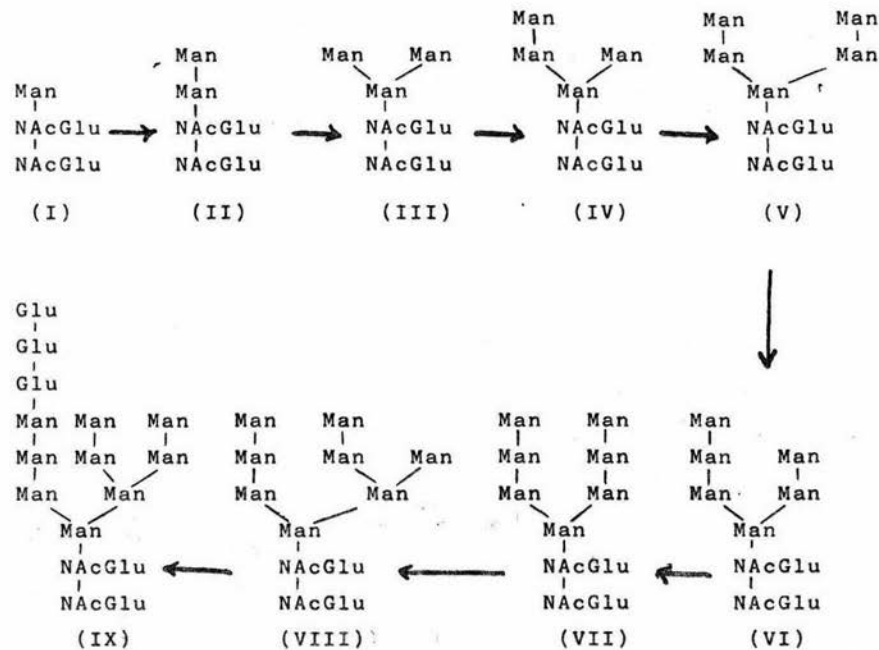
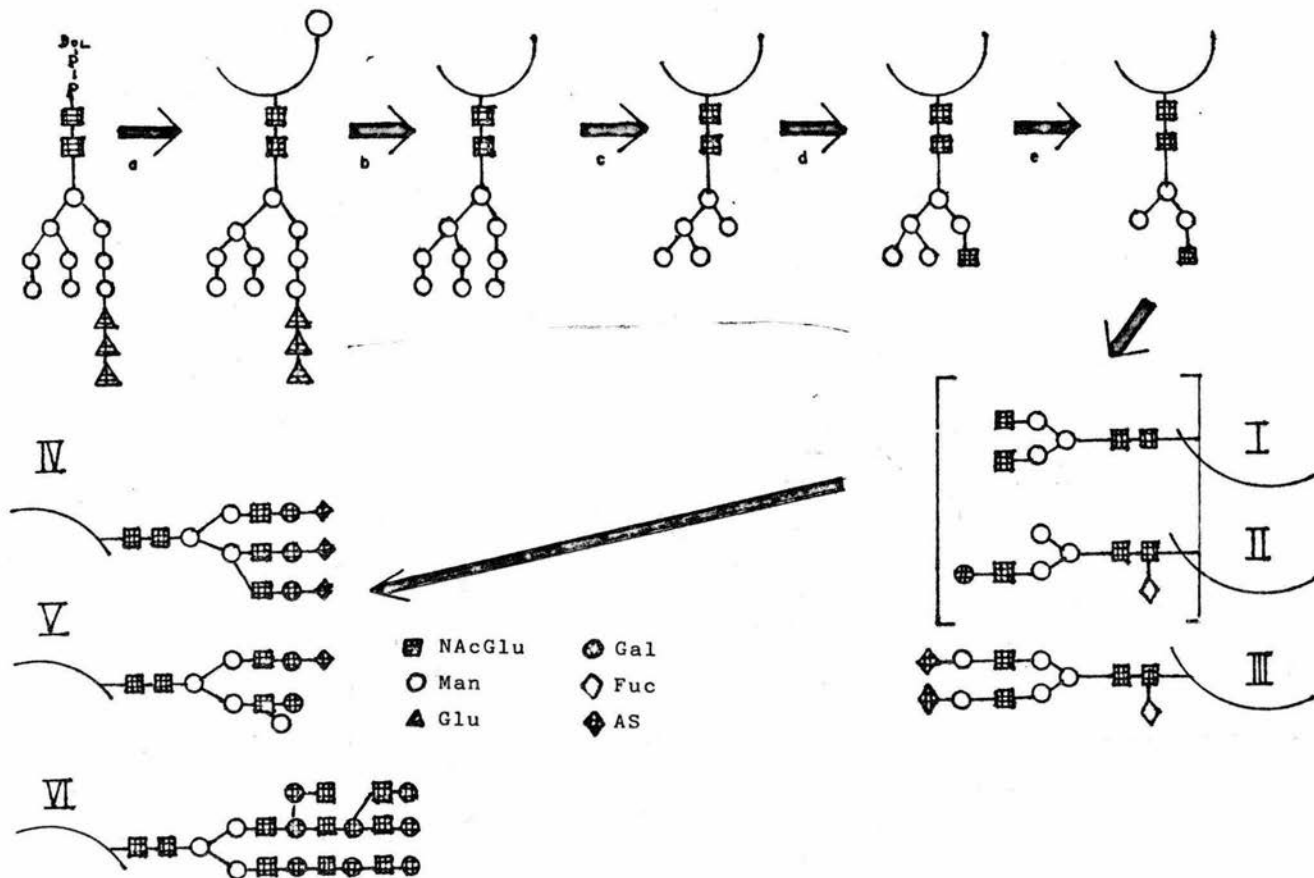


Figura 7

REPRESENTACION ESQUEMATICA DEL PROCESAMIENTO DEL OLIGOSACARIDO UNIDO A ASPARGINA (34)



la protefna que está siendo procesada, influye en el ensamblado de los oligosacáridos y éstos sacáridos pueden ser unidos directamente.

La figura 8 muestra los pasos del proceso de síntesis del oligo sacárido N-unido. Los tiempos anotados son aproximaciones de las reacciones in vivo en donde no se toman en cuenta muchos factores como son:

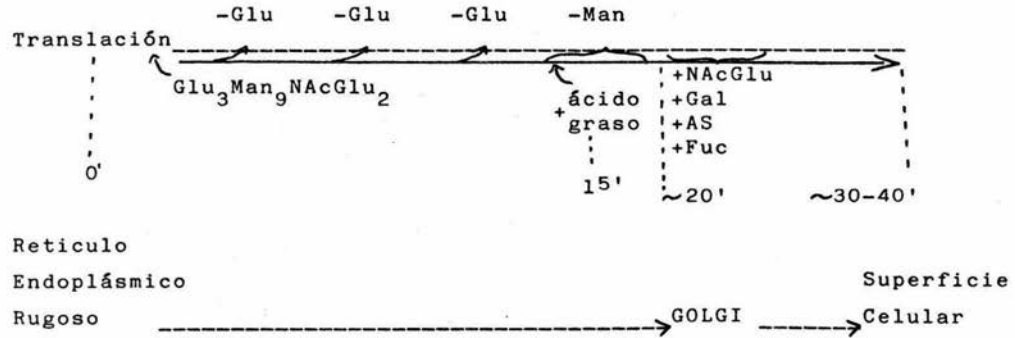
1. Fase de crecimiento. Se ha observado que la velocidad de crecimiento celular influye en el proceso de síntesis estructural del oligosacárido (56-58).
2. Estructura proteica. La síntesis anormal de glicoprotefnas altera el oligosacárido unido a ella (59-63).
3. Interacción protefna-protefna. Se han observado "ayudadoras" de la glicosilación y del transporte celular de las mismas (64).
4. Localización intracelular final. La presencia de lectinas retiene estructuras de alto contenido de manosa (65, 66).
5. Glicoprotefnas de membrana vs. glicoprotefnas secretadas. En células que sintetizan ambos tipos de glicoprotefna, se ha observado que la velocidad de unión del oligosacárido a protefna de membrana y su transporte intracelular es dos veces más rápido con respecto a la secretada, lo que ha sugerido que éstos procesos son diferentes para cada tipo de glicoprotefna (67).

Glicosilación de las inmunoglobulinas.

Los estudios de la biosíntesis de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas secretadas por líneas celulares de mieloma de ratón (p.e. MOPC-46), proveen información del mecanismo de ensamblado intracelular de las unidades de carbohidrato de las glicoprotefnas (68). Las unidades de carbohidrato de las cadenas ligeras completas, secretadas de células de mieloma de ratón MOPC-46, contienen N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa y ácido siálico, en una relación molar: 3:4:4:2:2. Las unidades parecen ser siempre similares a la estructura glicosídica unida a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, sin embargo, es probable que estén altamente ramificadas. Después del fraccionamiento de las células tumorales, las cadenas ligeras se liberan de la membrana del retículo endoplásmico por medio de un

Figura 8.

Migración intracelular y procesamiento de la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular. Esta glicoproteína contiene ácido graso unido covalentemente y se une a la molécula polipeptídica justo antes de que empiecen a unirse los oligosacáridos.



tratamiento con detergentes. Este material purificado por cromatografía de intercambio iónico, se encontró que contenía 2-3 molas de NAcGlu, 3-4 molas de Man y únicamente trazas de otros azúcares. La glicoproteína obtenida de los productos de las membranas lisas contenía cerca del 50 por ciento de Gal, indicando que éste azúcar se unió subsecuentemente al oligosacárido central que contiene únicamente NAcGlu y Man. Sin embargo, hay evidencias de que la transferencia de NAcGlu ocurre tanto en membranas rugosas como en lisas. Estudios de éstas líneas celulares con autorradiografía utilizando leucina, manosa o galactosa marcadas, muestran claramente que la migración del retículo endoplásmico rugoso al aparato de Golgi ocurre después de la incorporación de manosa al interior del péptido, pero antes de la incorporación de galactosa y después de completar la molécula y de haber sido empacada en el aparato de Golgi (29).

La inmunoglobulina G (IgG) humana, contiene normalmente un grupo carbohidrato en la región constante, unido a aspargina en cada una de las cadenas pesadas. El carbohidrato total está constituido por dos molas de Gal, 3 molas de Man, 0-1 molas de Fuc, 4-5 molas de NAcGlu y 0-2 molas de AS (69)(Tabla 4, Figura 9).

En IgG de mieloma humano también se encuentran residuos de carbohidrato en la región variable de las cadenas ligeras (70), unido a Asn. Se ha observado que la secuencia Asn-X-Ser/Thr es importante para unión del grupo carbohidrato.

En IgG de conejos, la porción carbohidrato se encuentra en un 15 por ciento unido a Asn en las regiones constantes de las cadenas pesadas, conteniendo NAcGlu, Man y Gal y careciendo de AS y Fuc. El 40 por ciento del contenido se encuentra unido a treonina (Thr) de las regiones Fd de las cadenas pesadas en secuencias ricas en prolina (71).

La inmunoglobulina G1 aislada de calostro bovino mostró la presencia de dos grupos glicanos unidos a la cadena peptídica por una unión N - Asn-NAcGlu, en la cual la aspargina se encontró en la secuencia Asn-glicano-Ser-Thr-Thr. El glicano posee un pentasacárido central común a numerosas glicoproteínas: Man(1-3)(Man 1-6)Man(1→4)NAcGlu(1→4)Asn (Esquema 1). Este tipo de unidades también presenta la microheterogeneidad observada en otras glicoproteínas, y en este caso parece ser debido principalmente a la can

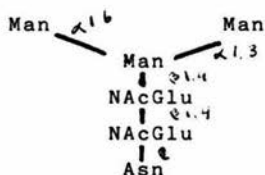
Tabla 4

Análisis del grupo carbohidrato en las diferentes clases de inmunoglobulinas en el suero humano normal (54).

Clase de inmunoglobulina.	Peso Molecular	Total de carbohidrato. %	Gal	Man	Fuc	NACGlu	NACGal	AS
IgG	150 000	2.5	3	5	2	2	-	1
IgA	170 000	5.7	12	14	2	12	6	5
IgM	(180 000) ₅	9.2	11	35	6	27	-	9

tividad de ácido N-acetilneuramínico adicional y de la fucosa (72).

Esquema 1.



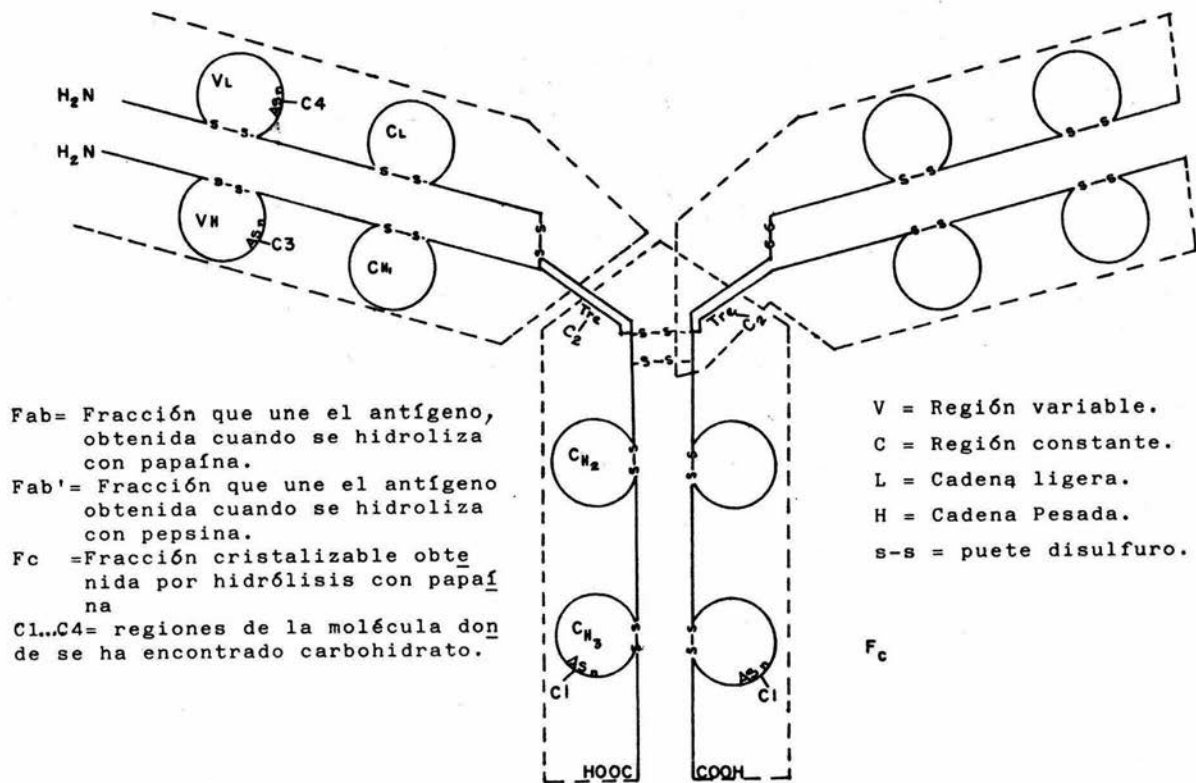
En la inmunoglobulina A (IgA) tipo kappa (k) humana, se encontró el carbohidrato en la región constante de la cadena pesada, en forma de tres unidades complejas y una simple, de las cuales dos de las primeras estaban unidas a Asn y las dos restantes a Ser y Thr (73). Las unidades complejas unidas a Asn están constituidas por tres residuos AS-Gal-NAcGlu, unidas a la porción interna de tres residuos Man y una NAcGlu y una Fuc. En IgA1 de mieloma humano se encontraron dos unidades oligosacáridas unidas a Asn y cinco unidades unidas a Ser: cuatro de ellas Ser-NAcGal-1,3Gal y una NAcGal. Las cinco se encontraron en la región bisagra de la molécula (73).

La inmunoglobulina M (IgM) humana contiene unidades de carbohidrato unidas a Asn en la región constante de la cadena pesada en un total de 10 unidades por molécula, de las cuales 6 son de estructura compleja y 4 simples. Las unidades simples se encuentran en la fracción Fc de las cadenas pesadas, y las unidades complejas en la fracción Fd distribuidas en la región bisagra. Las unidades complejas tienen gran heterogeneidad aunque conservan el patrón estructural de la IgG, mientras que las unidades simples también están ramificadas y constituidas por un número variable de Man unida a dos residuos centrales de NAcGlu (69, 73).

La inmunoglobulina D y la E, también contienen carbohidrato con estructura semejante a la IgG. La IgD de mieloma tiene además un grupo Ser-NAcGal 1,3 - Gal, semejante a IgA (69, 73).

Fab

Fab'



Glicosilación no enzimática.

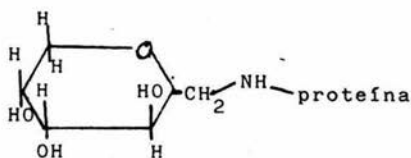
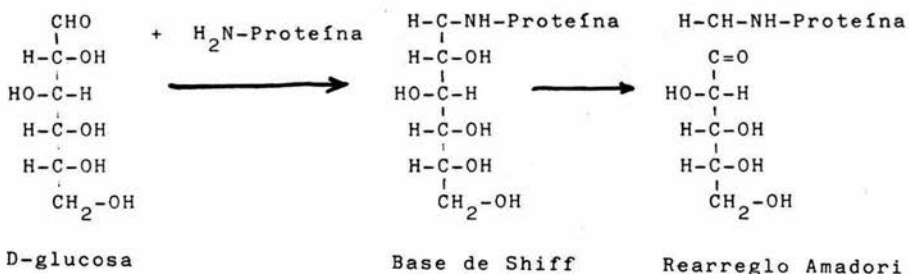
En la última década se ha descrito un tipo de glicosilación no-enzimática en diversas proteínas humanas (3-11).

Este tipo de glicosilación es particularmente importante en pacientes con diabetes mellitus debido a que la hiperglicemia crónica es el factor más importante de las complicaciones secundarias de la diabetes como son la microangiopatía y arterioesclerosis, siendo más aparente en órganos críticos como riñón, ojos y sistema nervioso (6, 7, 12). Algunos de éstos hallazgos han sido comprobados en sistemas animales (9-11).

Se ha postulado que la alteración química de las proteínas corporales dependientes de las concentraciones de glucosa, causa cambios estructurales en las proteínas modificando su función y propiciando la fisiopatología de la diabetes (3-12).

Las reacciones químicas que permiten la glicosilación no-enzimática de proteínas fué primeramente descrita en estudios de oscurecimiento de alimentos proteicos (74), y posteriormente en proteínas de diabéticos (75). La interacción de glucosa y proteínas ocurre entre los grupos amino reactivos y el grupo aldo de la glucosa (Esquema 2)

Esquema 2



Glicoproteína

El primer ejemplo de modificación de proteínas en el diabético fué el hallazgo de cantidades elevadas de hemoglobina Alc (3). Esta hemoglobina es uno de los componentes menores más abundante de las hemoglobinas del eritrocito humano, en el cual la glucosa se une al grupo N-amino terminal de la valina de las cadenas beta de la hemoglobina, por una unión cetoamina como se muestra en el Esquema 2. El producto inicial es la base de Schiff derivada de la proteína, que sufre un rearrreglo Amadori para formar un aducto cetoamina estable (4). Esta reacción ha sido comprobada in vitro (76). Se ha observado que esta glicosilación se lleva a cabo en forma lenta y continúa a través de los 120 días de vida del eritrocito, lo que provee de un índice promedio de los niveles de glucosa dos meses previos a su determinación (4).

Posteriormente se informó de otras proteínas que también se glicosilaban no-enzimáticamente: Day y cols. (8) fueron los primeros en comunicar que la albúmina humana de adultos normales está glicosilada en un seis por ciento aproximadamente, y comprobaron por estudios in vitro, que éste tipo de glicosilación es no-enzimática sugiriendo que es una modificación postraslacional de la molécula, semejante a lo que ocurre en la hemoglobina Alc. Más tarde, en un estudio hecho en suero de ratas encontraron que en la albúmina, el amino ácido aceptor del carbohidrato era la lisina (77). Por otro lado se encontró que la albúmina de ratas diabéticas por aloxán, era más sensible a la glicosilación que la hemoglobina Alc, cuando ambas eran sometidas a cambios de concentración de glucosa sérica. In vitro, la albúmina se glicosiló diez veces más rápidamente que la hemoglobina Alc (78).

Dolhofer y Wieland comprobaron los hallazgos de Day (8) en el sentido de que la albúmina humana está sujeta a glicosilación in vitro e in vivo. (79).

Miller y cols encontraron que las membranas de los eritrocitos, incubados no-enzimáticamente con ³H-borohidruro, incorporaban dos veces más radioactividad (glucosil-lisina) que la de los individuos normales. La incorporación de tritio a las membranas correlacionó con los niveles de hemoglobina Alc, indicando que la glicosilación depende de la concentración del monosacárido en sangre (80).

Existe información sobre glicosilación no-enzimática en otro tipo

tipo de proteínas como las que a continuación se describen:

Stevens y cols han dado evidencias convincentes de que la glucosilación de la colágena del cristalino puede contribuir al desarrollo de su opacificación (5).

Vlassara y cols, utilizando un sistema cromatográfico para determinar glucosilación no-enzimática encontraron en nervios periféricos de ratas y perros diabéticos, resultados de aminoácidos glucosilados no-enzimáticamente dos y media veces más elevados que sus controles correspondientes. El aminoácido glucosilado fué la lisina (10).

Monnier y cols informaron resultados de residuos de lisina glucosilados no-enzimáticamente, 5 a 10 veces más elevados en cristalino de ratas diabéticas y ratas galactosémicas, respectivamente, que sus controles correspondientes. La elevación fué predominantemente en la fracción insoluble del homogenizado de lentes. También se encontraron agregados de alto peso molecular unidos por puentes disulfuro. Estos resultados sugieren que las cataratas, secundarias a alteraciones metabólicas de los carbohidratos, en animales experimentales, son semejantes a las de los humanos en cuanto a presencia de agregados de alto peso molecular (11).

En 1981, McVerry y cols informaron de la glucosilación no-enzimática de fibrinógeno y productos líticos de fibrina, *in vitro*, indicando que la reacción dependía del tiempo de incubación, del pH del medio y de la temperatura (81).

Shnider y Kohn encontraron en la colágena de la piel de pacientes diabéticos, glucoproteínas de peso molecular más alto con respecto a las encontradas en sujetos sanos de la misma edad. En estas fracciones, las glucoproteínas de pacientes diabéticos tenían mayor cantidad de uniones cetoamina de glucosa-colágena insoluble, que sus controles de la misma edad (82).

Recientemente, Cohen y Yu-Wu, en un estudio hecho en colágena de membrana basal glomerular de ratas diabéticas inducidas por estroptozotocin, encontraron que el carbohidrato se une a la lisina o a su derivado, la hidroxilisina (9).

En otros estudios recientes se ha informado que las glucoproteínas séricas totales son susceptibles de glucosilación cinco veces más en pacientes diabéticos que en individuos sanos. Estos resulta

dos han correlacionado significativamente con la determinación de albúmina glucosilada en ayuno (83,84).

Utilizando la prueba de precipitación de carbohidratos con concanavalina A (85), se estudió el nivel de carbohidratos de la inmunoglobulina G en individuos sanos y en pacientes diabéticos, encontrándose diferencias significativas estadísticamente, entre ambos grupos (86).

Concanavalina A.

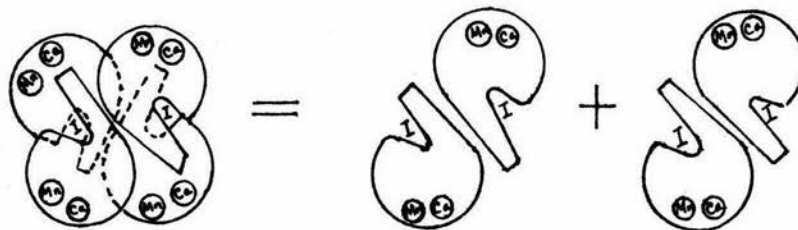
La concanavalina A es una lectina aislada del frijol Canavalia en-siformis, constituida por protómeros de 238 amino ácidos con peso molecular de 25 500, que requiere de iones calcio y manganeso para su unión con sacáridos específicos tales como la D-glucopiranososa y D-manopiranososa (87). Los protómeros forman dímeros a un pH menor de 6 y tetrámeros y grandes agregados a un pH mayor de 7. Los protómeros se relacionan entre sí por un exacto eje de simetría D2 con una orientación tal, que el tetrámero adopta una figura tetrahédrica (Figura 10). La localización de los sitios de unión de los sacáridos se llevó a cabo por cristalografía con rayos X: Un sacárido se une a cada unidad de Concanavalina A (Con A) de tal manera que cuatro moléculas de azúcar ocupan posiciones equivalentes simétricamente en la molécula tetramérica (88).

La Con A tiene la capacidad de unirse a los azúcares antes mencionados en una reacción altamente específica, similar a la de antígeno-anticuerpo (89), precipitando proteínas (90) por interacción con residuos de manosa y glucosa de la región central y de las cadenas de heterosacáridos (91).

Tomando en cuenta estos datos, se precipitó a la IgG humana del suero total a través de la Con A a una concentración de 50 mg/ml (92) cuantificándola por inmunodifusión radial con antisuero especifico para la IgG, confirmando de ésta manera la naturaleza glicoproteica de esta molécula.

Figura 10.

ESTRUCTURA DE TETRAMEROS Y DIMEROS DE LA
CONCAVALINA A



Representación esquemática de un tetramero y dos dímeros de la concanavalina A, vista desde el "eje C cristalográfico". (Tomado de Reeke et al, Ref. 88).

MATERIAL Y METODOS

1. Se utilizaron los siguientes reactivos y material de laboratorio: D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-fructosa, ácido clorhídrico y ácido tricloroacético de los laboratorios Merck Damstadt, RFA; albúmina sérica bovina, IgG liofilizada humana, ácido tiobarbitúrico, DEAE-Sephadex A 50, Tris(hidroximetilaminometano), agarosa, azida de sodio y antrona de Sigma Chem. Co. EUA; fenol, ácido sulfúrico, cloruro de sodio y fosfato ácido disódico de Productos Químicos Monterrey, Méx; fosfato ácido monopotásico y cloruro de potasio de Mallinckrodt Chem. de México, Méx; tubo de diálisis de Curtin Matheson Sci. Inc. EUA; filtros millipore; autoclave CyclomatiControl AMSCO; espectrofotómetro Beckman DB-GT; baño de agua, columnas de vidrio de 38X2 cm con membrana de vidrio sintetizada; mezclador de gradientes Pharmacia Fine Chem. Suecia; colector de fracciones Instrumentation Specialites Co. EUA; placas comerciales Tri-Partigen IgG, IgA e IgM, antisueros específicos de concentración conocida anti-IgG, anti-IgM para nefelometría y nefelómetro de los laboratorios Behringwerke, AG, RFA; portaobjetos, jeringas, alcohol, algodón, bisturí, tubos de ensayo, soportes, pinzas para columnas y mechero Bunsen.

2. Muestras de Suero para Obtención de IgG.

2.1 Suero Normal Humano (SNH): Se tomó 1.0 ml de suero de cada una de cien muestras de sangre de donadores profesionales de sangre del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional (CMN), IMSS, completándose 100 ml, que se mantuvieron en congelación a -10°C .

2.2 Suero de Diabéticos tipo I (DMJ): Se colectaron 76 ml de suero de igual número de pacientes con Diabetes mellitus tipo I (insulino-dependientes) del Hospital de Pediatría del CMN, IMSS. Estas muestras también se mantuvieron en congelación a -10°C .

2.3 Suero de Diabéticos tipo II (DMA): Se colectaron 28 ml de suero de 11 pacientes con Diabetes mellitus tipo II (no insulino-dependientes, adultos) de la Clínica 4 del IMSS.

3. Método para Obtener IgG de los Sueros.

El método se llevó a cabo en dos etapas: La primera consistió en la precipitación con sulfato de amonio y la segunda en el paso de la muestra por columnas de intercambio iónico.

3.1 Precipitación con Sulfato de amonio: Las muestras se precipitaron tres veces con sulfato de amonio en solución saturada a temperatura ambiente y pH 7.8, en proporción 2:1 (suero-sales), disolviendo el precipitado final en un volúmen menor al original con solución amortiguadora de boratos (ácido bórico 0.03%, bórax 0.048%, NaCl 0.87%, pH 8.0), contra la cual se dializó hasta eliminación total de sulfato de amonio (prueba negativa con hidróxido de bario al 10%)(93). Tanto al principio como al final del tratamiento con sales, se determinaron proteínas totales por el método de Lowry (94), con albúmina sérica bovina como estándar, e IgG por el método de inmunodifusión radial simple (95) con placas comerciales - Tri-Partigen-IgG.

3.2 Purificación en Columnas de Intercambio Iónico: Las muestras antes obtenidas se pasaron (alícuotas) por columnas de DEAE-Sephadex A50 (38X2cm), las cuales se equilibraron previamente con Tris-HCl 15mM pH 8.1 y se eluyeron en el mismo Tris-HCl + gradiente de NaCl 0.3M. La velocidad de elución fué de 0.5-1.0 ml por minuto y la recolección de muestras de 10 ml por tubo. Las lecturas de los eluidos se llevaron a cabo a 280 nm.

Los resultados de las absorbancias se graficaron en papel milimétrico, identificándose las fracciones principales que se reunieron en tubos de diálisis de nitrocelulosa de 2cm de diámetro para concentrarse por evaporación a 4°C. Estas fracciones se identificaron por inmunoelectroforesis, inmunodifusión radial simple y nefelometría.

4. Método de Inmunoelectroforesis.

La inmunoelectroforesis (IEF) se llevó a cabo con agarosa al 1 por ciento en solución de barbitales 6 Volts/cm durante 90 min. (96). Se agregó el antisuero total humano (obtenido como más adelante se describe), en la ranura principal de la placa (Figura 12) y se dejó reaccionar 24 hs a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con abundante solución salina (tres cambios de 1 litro cada uno) para eliminar el exceso de reactivos y se coloreó con amido negro.

5. Método para Obtener Antisero Total Humano.

Este antisuero se obtuvo inyectando 0.5 mg/0.5 ml de protefinas totales de suero normal humano (SNH)(inciso 2.1), previamente homogeneizado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund, por vía subcutánea en los muslos de un conejo de 2.5 Kg de peso, una vez por semana durante 4 semanas. El conejo se mantuvo antes y después de las inoculaciones en condiciones controladas el bioterio del Hospital de Pediatría del CMN. En la tercer semana se comprobó la presencia de anticuerpos (reacción antígeno-anticuerpo positiva) ya partir de la cuarta semana se sangró de la vena marginal (10-15 ml), una vez por semana durante 4 semanas. El suero se separó por centrifugación y se guardó en refrigeración a 4°C con azida de sodio al 0.1 por ciento como conservador.

6. Métodos para Determinar Azúcares.

6.1 Determinación de azúcares totales libres

Se utilizó el método de la antrona (antrona 0.05%, ácido sulfúrico al 66%) para determinar azúcares libres. Los estándares fueron D-glucosa, D-galactosa, D- manosa (97).

6.2 Determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente a la IgG.

El procedimiento consistió en seleccionar el método adecuado para la cuantificación de los monosacáridos y en realizar curvas de calibración para cada uno de ellos con el objeto de poder extrapolar los datos que se obtuvieran de la IgG antes y después de incubarla in vitro con los azúcares.

6.2.1 Selección del Método de Cuantificación:

6.2.1.1 En primer lugar se probó el método de Fluckinger y Winterhalter (76) de la siguiente manera: Se incubaron varias concentraciones de glucosa, galactosa y manosa con ácido oxálico 1M y se sometieron a baño de agua en ebullición por una hora

para obtener 5-hidroximetil 2-furfuraldehido (HMF). Posteriormente se incubó con ácido tiobarbitúrico 0.05M a 40°C durante media hora, para detectarlo a 443nm.

6.2.1.2. Debido a que los resultados del método anterior dieron lecturas bajas de absorvancia, se procedió a prolongar el tiempo de incubación de una a cuatro y media horas en baño de agua a ebu

llición y posterior incubación con ácido tiobarbitúrico a 50°C por 30 min (98). Los resultados de las absorvancias fueron ligeramente mayores que las anteriores.

6.2.1.3 En vista de que Kuster y Vander Baan (99) obtienen buenos rendimientos de HMF a partir de fructosa y HCl 1 N a 95°C y al vacío, se incubó la fructosa con ácido oxálico a una concentración final de 0.5M y 0.7M durante cuatro y media horas en baño de agua a ebullición y otras alfcuotas se incubaron a 20 psi, 121°C 20 min (condiciones de esterilización en autoclave), y otras alfcuotas se incubaron con HCl 1 N a 20 psi, 121°C 20 min, observádo un incremento significativo de las absorvancias en las últimas condiciones..

6.2.2 Curvas de Calibración.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se escogió el método de la incubación a 20 psi, 121°C, 20 min con HCl 1N y posterior tratamiento con ácido tiobarbitúrico 0.05M a 50°C durante 30 min. Las lecturas de densidad óptica se llevaron a cabo a 443 nm.

7. Incubación de las IgGs con monosacáridos in vitro.

7.1 Preparación del Material de Incubación: Todas las soluciones y el material utilizado para la incubación de la IgG con los azúcares, se esterilizaron con autoclave o con filtros millipore antes de su uso.

Se prepararon soluciones de IgG 10 mg/ml en solución amortiguadora salina-fosfatos (Na_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.02%, KCl 0.02%, NaCl 0.8% azida de sodio 0.02% pH 7.4), a la cual se agregó el monosacárido a 5, 10 ó 20 mM de concentración. Se incubaron alfcuotas a temperatura ambiente durante 8 días y a 37°C durante 7 días.

7.2 Método para la determinación de azúcares unidos no-enzimáti-camente a la inmunoglobulina G.

A una alfcuota de IgG preparada como se indicó anteriormente, se agregó una cantidad igual de albúmina sérica bovina 10 mg/ml como acarreador. Inmediatamente después, se agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 10 por ciento a 4°C para precipitar las protef nas y se centrifugó a 1500 rpm por 3 min. El precipitado se lavó 3 veces con ácido tricloroacético para eliminar la unión inespecf

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

llición y posterior incubación con ácido tiobarbitúrico a 50°C por 30 min (98). Los resultados de las absorvancias fueron ligeramente mayores que las anteriores.

6.2.1.3 En vista de que Kuster y Vander Baan (99) obtienen buenos rendimientos de HMF a partir de fructosa y HCl 1 N a 95°C y al vacío, se incubó la fructosa con ácido oxálico a una concentración final de 0.5M y 0.7M durante cuatro y media horas en baño de agua a ebullición y otras alícuotas se incubaron a 20 psi, 121°C 20 min (condiciones de esterilización en autoclave), y otras alícuotas se incubaron con HCl 1 N a 20 psi, 121°C 20 min, observádo un incremento significativo de las absorvancias en las últimas condiciones..

6.2.2 Curvas de Calibración.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se escogió el método de la incubación a 20 psi, 121°C, 20 min con HCl 1N y posterior tratamiento con ácido tiobarbitúrico 0.05M a 50°C durante 30 min. Las lecturas de densidad óptica se llevaron a cabo a 443 nm.

7. Incubación de las IgGs con monosacáridos in vitro.

7.1 Preparación del Material de Incubación: Todas las soluciones y el material utilizado para la incubación de la IgG con los azúcares, se esterilizaron con autoclave o con filtros millipore antes de su uso.

Se prepararon soluciones de IgG 10 mg/ml en solución amortiguadora salina-fosfatos (Na_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.02%, KCl 0.02%, NaCl 0.8% azida de sodio 0.02% pH 7.4), a la cual se agregó el monosacárido a 5, 10 ó 20 mM de concentración. Se incubaron alícuotas a temperatura ambiente durante 8 días y a 37°C durante 7 días.

7.2 Método para la determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente a la inmunoglobulina G.

A una alícuota de IgG preparada como se indicó anteriormente, se agregó una cantidad igual de albúmina sérica bovina 10 mg/ml como acarreador. Inmediatamente después, se agregó 1 ml de ácido tricloroacético al 10 por ciento a 4°C para precipitar las protefinas y se centrifugó a 1500 rpm por 3 min. El precipitado se lavó 3 veces con ácido tricloroacético para eliminar la unión inespecí

fica del azúcar. Los precipitados se solubilizaron en HCl 0.5N y se llevaron a 20 psi, 121°C, 20 min. Se adicionó ácido tiobarbitúrico 0.05M en cantidad igual, y se incubaron a 50°C por 30 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron nuevamente para eliminar turbidez. Finalmente se leyeron a 443nm.

Todas las muestras se realizaron por duplicado, con controles simultáneos de IgG y albúmina sérica bovina sin carbohidrato añadido.

RESULTADOS

1- Aislamiento y Purificación de la IgG.

1.1 Precipitación con Sulfato de Amonio.

Se determinaron proteínas totales antes y después de la precipitación de los sueros con sulfato de amonio, obteniéndose un promedio de rendimiento de 21 ± 1 por ciento (Tabla 5); así mismo, se determinó la cantidad de IgG en las mismas condiciones, con un rendimiento de 66 ± 1 por ciento (Tabla 6).

1.2 Purificación de la IgG por Cromatografía de Intercambio Iónico: Al pasar las muestras por las columnas de DEAE-Sephadex A50 el rendimiento de IgG fue de 10 ± 1 por ciento en los tres tipos de muestras eluidas (Tabla 7). Los resultados de la absorvancia de muestras (cada tubo), se graficaron contra los mililitros de cada uno, encontrándose un pico A que correspondió a la IgG, el cual se eluye alrededor de 0.075M de NaCl. En el suero normal se colectaron las fracciones hasta un total de 200 ml, observándose dos picos más (B y C) que correspondieron a la IgG e IgM, respectivamente (Figura 11).

1.3 Inmunolectroforesis.

La Figura 12 muestra los resultados de la inmunolectroforesis del suero total humano, del suero después de la tercera precipitación con sulfato de amonio, del pico A y de un estándar de IgG de Sigma Chem. Co.

2. Selección del Método de Determinación de Azúcares.

En la Tabla 8 y en las figuras 13 se observan los resultados de la determinación de los azúcares tratados con ácido oxálico y 1 hora de calentamiento. En esta tabla también se observan los resultados de la incubación de la glucosa con ácido oxálico y 4.5 hs de incubación.

La Tabla 9 y Figura 14 muestran los resultados de la determinación comparativa de la fructosa con el ácido oxálico (0.5 y 0.7M de concentración final) y con ácido clorhídrico (0.5M concentración final), en diferentes condiciones de deshidratación. Como puede observarse, en el caso del ácido oxálico se mejoran las lecturas de absorvancia cuando se aumenta la molaridad del ácido y de las

condiciones de deshidratación.

3. Curvas de Calibración de los Azúcares.

En la Tabla 10 y en Figura 15, se muestran los resultados de las curvas de calibración de los azúcares tratados en las condiciones anotadas en el inciso 6.2.2.

4. Incubación de la IgG humana normal con Monosacáridos in vitro.

La IgG humana normal se incubó con glucosa, galactosa y manosa para propiciar su unión en forma no-enzimática, así como para analizar las condiciones óptimas de la reacción.

4.1 Incubación con Monosacáridos a una Concentración de 10 mM.

La IgG humana normal se incubó con cada uno de los azúcares 10 mM a temperatura ambiente durante 8 días y a 37°C durante 7 días. Al hacer las determinaciones del azúcar unido a la proteína, se observó un incremento de las absorvancias a 443 nm en el material precipitable con ácido tricloroacético, las cuales aumentaron con el tiempo y la temperatura. Se calcularon las micromolas de azúcar por 10 mg de IgG y éstas se encuentran en las Tablas 11 y 12 y Figuras 16-19. De acuerdo con éstos datos, la IgG se satura aparentemente al sexto día de incubación a temperatura ambiente y al quinto día a 37°C.

4.2 Incubación de la IgG con azúcares a concentraciones de 5, 10 y 20 mM.

Con el fin de analizar si la saturación también dependía de la concentración del azúcar, se incubó esta proteína con dos nuevas concentraciones de monosacárido (5 y 20mM) y se repitió nuevamente la antes probada (10 mM) a 37°C. La Tabla 13 y las figuras 20-22 muestran los resultados encontrados.

4.3 Velocidad de Unión de los Azúcares en la Reacción No-enzimática: La Figura 23 muestra la velocidad de unión de los monosacáridos a la IgG, calculada en el tiempo de saturación y con molaridades de la IgG (PM 150 000) y de cada uno de los azúcares.

La Figura 24 presenta los mismos datos que la anterior, pero ahora en forma recíproca.

5. Reacción No-enzimática de la IgG de Pacientes con Diabetes Mellitus: Debido a la poca cantidad de IgG obtenida de pacientes

diabéticos, incubamos esta proteína sólo con glucosa y galactosa 20mM a 37°C, obteniéndose los resultados que aparecen en las fi
guras 25 y 26. Elegimos la concentración de 20 mM esperando en
contrar el máximo de unión de los azúcares a ésta temperatura.

Tabla 5.

Determinación de proteínas totales de los sueros antes y después de la precipitación con sulfato de amonio (Mét. de Lowry) (94)

Paso de purificación	Sueros		
	Normal mg	DMJ mg	DMA mg
Antes de la precipitación	6500.0	4385.0	2156.0
Después de la purificación	1284.5	907.7	510.4
Rendimiento	19.8%	20.7%	23.7%

DMJ = Diabetes mellitus juvenil.

DMA = Diabetes mellitus adulto.

Tabla 6.

Determinación de la inmunoglobulina G de los sueros antes y después de la precipitación con sulfato de amonio (Mét. Inmunodifusión radial simple) (95).

Paso de purificación	Sueros		
	Normal mg	DMJ mg	DMA mg
Antes de la precipitación	1700.0	1368.0	394.8
Después de la precipitación	1102.5	911.1	264.9
Rendimiento	64.8%	66.6%	67.1%

Fig. 11.

Cromatografía de intercambio iónico de sueros precipitados tres veces con sulfato de amonio y dializados. La resina utilizada es DEAE-Sephadex A50 equilibrada previamente con Tris-HCl 15 mM pH 8.1 y eluidas las muestras en el mismo amortiguador, con gradiente de NaCl 0.3 M. Los picos A, B y C correspondieron a las inmunoglobulinas G, A y M, respectivamente.

SNH=suero normal humano.

DMA= suero de diabéticos T. II

DMJ= diab. T. I

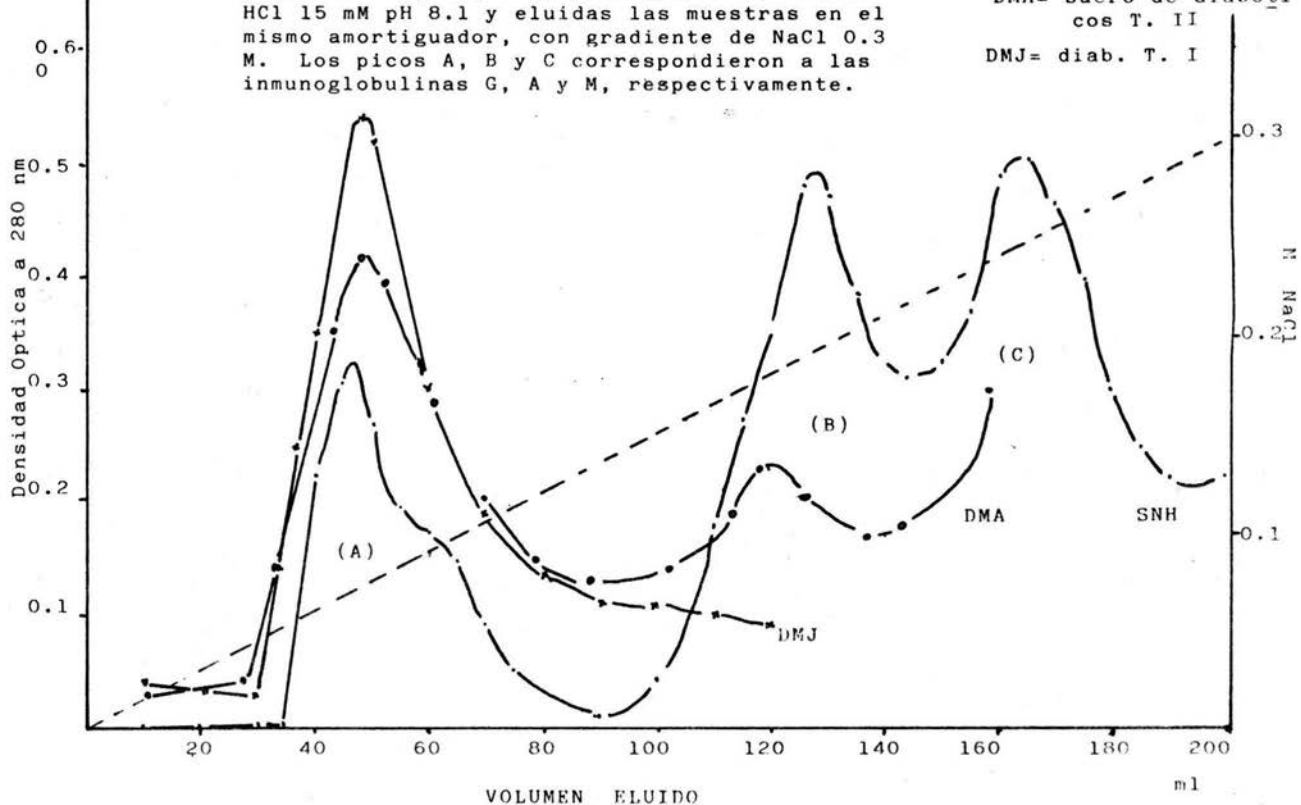
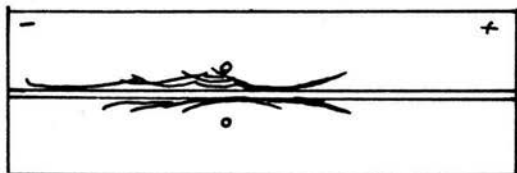


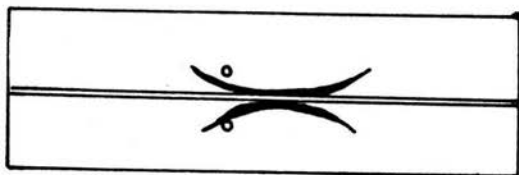
Figura 12.

INMUNOELECTROFORESIS



(a) De suero normal humano

(b) De la tercera precipitación con sulfato de amonio.



(c) Del pico (A) de la columna de intercambio iónico, concentrado.

(d) Del estandar de IgG (Sigma).

Tabla 7.

Determinación de la Inmunoglobulina G antes y después de la purificación por cromatografía en columna de DEAE-Sephadex A 50 (Mét. Inmunodifusión radial simple). Datos de una alícuota de cada muestra.

Paso de purificación	Sueros		
	Normal mg	DMJ mg	DMA mg
Antes de la purificación	78.75	152.5	144.0
Después de la purificación	8.42	17.51	13.4
Rendimiento	10.69%	11.48%	9.3%

Tabla 8.

Determinación de azúcares tratados con ácido oxálico 0.5M, 1 hora de calentamiento en baño de agua en ebullición y adición posterior de ácido tiobarbitúrico 0.05M e incubación con el mismo a 50°C por 30 min. La glucosa se incubó también por 5 hs en baño de agua a ebullición.

Concentración del azúcar	Tipos de azúcar			
	Glucosa		Galactosa	Manosa
ug totales	Absorbancia a 443 nm.			
	1 h cal.	5 hs cal.	1 h	1 h
200	0.02	0.01	0.01	0.02
400	0.04	0.02	0.01	0.03
600	0.06	0.07	0.02	0.04
800	0.07	0.10	0.03	0.05
1000	0.14	0.18	0.06	0.07

Determinación de monosacáridos por el método de deshidratación con ácido oxálico 0.5M conc. final y 1 ó 4.5 hs de ebullición en baño de agua. Se detectó con ácido tiobarbitúrico a 40°C por 30 min. D.O. 443 nm.

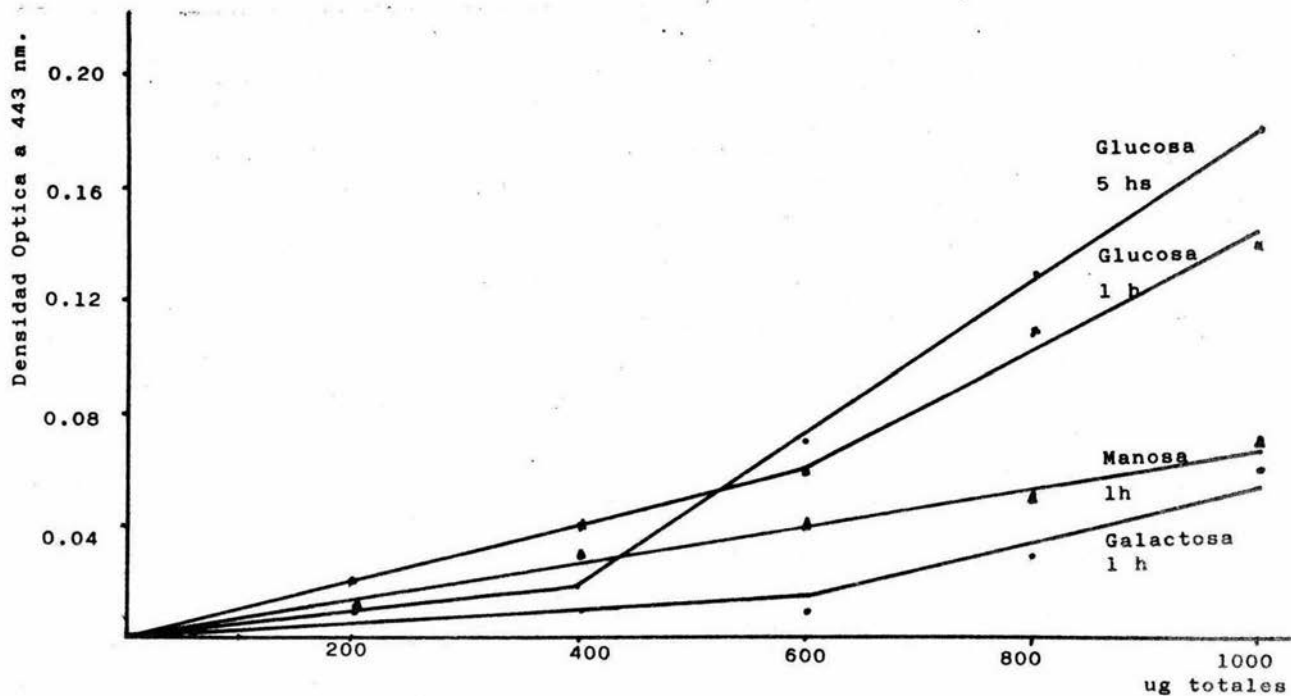


Tabla 9.

Determinación comparativa de la fructosa tratada con ácido oxálico y clorhídrico en diferentes condiciones de calentamiento. Posteriormente todas las muestras se incubaron con ácido tiobarbitúrico 0.05M a 50°C por 30 min y se leyeron a 443nm.

Fructosa ug totales	Acido oxálico Concentración final		Acido Oxálico Conc. final		Acido clorhídrico Conc. final
	0.5M 5 hs de ebullición	0.7M	0.5M 20psi	0.7M 121°C 20min.	0.5M 20psi 121°C 20min.
10	0.08	0.08	0.22	0.22	0.35
20	0.13	0.18	0.35	0.35	0.60
40	0.25	0.46	0.61	0.74	1.20
60	0.30	0.55	1.00	1.10	1.46
80	0.35	0.94	1.22	1.47	1.75
100	0.50	1.04	1.52	1.78	----

Fig. 14
Determinación de fructosa con ácido oxálico y clorhídrico en diferentes condiciones de incubación.

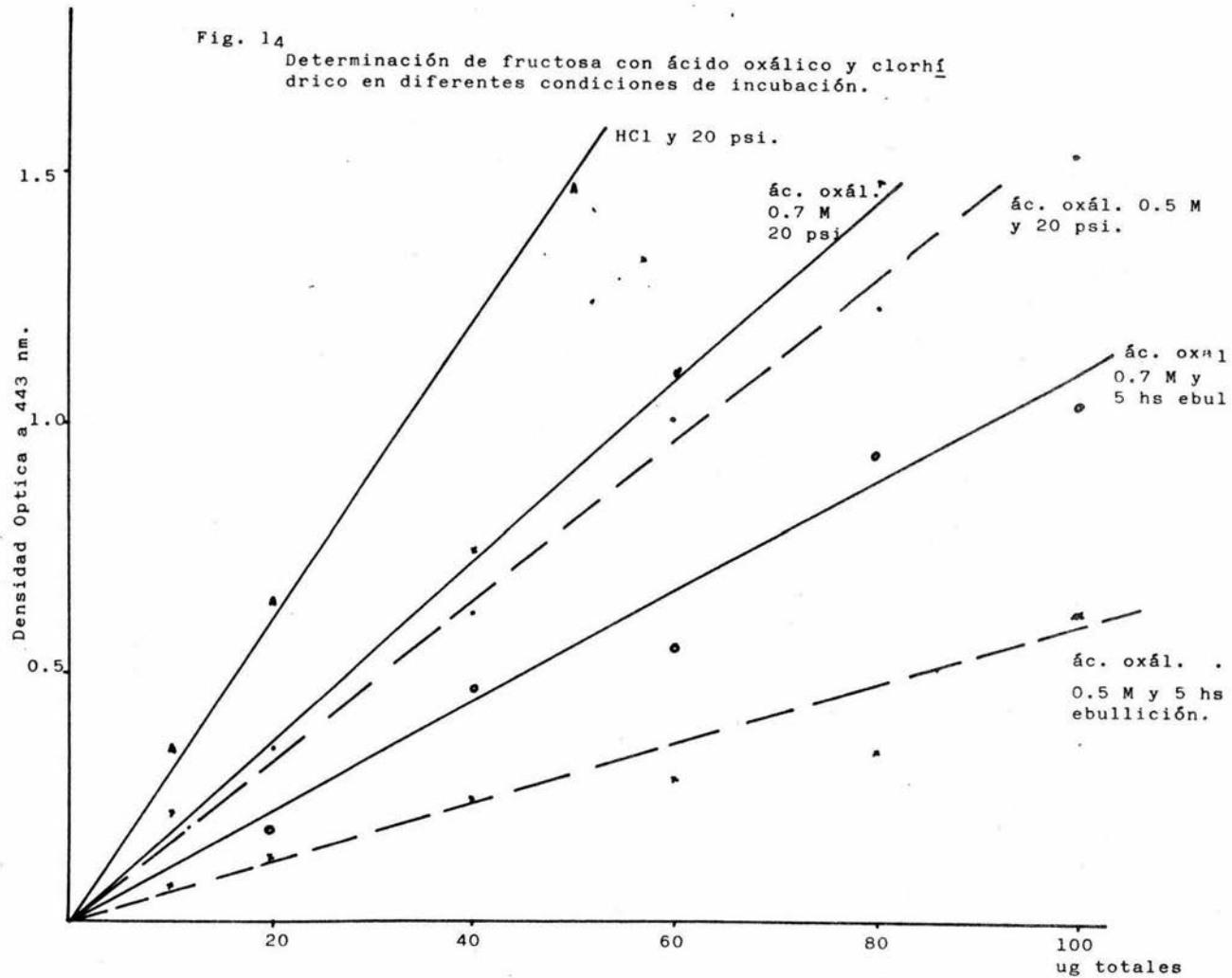


Tabla 10

Curvas de calibración de los azúcares tratados con ácido clorhídrico (conc. final 0.5N), 20psi 121°C 20 min, después de lo cual se agregó ácido tiobarbitúrico 0.05M y se incubó a 50°C por 30 min, y se leyó la absorvancia a 443 nm.

Concentra ción del azúcar. umolas totales	TIPOS DE AZUCAR		
	Glucosa	Galactosa	Manosa
1	0.07	0.06	0.08
2	0.13	0.10	0.15
3	0.18	0.16	0.21
4	0.23	0.21	0.28
5	0.28	0.26	0.34

Tabla 11

Determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente a la IgG normal a temperatura ambiente. Concentración del azúcar 10 mM; concentración de IgG 10 mg.

Dias de incuba ción	Micromolas totales de azúcar					
	1. Con carbohidrato base			2. Sin carbohidrato base		
	Glucosa	Galactosa	Manosa	Glucosa	Galactosa	Manosa
2	0.50	0.80	0.40	-	-	-
4	0.95	1.00	0.70	0.45	0.20	0.30
6	1.10	1.55	1.15	0.60	0.75	0.75
8	1.20	1.60	0.65	0.70	0.80	0.25

Fig. 15.

Curvas de calibración de glucosa, galactosa y manosa
(HCl 0.5 N, 20 psi, 121°C, 20 min. Después Ac. Ti_o
barbitúrico a 50°C por 30 min. D.O. 443 nm.

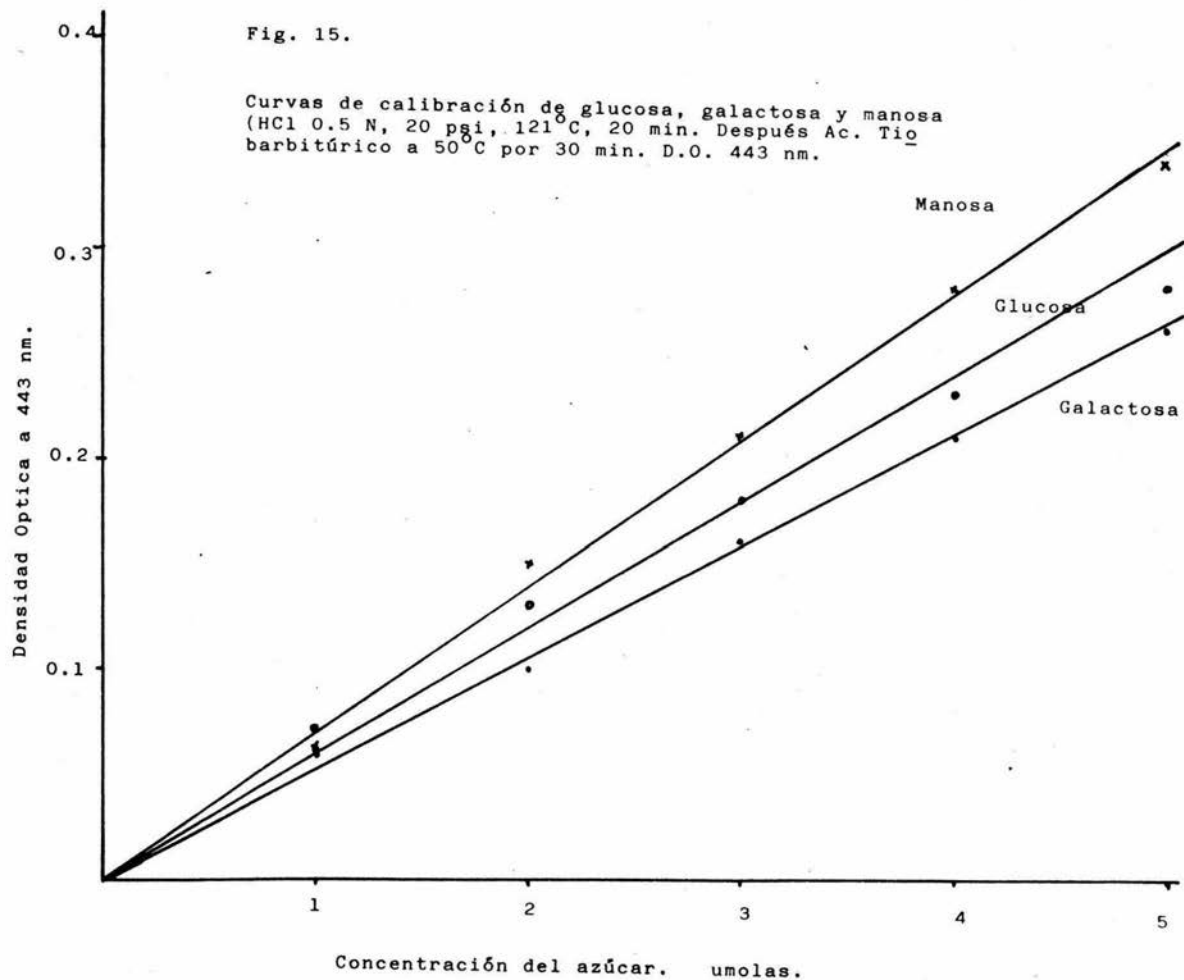


Fig. 16.

Determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente a la IgG normal, incubadas a temperatura ambiente. Concentración del azúcar 10 mM.

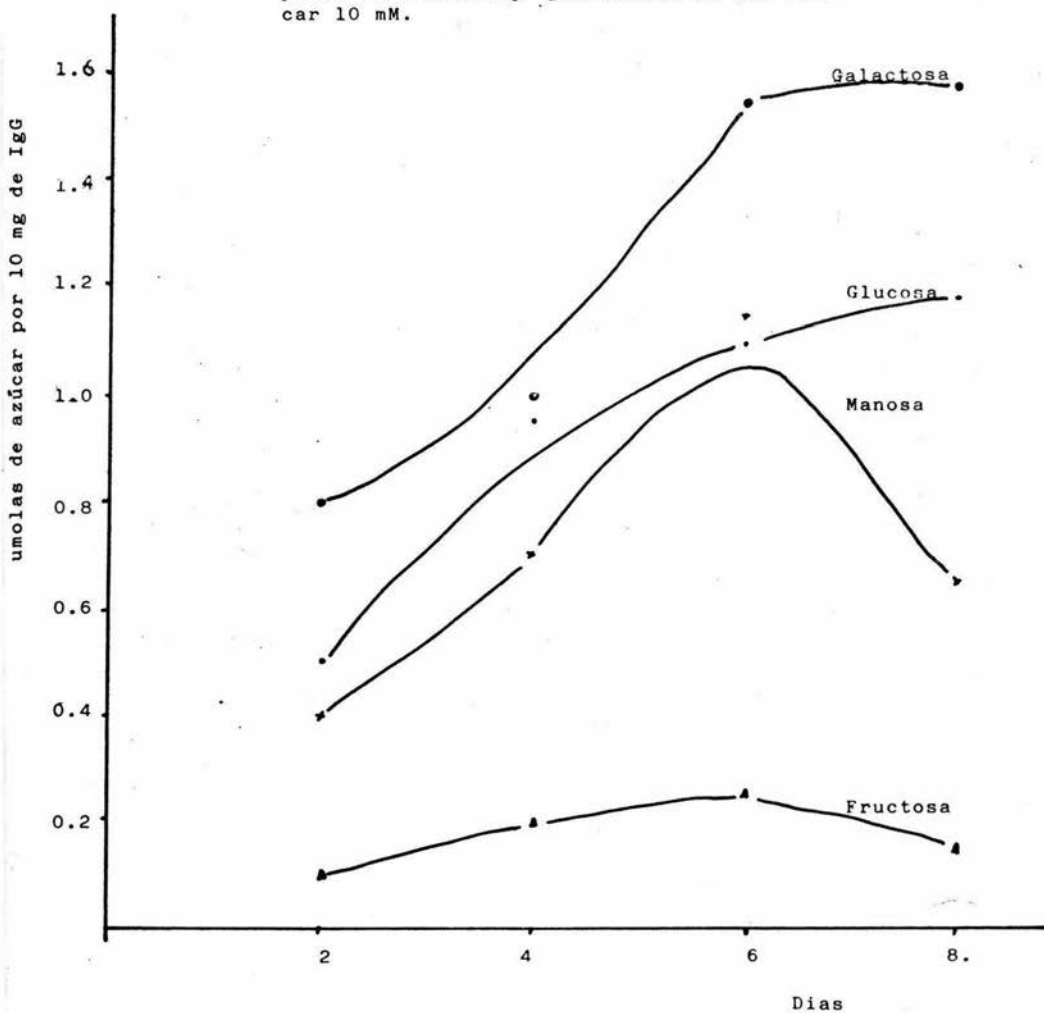


Fig. 17

Determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente a la IgG normal incubadas a temperatura ambiente. Concentración de los azúcares: 10 mM. Estas gráficas son sin carbohidrato basal.

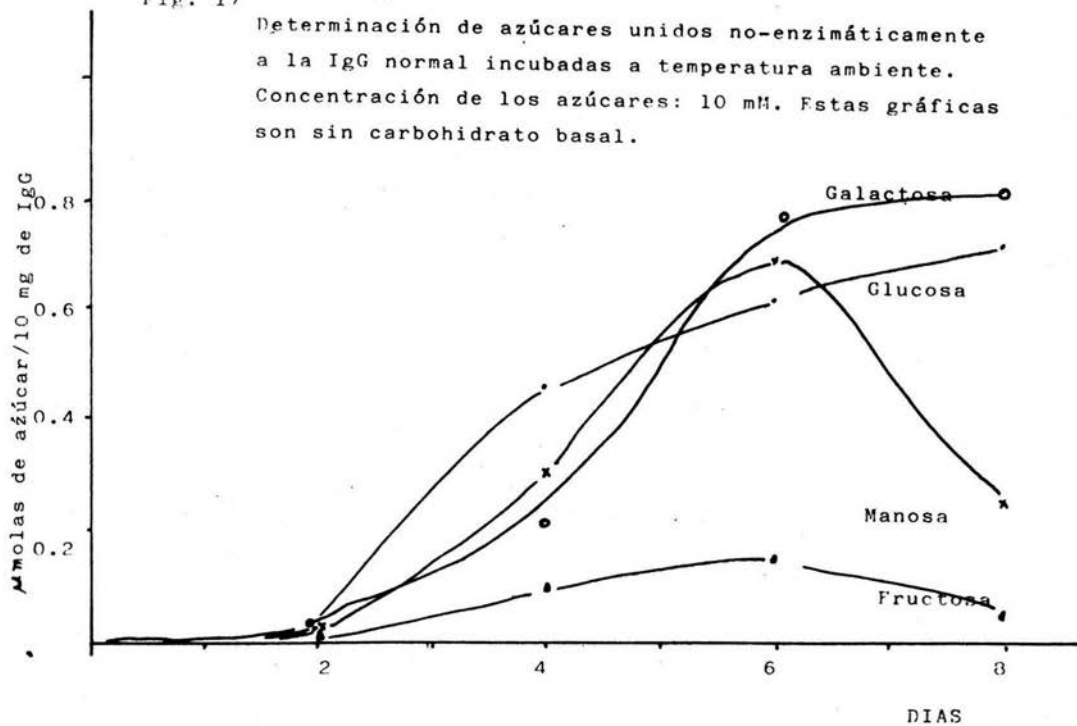


Tabla 12

Determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente a la IgG a 37°C. Concentración del azúcar 10mM; ccn concentración de IgG 10 mg.

Tiempo de incubación	Micromomalas totales de azúcar					
	1. Con carbohidrato base			2. Sin carbohidrato base		
	Glucosa	Galactosa	Manosa	Glucosa	Galactosa	Manosa
3 hs	1.0	1.0	1.0	-	-	-
6	1.1	1.1	1.1	0.1	0.1	0.1
8	1.2	1.5	1.2	0.2	0.5	0.2
1 día	1.8	2.0	1.7	0.8	1.0	0.7
2	1.8	2.0	1.5	0.8	1.0	0.5
3	2.0	2.4	1.7	1.0	1.4	0.7
4	2.2	2.5	1.7	1.2	1.5	0.7
5	2.3	2.8	2.0	1.3	1.8	1.0
7	2.0	2.7	1.7	1.0	1.7	0.7

Tabla 13

Determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente a la IgG a 37°C a tres concentraciones de monosacárido: 5, 10 y 20 mM. Concentración de IgG 10 mg.

Días de incubación	Micromolas totales de azúcar								
	Glucosa			Galactosa			Manosa		
	5	10	20	5	10	20	5	10	20
1	0.06	0.14	0.12	0.07	0.20	-	0.34	0.50	0.70
2	0.07	0.32	0.44	0.20	0.20	0.50	0.34	0.54	0.70
3	0.28	0.52	0.60	0.50	0.50	0.80	0.17	0.54	0.70
4	0.36	0.60	0.80	0.60	1.00	1.50	0.24	0.78	1.00
5	0.46	0.66		0.92	1.40	2.00	0.34	0.86	1.04
6	0.42	0.66	1.08	0.96	1.20	1.80	0.34	0.80	1.02
7	0.30	0.60	1.04	0.80	0.90	1.30	0.34	0.70	1.00

Fig. 18.

Unión no-enzimática de los azúcares 10 mM a la IgG humana de individuos normales a 37°C.

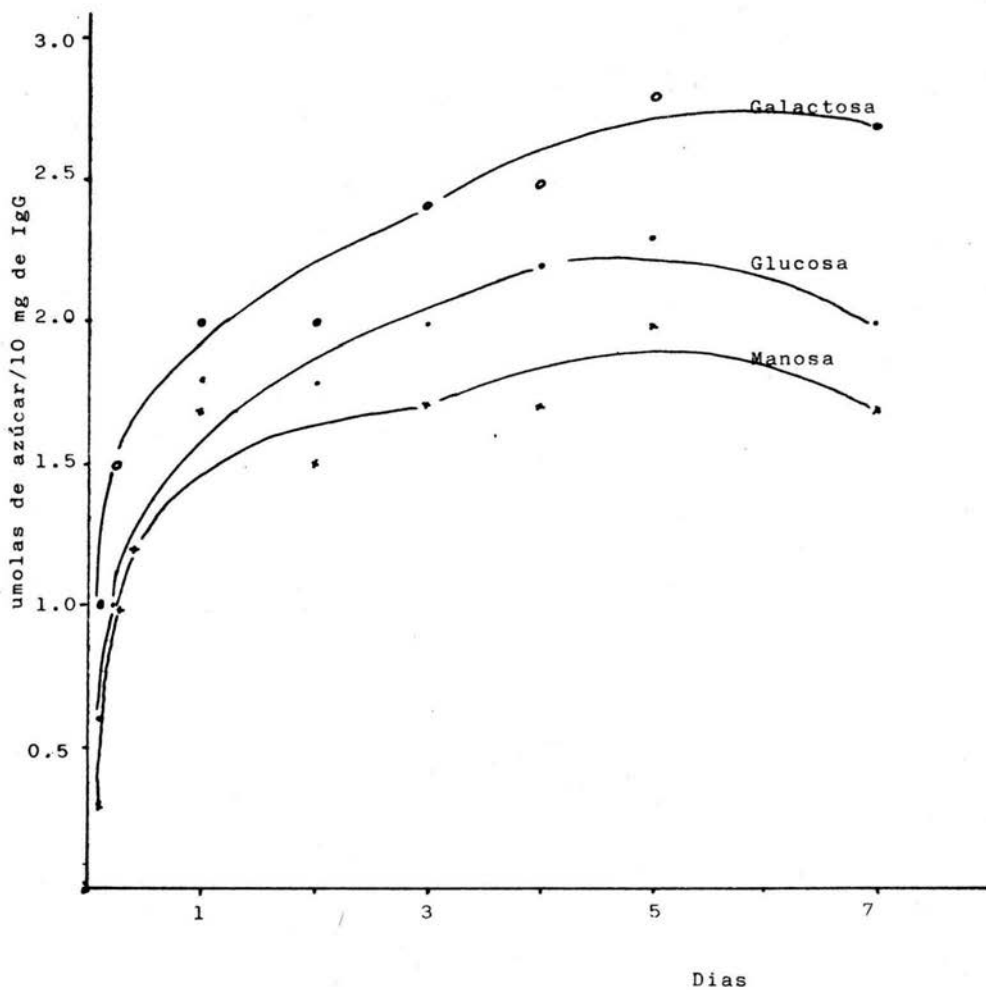


Fig. 19.

Unión no-enzimática de monosacáridos a IgG humana normal a 37°C. Concentración de los azúcares 10 mM. Gráficas sin carbohidrato basal de la IgG.

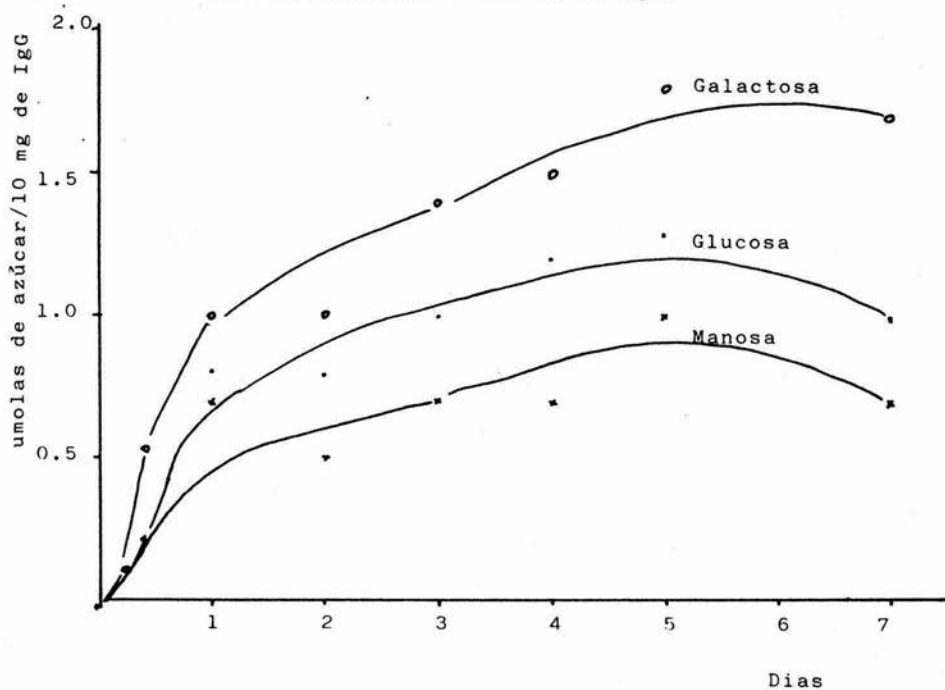


Fig. 20.

Unión no-enzimática de la glucosa a la IgG humana normal a 37°C. Concentración del azúcar: 5, 10 y 20 mM.

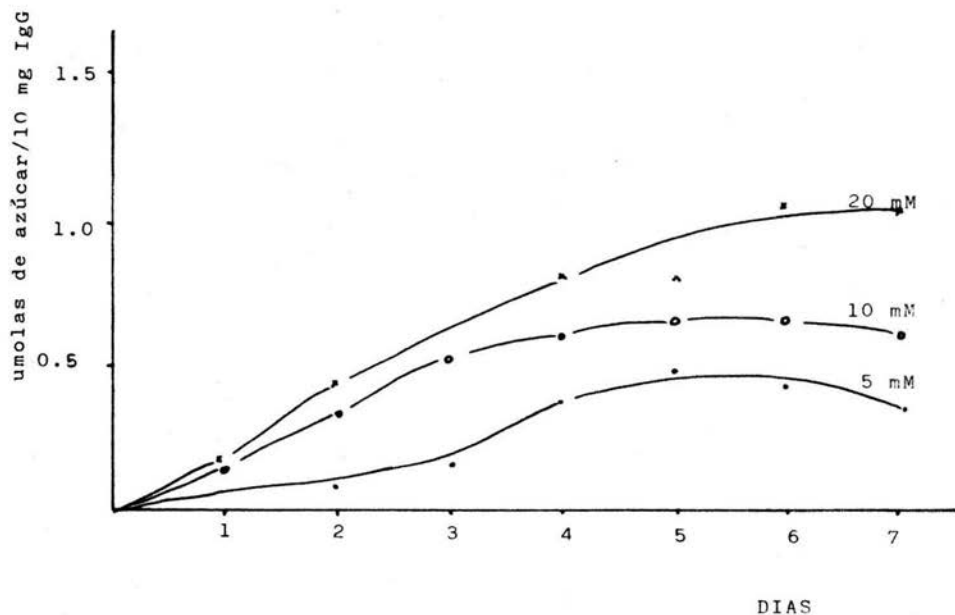


Fig. 21.

Unión no-enzimática de manosa a la IgG humana normal a 37°C. Concentración del azúcar: 5, 10 y 20 mM.

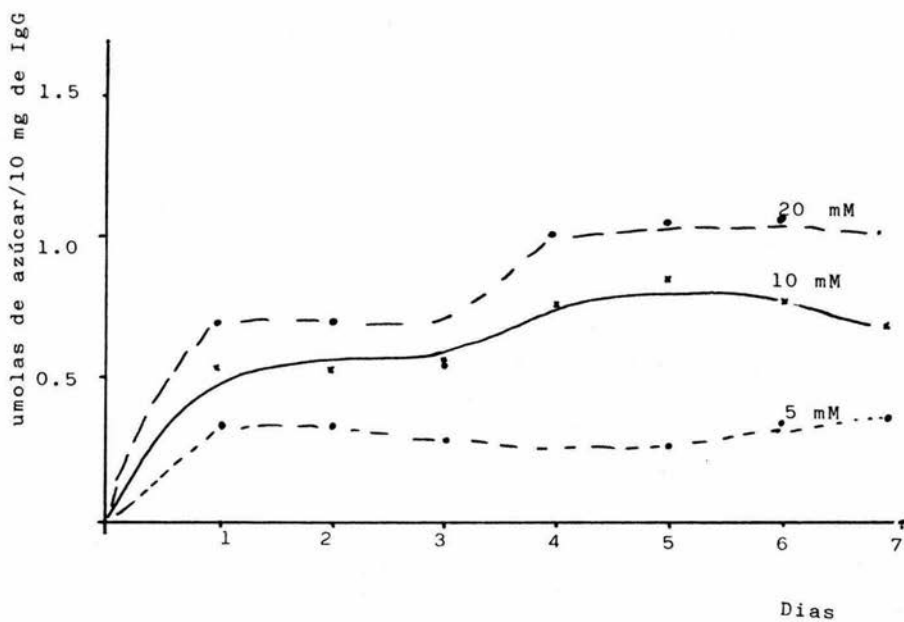


Fig. 22

Unión no-enzimática de la galactosa
a la IgG humana normal a 37°C. Con
centración del azúcar: 5, 10 y 20mM.

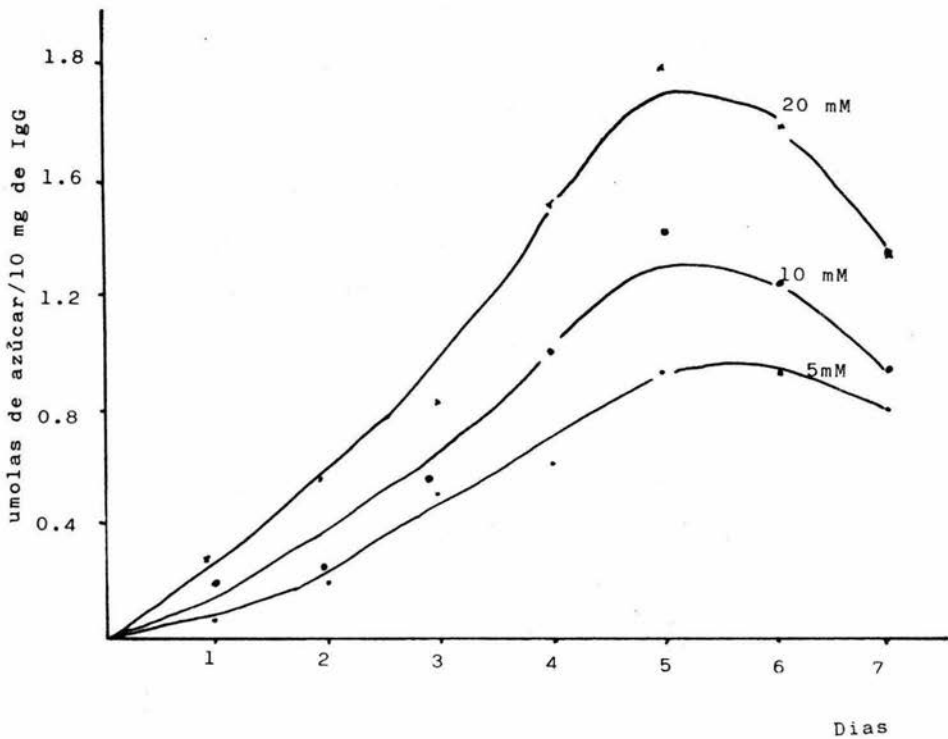


Fig. 23

Velocidad de unión de los azúcares a la IgG humana normal.

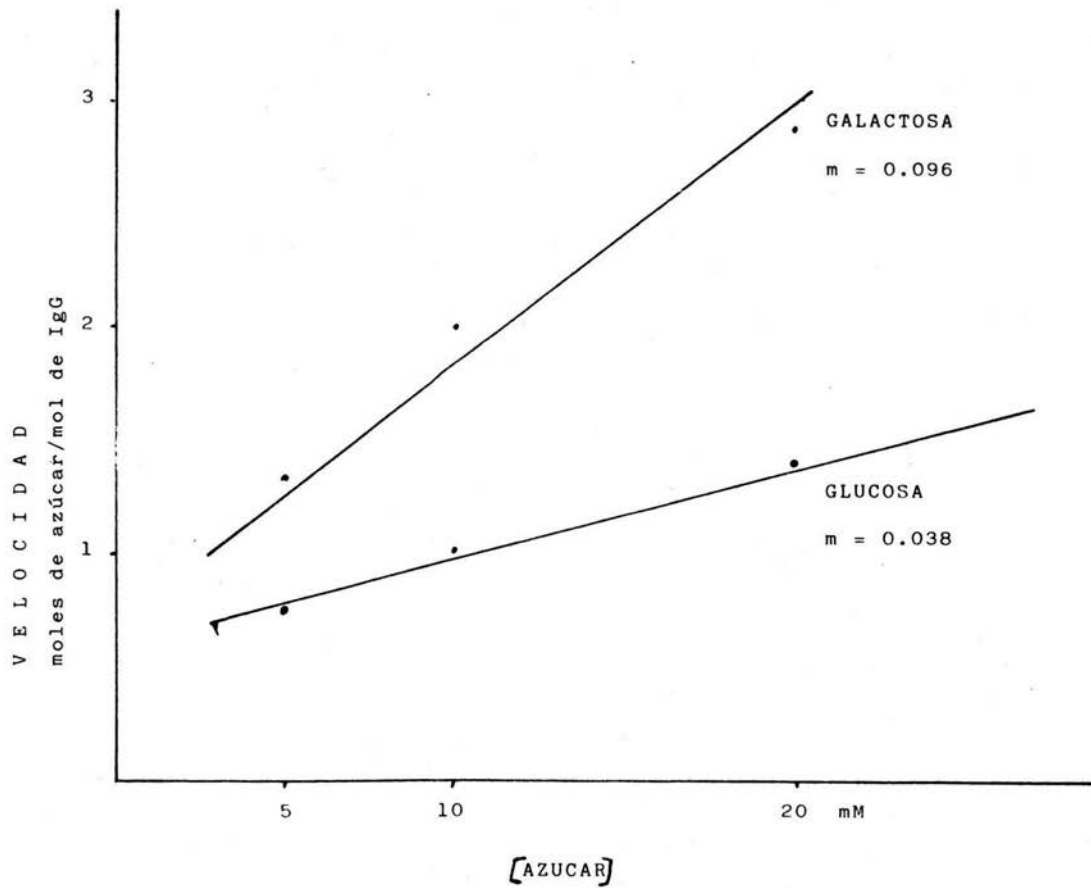


Fig. 24.

Cálculo de la constante de asociación aparente.
(Los puntos marcados con x corresponden a manosa)

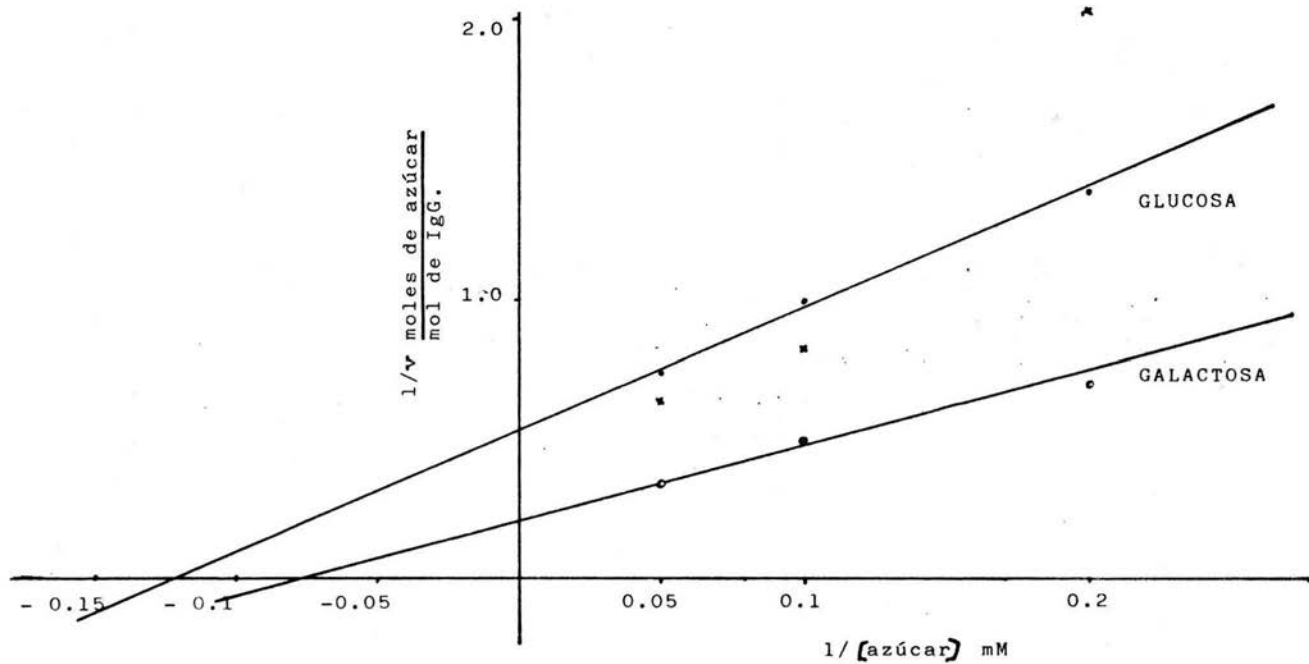


Fig. 25

Unión no-enzimática de azúcares (20 mM) a la IgG de diabéticos juveniles a 37°C.

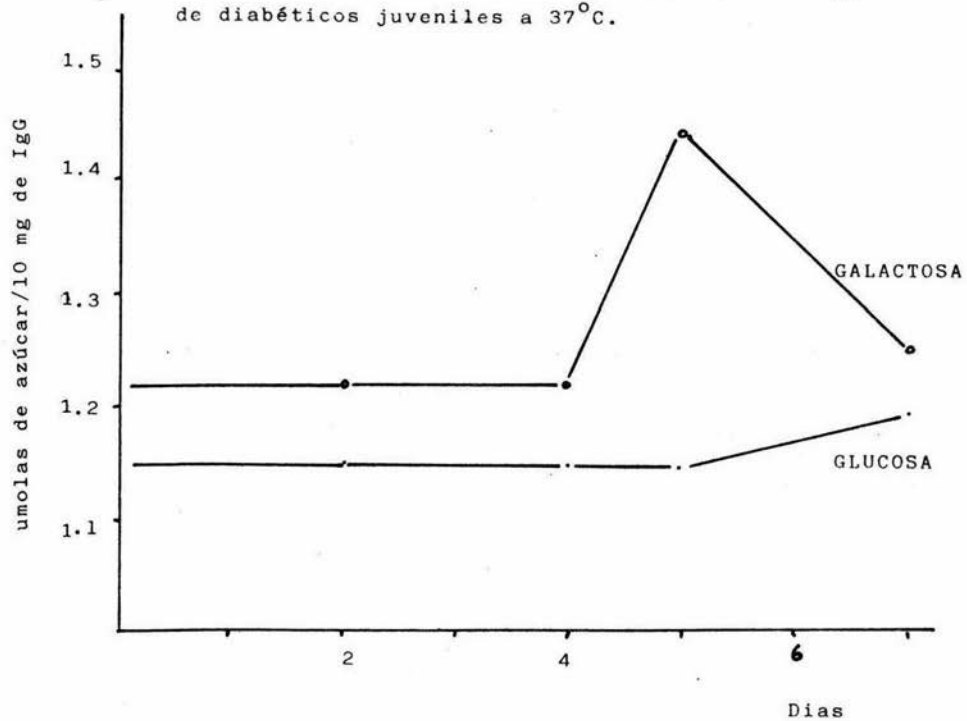
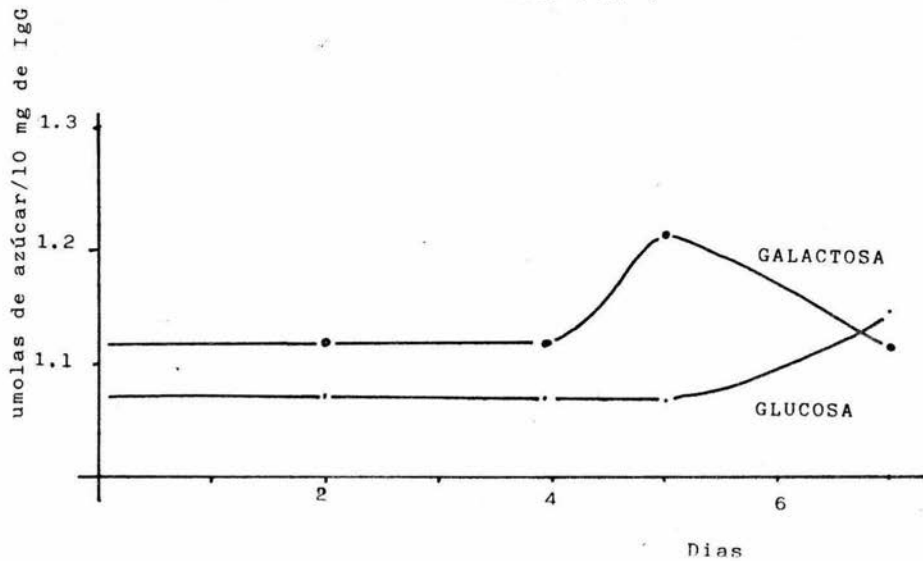


Fig. 26

Unión no-enzimática de los azúcares (20 mM) a la
IgG de diabéticos adultos a 37°C



DISCUSION

Los resultados en cuanto a concentración de proteínas totales de 21 por ciento (Tabla 5) obtenidos por precipitación con sulfato de amonio, son explicables ya que el procedimiento tiene por objeto eliminar la mayor cantidad posible de proteínas que no son inmunoglobulinas. Así mismo, el rendimiento de 66 por ciento de IgG en ésta fase no fué sorprendente debido a que se pierde cierta cantidad de IgG al ser arrastrada junto con otras proteínas (Tabla 6). El rendimiento de 10 por ciento en promedio de IgG obtenida de las columnas de intercambio iónico (Tabla 7), en parte puede ser explicado por una modificación de la carga micelar de la IgG por el tratamiento con sulfato de amonio o por desnaturalización de la proteína. Es posible que la alteración fisicoquímica en las moléculas trajera como consecuencia una mayor afinidad de la IgG por la resina de intercambio iónico, sumándose la IgG al resto de proteínas que en forma similar quedaron unidas a la resina en la parte superior de la columna. Esto puede ser debido también a que el gradiente de cloruro de sodio (hasta 0.3M) no logró desunir a la IgG de la resina en su totalidad. Sin embargo, la IgG así obtenida está altamente purificada como se pudo comprobar por inmunoelectroforesis, inmunodifusión radial simple y nefelometría.

En vista de que los métodos de Fluckinger y Winterhalter (76) y de Kennedy y Merimee (98) dieron resultados de absorvancia muy bajos (Tabla 8 y Figura 13), se llevó a cabo la determinación de fructosa, dada su mayor sensibilidad en la producción de 5-hidroximetil 2-furfuraldehído, cambiando las condiciones de calentamiento a 20 psi, 121°C, 20 min. Como era de esperarse, la densidad óptica de las muestras aumentó en función de la concentración del azúcar y del ácido utilizado. Se obtuvo una mayor absorvancia con HCl de bido a que se disocia más rápidamente que el oxálico, esto es, tiene una mayor constante de disociación. Por lo anterior, se procedió a tratar a la glucosa, a la galactosa y a la manosa con - HCl 1N, 20 psi, 121°C 20 min, tratándola posteriormente con ácido tiobarbitúrico 0.05M y 50°C por 30 min. Las obsorvancias obtenido das por éste método son más altas que las obtenidas con ácido oxálico (Tabla 8).

Es importante señalar que, dadas las bajas concentraciones de azúl

car unido a IgG, con el método de ácido oxálico sólo se podía de terminar fructosa. Por tanto, se seleccionó el método de ácido clorhídrico ya que no contamos con azúcares marcados con radioisótopos.

Con el método de HCl se comprobó que los azúcares glucosa, galactosa y manosa, utilizados a una concentración de 10 mM, se unen a la IgG de individuos normales a temperatura ambiente, y que la cantidad de monosacárido unido aumenta en función del tiempo llegando a un máximo al sexto día de incubación (Tabla 11 y Fig. 15). La cantidad de cada uno de los monosacáridos unidos *in vitro*, una vez restado el carbohidrato unido *in vivo* a la IgG normal (carbohidrato base), se encuentra graficado en la figura 18. Estos datos muestran que los monosacáridos glucosa, galactosa, manosa y fructosa se unen no-enzimáticamente a la proteína, y que la cantidad de unión de cada azúcar varía, siendo la galactosa mayor que glucosa y manosa y éstas a su vez mayores que la fructosa. Así mismo, puede observarse que las cinéticas de cada uno de los azúcares son diferentes entre sí, manteniendo no obstante el mismo tiempo de saturación que sin restar el carbohidrato base (sexto día para la galactosa y manosa y octavo para la glucosa).

Para acelerar la reacción no-enzimática se incubaron nuevas alícuotas de muestra azúcar-IgG a 37°C, observando un aumento de la concentración de los monosacáridos unidos a la IgG y un rápido incremento de la velocidad de unión en las primeras 24 hs de incubación (Figura 18). La cantidad total de monosacáridos unidos viene a ser aproximadamente el doble de la que se obtuvo a temperatura ambiente. La cinética de unión es diferente según el tipo de azúcar y el tiempo de saturación fué más rápido: quinto día para galactosa y manosa y séptimo para glucosa).

Se analizó la cinética de unión no-enzimática de los azúcares a la IgG en función de la concentración de los primeros. Los resultados muestran que tanto la glucosa como la galactosa siguen una línea parabólica definida, pero ésta no es muy clara para la manosa. Este hecho puede ser debido en parte a la sensibilidad del método y en parte a la "inestabilidad" del hidroxilo del carbón 2 de la manosa que la hace ser en cierta forma más reactiva, pero inestable en su unión (100).

Se comprobó que había un máximo de unión de carbohidratos al quinto día de incubación, independientemente del azúcar y de su concentración. Aparentemente la cantidad de azúcar unida va en orden: Galactosa glucosa manosa.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con los de Cohenford y cols. que realizaron un estudio similar pero utilizando azúcares radioactivos, se encontraron resultados semejantes en cuanto a que la cantidad de galactosa se une más que la glucosa; sin embargo, el tiempo de saturación que ellos obtienen fué de siete días, probablemente debido a la sensibilidad del método.

Con el fin de determinar si efectivamente la cantidad de unión de galactosa era mayor que la glucosa, se realizaron cálculos de velocidad de unión de éstos carbohidratos con unidades de moles de azúcar por mol de IgG, contra la concentración milimolar del azúcar de la reacción al quinto día de incubación (saturación). En la figura 23 se observa que la velocidad de unión aumenta linealmente con la concentración del azúcar y que la galactosilación se llevó a cabo dos y media veces más rápido que la glucosilación. La pendiente de la galactosa fué de 0.096 y la de la glucosa de 0.038. La manosa no aparece trazada en la figura ya que el punto correspondiente a 5 mM se sale totalmente de una línea recta. Cohenford y cols (101) observaron que la galactosa se une tres veces más rápido que la glucosa y en este estudio sólo dos y media veces. Esta diferencia puede ser explicada en parte por la forma en que los autores mencionados calcularon la velocidad en relación al tiempo de incubación y no a la concentración del azúcar. De la misma manera, la cinética de los azúcares en relación al tiempo de incubación es muy diferente de la encontrada por nosotros, sobre todo en las primeras 24 hs y entre el quinto y séptimo día, hallazgos que pueden ser explicados por la diferente sensibilidad de los métodos empleados en uno y otro caso.

Los datos de la recíproca de la velocidad de unión confirman la afinidad de los azúcares por la IgG. Si se calcula la constante de asociación aparente de la reacción no-enzimática en forma similar a lo que se hace con reacciones enzimáticas, en vista de que de alguna manera refleja la asociación de un sustrato (el azúcar)

a una proteína, encontramos que aparentemente la glucosa y la galactosa tienen sitios de unión diferentes a la molécula de IgG (Figura 24). El punto de cruce de las líneas sobre el eje de las abscisas sugiere esta conclusión, siendo la constante de asociación aparente de galactosa de 13.2, mientras que la de glucosa es de 8.1.

La mayor afinidad de la galactosa puede explicarse en parte por una mayor reactividad de este azúcar en relación a la glucosa, debido a la presencia de un grupo hidroxilo axial en el cuarto átomo de carbono de la galactosa en su conformación piranósida que es la más frecuente en solución (100).

El hecho de haber encontrado una marcada diferencia en la velocidad de unión de los azúcares en las primeras 24 hs de la reacción con respecto a los demás días de incubación sugiere que pueden existir dos tipos diferentes de constantes de asociación aparente para cada uno de los monosacáridos.

Cuando se incubaron las inmunoglobulinas G de los diabéticos con glucosa y galactosa, se observó un aumento en la unión de galactosa sólo al quinto día de incubación, mientras que en el caso de la glucosa el ligero aumento se encontró en el séptimo día (Figuras 25 y 26). Estos resultados pueden ser debidos a que ya tienen una cantidad de glucosa basal más alta que la de los normales la cual ha sido unida *in vivo*, lo que se traduce en una probable saturación de la molécula.

Si comparamos las figuras 25 y 26 con la figura 18, podemos observar que la IgG normal une 1.5 umolas de galactosa y 1.0 umolas de glucosa por 10 mg de IgG, mientras que la IgG de pacientes diabéticos logra unir *in vitro* de 0.1 a 0.23 umolas de galactosa (diabéticos tipo II y I respectivamente) y 0.05 umolas de glucosa por 10 mg de IgG en ambos grupos de diabéticos. Esto quiere decir que si llegase a existir alguna posibilidad de reacción *in vitro* para la IgG de pacientes diabéticos es tan baja como únicamente un 5 por ciento adicional de unión de glucosa tanto para el tipo I como para el II y un máximo de 15 por ciento para galactosa en diabéticos tipo I y 6 por ciento para diabéticos tipo II.

En las figuras 25 y 26 también se observa que la cantidad de carbohidrato unido *in vivo* a la IgG de los pacientes diabéticos tipo

I (DMJ) es mayor que la de los diabéticos tipo II (DMA), y que los primeros tienen un nivel de unión de glucosa y galactosa aparentemente mayor que los segundos. Una de las razones para explicar estos datos es que los diabéticos tipo I son jóvenes (7-15 años) insulino-dependientes que por múltiples motivos tienen dificultades para controlar su glucosa sanguínea en los niveles normales, en comparación con los de tipo II que son más estables. Estos hallazgos han sido corroborados con otros estudios como por ejemplo con hemoglobina glucosilada en ambos grupos de pacientes (98).

El hecho de encontrar una casi nula glicosilación no-enzimática in vitro en las inmunoglobulinas G de los diabéticos, sugiere que esta reacción puede ser uno de los mecanismos bioquímicos para contribuir a establecer el equilibrio normal de éstos pacientes, aunque es conocido el caso de que al alterar la estructura tridimensional en su concentración de carbohidrato, puede alterar su función, en este caso de anticuerpo, su vida media en circulación y por lo tanto su vía metabólica. Estos hallazgos abren la posibilidad de investigar las repercusiones metabólicas y funcionales de las inmunoglobulinas en pacientes con diabetes mellitus. Por otro lado, el haber encontrado una correlación entre el nivel de glicosilación y la concentración de monosacárido, así como del tiempo de incubación, sugiere que el método puede ser de utilidad en control del tratamiento terapéutico a mediano plazo (7 días).

CONCLUSIONES

1. Se hicieron modificaciones a los métodos para la determinación de azúcares unidos no-enzimáticamente incrementándose la sensibilidad para la determinación de los mismos. Estas condiciones fueron: deshidratación con HCl 1N a 20 psi, 121°C 20 min, y posterior incubación de las muestras con ácido tiobarbitúrico 0.05M a 50°C por 30 min, y lecturas a 443 nm.
2. Se comprobó la glicosilación no-enzimática in vitro de la IgG humana normal. Esta glicosilación aumenta con la temperatura, concentración del monosacárido y con el tiempo de incubación.
3. Bajo las mismas condiciones de incubación, se observó que la galactosa se une más que la manosa y que la glucosa.
4. Los resultados de glicosilación in vitro de las IgGs de los pacientes diabéticos fueron muy bajos, probablemente debido a que se glicosilaron más in vivo debido a que tienen niveles de glucosa sanguínea más altos que los normales. Las IgGs de los pacientes diabéticos tipos I y II presentaron niveles de carbohidrato más altos que los normales, siendo los de tipo I más alto que los de tipo II.

GLICOSILACION IN VITRO DE LA INMUNOGLOBULINA G HUMANA DE SUJETOS NORMALES Y DE PACIENTES DIABETICOS.

Resumen:

Con el objeto de averiguar la cinética de la glicosilación no-enzimática de la inmunoglobulina G (IgG) humana, se separó la IgG de una mezcla de sueros de donadores de sangre, otro de pacientes diabéticos tipo I y un tercero de diabéticos tipo II. Se analizaron los niveles de unión no-enzimática de glucosa, galactosa y manosa a las IgGs in vitro durante una semana, haciendo determinaciones periódicas en dos condiciones de temperatura (20 y 37°C), y variando la concentración de los monosacáridos (5, 10 y 20 mM). Para llevar a cabo las determinaciones de los niveles de azúcares unidos no-enzimáticamente, se modificaron los métodos colorimétricos propuestos para éste fin, cambiando las condiciones de acidéz y de presión de la reacción con mejores rendimientos (absorvancias más altas). Los resultados fueron los siguientes: La unión no-enzimática aumenta con la concentración del azúcar, con el tiempo de incubación y con la temperatura de la reacción. La galactosa se unió más rápidamente que la manosa y que la glucosa a 37°C. In vivo, los pacientes diabéticos presentaron niveles de glucosa más altos que los normales; sin embargo, al glicosilarlas in vitro con galactosa presentaron un aumento de absorvancia al quinto día de incubación y al séptimo día con glucosa, pero mucho menor que en IgG normal. El hecho de encontrar una baja glicosilación en las IgGs de los diabéticos sugiere por una parte, que ésta reacción puede ser un mecanismo bioquímico para establecer un equilibrio en estos pacientes y por otra, es bien conocido el hecho de que al modificar el grupo carbohidrato de una proteína, se modifica su estereoquímica y la estructura tridimensional de la misma, lo que puede alterar su vida media y por lo tanto su vía metabólica, así como su función que en este caso es de anticuerpo. Los hallazgos de la correlación del grado de glicosilación con la concentración del azúcar en el medio también sugieren que puede utilizarse como un método para el control terapéutico de pacientes con problemas en el metabolismo de los carbohidratos.

BIBLIOGRAFIA

1. Sharon, N.: Complex Carbohydrates. Their Chemistry, Biosynthesis and Functions. Addison-Wesley Publ Co. Londres 1975 p.26.
2. Sharon, N. y Lis, H.: Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 1972, 177:949-959.
3. Rahbar, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin Chim Acta 1968, 22: 296-298.
4. Bunn, H.F., Gabbay, K.H. y Gallop, P.M.: The glycosylation of hemoglobin: Relevance to diabetes mellitus. Science 1978, 200:21-27.
5. Stevens, V.J., Rouzer, C.A., Monnier, V.M y Cerami, A.: Diabetic cataract formation: Potential role of glycosylation of lens crystallins. Proc Natl Acad Sci USA 1978, 75: 2918-2922.
6. Spiro, R.G.: Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. Diabetologia 1976, 12: 1-14.
7. Gottschalk, A: Glycoproteins. Gottschalk, A. ed. American Elsevier Publ Corp New York 1972, pp 141-157.
8. Day, J.F., Thorpe, S.R., Baynes, J.W.: Nonenzymatically Glycosylated Albumin. J Biol Chem 1979, 254: 595-597.
9. Cohen, M.P. y Yu-Wu, V.: Identification of specific amino acids in diabetic glomerular basement membrane collagen subject to non-enzymatic glycosylation in vivo. Biochem Biophys Res Commun 1981, 100: 1549-1554.
10. Vlassara, H. Brownlee, M. y Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78: 5190-5192.
11. Monnier, U.M., Stevens, V.J. y Cerami, A.: Nonenzymatic glycosylation, sulphhydryl oxidation and aggregation of lens proteins in experimental sugar cataracts. J Exp Med 1979, 150:1098-1107.
12. Urbanowski, J.C., Cohenford, M.C. y Dain, J.A.: Nonenzymatic galactosylation of Human Serum Albumin. J Biol Chem 1982, 257: 111-115.
13. Lehninger, A.L.: Glycoproteins en Biochemistry. 2da. ed. Worth Publ Inc New York 1976, 10: 273-277.
14. Carlson, D.M.: Structures and Immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. J Biol Chem 1968, 243: 616-626.
15. Spiro, R.G.: Characterization and quantitative determination of hydroxylsine-linked carbohydrate unit of several collagens. J Biol Chem 1969, 244: 602-612.
16. Spiro, R.G.: Glycoproteins. Adv Protein Chem 1973, 27:349-467.
17. Plummer, T.H., Tarentino, A. y Maley, F.: The glycopeptide linkage of ribonuclease B. J Biol Chem 1968, 243: 5158-5164.

18. Plummer, T.H.Jr. y Hirst, C.H.W.: On the structure of bovine pancreatic ribonuclease B. *J Biol Chem* 1964, 238: 2530-2538.
19. Tarentino, A., Plummer, T.H. y Maley, F.: Studies on the oligo-saccharides sequence of ribonuclease B. *J Biol Chem* 1970, 245:5140-5157.
20. Sharon, N.: Glycoproteins en Complex Carbohydrates (Ref. 1), pp 33-47.
21. Spiro, R.G. (Ref. 16), p.350-351.
22. Marks, G.S., Marshall, R.D. y Neuberger, D.: Carbohydrates in Proteins. 6. Studies on the carbohydrate-peptide bond in hen's-egg albumin. *Biochem J* 1963, 87: 274-281.
23. Anderson, B., Semo, N. Sampson, P, Riley, J.L., Hoffman, P. y Meyer, K.: Theonine and serine linkages in mucopolisaccharides and glycoproteins. *J Biol Chem* 1964, 239: PC 2716-2719.
24. Spiro, R.G.: The structure of the disaccharide unit of the renal glomerular basement membrane. *J Biol Chem* 1967, 242:4813-4823.
25. Spiro, R.G. y Fukushi, S.: The lens capsule. Studies on the carbohydrate units. *J BIOL Chem* 1969, 244: 2049-2058.
26. Sharon, N. (Ref. 1), pp 118-126.
27. Gottschalk, A.: Biosynthesis of glycoproteins and its relationship to heterogeneity. *Nature* 1969, 22: 452-454.
28. Schachter, H. y Rodén, L.: The biosynthesis of animal glycoproteins, en *Methabolic Conjugation and Methabolic Hydrolysis*, ed. W. H. Fishman, Academic Press, New York 1973, pp 1-149.
29. Neutra, M. y Leblond, C.P.: The Golgi apparatus. *Scien Amer* 1969, 220: 100-107.
30. Whaley, W.G., Dauwalder, M. y Kephart, J.E.: Golgi apparatus: Influence on cell surfaces. *Science* 1972, 175: 596-599.
31. Melchers, F.: Biosynthesis of the carbohydrate portion of immunoglobulins *Biochemical and Chemical analysis of carbohydrate moieties of two myeloma proteins purified from different subcellular fractions of plasma cells. Biochemistry* 1971, 10:633-659.
32. Cunningham, L.W.: Microheterogeneity and Functions of Glycoproteins, en *Glycoproteins of Blood Cells and Plasma*, ed. Jamieson y Greenwalt, J.B. Lippincott, Philadelphia. 1971, pp 16-34.
33. Kornfeld, R. y Kornfeld, S.: Comparative aspects of glycoproteins structures. *Ann Rev Biochem* 1976, 45: 217-237.
34. Hubbard, S.C. e Ivatt, R.J.: Synthesis and Processing of Asparagine-linked oligosaccharides. *Ann Rev Biochem* 1981, 50:555-583.
35. Li, E., Tabas, I. y Kornfeld, S.: The synthesis of complex-type oligosaccharide precursor of the complex-type oligosaccharides of the vesicular stomatitis virus G proteins. *J Biol Chem* 1978, 253: 7762-7770.
36. Waechter, Ch. J. y Lennarz, W.J.: The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis. *Ann Rev Biochem* 1976, 45:95-112.

37. Elbein, A.D.: The role of lipid-linked saccharides in the biosynthesis of complex carbohydrates. *Ann Rev Plant Physiol* 1979, 30: 239-272.
38. Bergman, L.W. y Kuehl, W.M.: Temporal relationship of translocation and glycosylation of immunoglobulin heavy and light chains. *Biochemistry* 1978, 17: 5174-5180.
39. Kieley, M., McKnight, S. y Schimke, R.T.: Studies on the attachment of carbohydrate to ovalbumin nascent chains in hen oviduct. *J Biol Chem* 1976, 251: 5490-5495.
40. Neuberger, A. y Marshall, R.D.: Carbohydrates and their roles, Westport (Conn), Avi Pub Co. 1969, pp 1-115.
41. Rothman, J.E. y Lodish, H.F.: Synchronised transmembrane insertions and glycosylation of a nascent membrane protein. *Nature* 1977, 269: 775-780.
42. Sefton, B.M.: Immediate glycosylation of Sindbis virus membrane proteins. *Cell* 1977, 10: 659-668.
43. Tartakoff, A., Vassalli, P. y Detrs, M.: Plasma Cell immunoglobulin M molecules. Their biosynthesis, assembly and intracellular transport. *J Cell Biol* 1979, 83: 284-299.
44. Bielinska, M. y Boime, I.: m-RNA-dependent synthesis of a glycosylated subunit of human chronic gonadotropin in cell-free extracts derived from ascites tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978, 75: 1768-1772.
45. Belanger, L., Fleisher, B., Fleisher, S., Guillouzo, A., Lemmonier, M. y Chiu, J.F.: Subcellular distribution and molecular heterogeneity of alpha-1-fetoprotein in newborn rat liver. *Biochemistry* 1979, 18: 1962-1968.
46. Jamieson, J.C.: Studies on the side of addition of sialic acid and glucosamine to rat alpha-1-acid glycoprotein. *Can J Biochem* 1977, 55: 408-414.
47. Grinna, L.S. y Robbins, P.W.: Glycoprotein biosynthesis rat liver microsomal glucosidases which process oligosaccharides. *J Biol Chem* 1979, 254: 8814-8818.
48. Ito, S., Yamashita, K., Spiro, R.G., Kobata, A.: Structure of a carbohydrate moiety of a unit A glycopeptide of calf thyroglobulin. *J Biochem Tokyo* 1977, 81: 1621-1631.
49. Tabas, I. y Kornfeld, S.: Purification and characterization of rat liver Golgi alpha-mannosidase capable of processing asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 1979, 254: 11655-11663.
50. Tabas, I y Kornfeld, S.: The synthesis of complex-type oligosaccharides. III Identification of an alpha-D-mannosidase activity involved in a late stage of processing of complex-type oligosaccharides. *J Biol Chem* 1978, 253: 7779-7786-
51. Navasimhan, S., Stanley, P. y Chachter, H.: Control of Glycoprotein Synthesis. *J Biol Chem* 1977, 252: 3926-3933.
52. Harpaz, N. y Schachter, H.: Control of glycoprotein synthesis bovine calostrum UDP-N-acetylglucosamine: Alpha-D-mannoside Beta 2-N-acetylglucosaminyltransferase II. Partial purification and substrate specificity. *J Biol Chem* 1980, 255: 4885-4893.

53. Harpaz, N. y Shachter, H.: Control of glycoprotein synthesis. Processing of Asparagine-linked oligosaccharides by one or more rat liver Golgi alpha-D-mannosidases dependent on the prior action of UDP-N-acetylglucosamine:alpha-D-mannoside Beta 2-N-acetylglucosaminyltransferase I. *J Biol Chem* 1980, 255: 4879-4884.
54. Wilson, J.R., Williams, D. y Schachter, H.: The control of glycoproteins synthesis: N-acetylglucosamine linkage to a manose residue as a signal for the attachment of L-fucose to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residues of glycopeptide from alpha-1-acid glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1976, 72:909-916.
55. Stachter, H.: The glycoconjugates, Vol 2 ed. M. Horowitz, W. Pigman, New York, Academic Press 1978, pp 87- 181.
56. Hakimi, J. y Atkinson, P.H.: Growth-dependent alterations in oligomannosyl glycopeptides expressed in siddbis virus glycoproteins. *Biochemistry* 1980, 19: 5619-5624.
57. Ceccarini, C., Muramatsu, T. Tsang, J. y Atkinson, P.H.:/Characterization of manose-labeled glycopropeptides from human diploid cells and their growth-dependent alterations. *J Biol Chem* 1976, 251 (15): 4673- 4678.(Ref. 58)
58. Muramatsu, T., Koide, N., Ceccarini, C. y Atkinson, P.H.:/Growth-dependent alterations in oligomannosyl cores of glycopeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975, 72(8): 3139-3143. (Ref. 57).
59. Zilberstein, A.:Snider, M.D., Porter, M y Lodish, H.F.: Mutants of vesicular stomatitis virus blocked of different stages in maturation of the viral glycoprotein. *Cell* 1980, 21: 417-427.
60. Knipe, D., Baltimore, D., Lodish, H.P.: Maturation of viral proteins in cells infected with temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus. *J Virol* 1977, 21: 1149-1158.
61. Lohmeyer, J. Klenk, H.D.: A mutant of influenza virus with a temperatura sensitive defect in the postraslational procesing of the hemagglutinin. *Virology* 1979, 93: 134-145.
62. Heroz, A.,Katona, E., Wilson, J.R. y Barton, M.: Alpha-1-antitripsin: The presence of excess mannose in the Z variant isolated from liver. *Science* 1978, 201: 1229-1232.
63. Heroz, A. y Harpaz, N.: Characterization of the oligosaccharides of liver Z variant alpha-1-Antitripsin. *Can J Biochem* 1980, 58: 644-648.
64. Krangel, M.S., Orr, H.T. y Strominger, J.L.: Assembly and maturation of HLA-A and HLA-B antigens in vivo. *Cell* 1979, 18:979-991.
65. Rodriguez, B.E., Kreibich, G. y Sabbatini, D.D.: Spatial Orientation of glycoproteins in membranes of rat liver rough microsomes I. Localization of lectin-binding sites in microsomal membranes. *J Cell Biol* 1978, 78: 874-893.
66. Rodriguez, B.E., Sabatini, D.D., Pereyra, B.N., Kreibich, G.: Spatial orientation of glycoproteins in membranes of rat liver rought microsomes. II. Transmembrane disposition and characterization of glycoproteins. *J Cell Biol* 1978, 78: 894-909.

67. Stros, G.J.A.M. y Lodish, H.F.: Intracellular transport of secretory and membrane proteins in hepatoma cells infected by vesicular stomatitis virus. *Cell* 1980, 22: 709-717.
68. Nungaray, M.L.C.: Glicoproteinas y su relación con algunos estados patológicos. Tesis de licenciatura, Universidad de Guadalajara, Facultad de Medicina, 1976, pp86-93.
69. Savvidou, G., Klein, M., Horne, C., Hoffman, T. y Dorrington, K.L.: A monoclonal immunoglobulin G1 in wich some molecules posses glycosylated light chains. I. Site of glycosylation. *Mol Immunol* 1981, 18: 793-805.
70. Sox, H.C. y Hood, L.: Attachment of carbohydrate to the variable region of myeloma emmunoglobulin light chains, en Carbohydrate moieties of Immunoglobulin. MSS Information Corp New York 1974, pp. 10-17.
71. Fanger, M.W. y Smith, D.G.: The oligosaccharides. Units of rabbit immunoglobulin G. Asymmetric attachment G1, G2 oligosaccharides. *Biochem J* 1972, 127: 767-774.
72. Cheron, A., Fournet, B. y Spik, G.: Structure of carbohydrate groups of IgG1 immunoglobulin of cow calostrum. *R Acad Sci (d)* (Paris) 1978, 283: 117-120.
73. Baezinger, J. y Kornfeld, S.: Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. *J Biol Chem* 1974, 249: 7270-7281.
75. Monnier, V.M. y Cerami, A.: Non-enzymatic glycosylation and browning of proteins in diabetes. *Clin Endocrinol Metab* 1982, 11: 431-452.
74. Gottschalk, A.: Glycoproteins. Gottschalk, A. ed. (Ref. 7).
76. Flukinger, R. y Winterhalter, K.H.: In vitro synthesis of hemoglobin Alc. *FEBS Lett.* 1976, 71: 356-360.
77. Day, J.F., Thornburg, R.W., Thorpe, S.R. y Baynes, J.W.: Non enzymatic glucosylation of rat albumin. Studies in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 1979, 254: 9394-9400.
78. Day, J.F., Ingebretsen, C.G., Ingebretsen, W.R., Baynes, J.W. y Thorpe, S.R.: Nonenzymatic glucosylation of serum proteins and hemoglobin: Response to change in blood glucose levels in diabetic rats. *Diabetes* 1980, 29: 524-527.
79. Dolhofer, R. y Wieland, O.H.: Glycosylation of serum albumin: Elevated glycosyl-albumin in diabetic patients. *FEBS Lett* 1979, 103: 282-286.
80. Miller, J.A., Gravalles, G. y Bunn, F.: Nonenzymatic glycosylation of erithrocyte membrane proteins. Relevance to diabetes. *J.Clin Invest* 1980, 65: 896-901.
81. McVerry, B.A., Thorpe, S., Joe, F., Goffney, P. y Huehns, E.R.: Non-enzymatic glucosylation of fibrinogen. *Haemostasis (Switzerland)* 1981, 10: 261-270.
82. Schnider, S.L. y Kohn, R.R.: Effects of age and diabetes mellitus on the solubility and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J Clin Invest* 1981, 67: 1630-1635.
83. McFarland, K.F., Catalano, E.W., Day, J.F., Thorpe, S.R. y Bay

- nes, J.W.: Nonenzymatic glucosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* 1979, 28: 1011-1014.
84. Gragnoli, G., Tanganelli, I., Signorini, A.M. tarli, P. y Paoli, C.: Nonenzymatic glycosylation of serum proteins as an indicator of diabetic control. *Acta Diabetol Lat (Italy)* 1982, 19: 161-166.
85. Rostenberg, I., Peñaloza, R., Guízar-V, J. Cicero, R., Olivares, A. y Armendares, S.: Altered carbohydrate content on IgG in asymptomatic smokers. *Rev Invest Clin (Méx.)* 1981, 33: 45-47.
86. Peñaloza, R., Rostenberg, I., Pérez-Pastén, E., Pérez-Lucio, J., Barrón-Urbe, C. y Armendares, S.: Glycosylation of IgG in patients with juvenile diabetes mellitus. *Rev Invest Clin (Méx.)* 1979, 31: 104.
87. Cunningham, B.A.: Analysis of lymphocyte stimulation by lectins and lectins derivatives. *Ann N Y Acad Sci* 1974, 234: 219-225.
88. Reeke, G.N., Becker, J.L. y Edelman, G.M.: Relationships between the structure and activities of concanavalin A. *Annals N Y Acad Sci* 1974, 234: 369-382.
89. So, L.L. y Goldstein, I.J.: Protein-Carbohydrate interaction. IV. Application of the quantitative precipitin method to polisaccharide-concanavalin A interaction. *J Biol Chem* 1967, 242: 1617-1622.
90. Goldstein, I.J., So, L.L., Yang, Y. y Callies, Q.C.: Protein-Carbohydrate interaction. XIX. The interaction of concanavalin A with IgM and the glycoproteins phytohemagglutinins of the waxbean and the soybean. *J Immunol* 1969, 103: 695-698.
91. Kornfeld, R. and Ferris, C.: Interaction of immunoglobulin glycopeptides with concanavalin A. *J Biol Chem* 1975, 250: 2614.
92. Rostenberg, I. y Guízar-Vazquez, J.: Differential precipitation of serum proteins with variable amounts of concanavalin A. *Rev Invest Clin (Méx.)* 1979, 31: 41-44.
93. Kendall, F.E.: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation of human G-immunoglobulin, en *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Academic Press New York 1967, Vol I p. 219.
94. Lowry, O., Rosebrough, N.: Protein measurement with the Folin Phenol Reagent, *J Biol Chem* 1951, 193: 265-271.
95. Mancini, G., Carbonara, A.O. y Heremans, J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965, 2: 235-254.
96. Williams, C.A.: Immuno-electrophoretic analysis in agar gels, en *Methods in Immunology and Immunochemistry*. Academic Press New York 1971, Vol III pp 234-272.
97. Roe, J.H.: Determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J Biol Chem* 1955, 212: 335-343.
98. Kennedy, A. L. and Merimee, T.J.: Glycosylated serum Protein and hemoglobin A1 levels to measure Control of glycemia. *Annals of Internal Medicine* 1981, 95: 56-58.
99. Kuster, F.M. and Van der Baan, H.S.: The influence of the initial and catalyst concentrations on the dehydration of D-fructose. *Carbohydrate Research* 1977, 54: 165-176.

100. Kelly, R.B.: A relationship between the conformations of cyclohexane derivatives and their physical properties. *Can J Chem* 1957, 35: 149-156.
101. Cohenford, M.A., Urbanowski, S.C., Shepard, D.C. y Dain, J.A. : Nonenzymatic glycosylation of human IgG: In vitro preparation. *Immunol Commun* 1983, 12: 189-200.
102. Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. y Wells, J.W. *Inmunología básica y clínica* ed. El Manual Moderno, S.A. C.V. México. 1983 Cap. 4 Inmunoglobulinas 1: Estructura y Función.

va al Dr. Bux
on todos aprecio y agr
decíndole una vez más
todas sus atenciones y gent
de su alumna permanentem
Maritza E. de Flores
2/9/75