

Instituto Nacional de Endocrinología
Centro de Atención al Diabético

AISLAMIENTO DE PRODUCTOS FINALES DE LA GLUCOSILACIÓN AVANZADA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Dr. Manuel Ayra Rivas,¹ Lic. Oscar Díaz Horta² y Lic. Alexis Rendón Herrera²

RESUMEN

Se describió un procedimiento para obtener productos finales de la glucosilación avanzada a partir de una mezcla de albúmina que había sido glucosilada e incubada a 37 °C en condiciones de esterilidad, oscuridad y en presencia de glucosa por 6 sem. Se empleó la cromatografía de afinidad con matriz de lisozima para aislar los péptidos glucosilados que eluyeron con hidróxido de sodio 0,1 N. Se determinó la densidad óptica a 280 nm de cada fracción. Se observó que las fracciones eluidas de la mezcla de albúmina y glucosa, describieron una curva con un área mayor que la mezcla de albúmina sin glucosa, este hecho coincidió con lo planteado en otros trabajos. Se concluyó que la cromatografía de afinidad con matriz de lisozima es un método eficaz para aislar los productos finales de la glucosilación avanzada. Se planteó que estos productos podrían emplearse para elaborar métodos inmunoquímicos de detección en la sangre, tejidos u otros líquidos corporales. Las lecturas de las densidades ópticas fueron útiles para demostrar los péptidos glucosilados que eluyeron.

Descriptores DeCS: PRODUCTOS FINALES DE GLUCOSILACION AVANZADA/
aislamiento y purificación; CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD/métodos.

Los productos finales de la glucosilación avanzada (PFGA) constituyen un grupo de moléculas con alto peso molecular, que se forman en las proteínas expuestas a altas concentraciones de glucosa por mucho tiempo.¹

Estos compuestos forman puentes intercatenarios entre las proteínas que afectan sus funciones biológicas.² Diversos estudios han tratado de demostrar el papel mediador de los PFGA en los efectos nocivos de la glucosa en la diabetes a largo

¹ Especialista de I Grado en Laboratorio Clínico. Jefe de la Sección de Laboratorio del Centro de Atención al Diabético.

² Licenciado en Bioquímica. Departamento de Inmunología de la Diabetes. Instituto Nacional de Endocrinología.

plazo para evitar con su control el desarrollo de complicaciones propias de la enfermedad.³

Los métodos más efectivos empleados en la actualidad para la detección de PFGA son los inmunoquímicos, entre ellos los ensayos inmunoenzimáticos para la detección en líquidos corporales⁴ y las inmunofluorescencias indirectas para estudios de tejidos.⁵

Éstos emplean anticuerpos policlonales obtenidos en conejos inmunizados con PFGA de proteínas como ribonucleasa, colágena y albúmina bovina. En todos estos casos se necesita el aislamiento de los péptidos que contienen a los PFGA. El método que se ha reportado como el más adecuado es la cromatografía de afinidad con matriz de lisozima (CAML) que se basa en la afinidad que tiene esta enzima para unirse a los PFGA.⁶

Éste ha sido empleado, tanto como un método de aislamiento y purificación como para detectar y cuantificar PFGA en líquidos corporales.

Con este trabajo nos propusimos evaluar la capacidad de la CAML, para aislar PFGA de mezclas de albúmina incubada con glucosa (AG) y sin ella (ASG) que contengan PFGA presentes o no, respectivamente, con el propósito de valorar su utilidad en la producción del inmunógeno y en los métodos de testaje de anticuerpos anti PFGA.

MÉTODOS

MEZCLA ALBÚMINA-GLUCOSA

Incubamos a 37 °C, en condiciones de esterilidad y oscuridad, una mezcla de 0,5 M de glucosa y 50 g/mL de albúmina bovina

en tampón fosfato 0,2 M (PBS) a pH 7,4 y otra que sólo contenía albúmina bovina en PBS por 6 sem.

Terminado este tiempo dializamos 3 veces ambas mezclas en PBS, en proporciones de 1/200 toda la noche y hallamos la concentración final de proteínas por el método del *biuret*. Determinamos además la fluorescencia en las longitudes de onda de 370/440 nm en espectrofluorímetro Shimatzu modelo RF-540. Verificamos el cambio de coloración de las mezclas en todo el tiempo que duró el experimento.

COLUMNA DE AFINIDAD CON MATRIZ DE LISOZIMA

Realizamos el acoplamiento de la lisozima en el gel Sepharosa 4B activado con CNBr (Pharmacia, LKB) según el método descrito por sus fabricantes.⁸ El rendimiento del acoplamiento fue del 90 %. Montamos una columna de 2 mL de volumen de cama que se estabilizó con PBS.

CORRIDA CROMATOGRÁFICA

Depositamos en la superficie del gel 0,5 mL de la mezcla AG a 6 mg/mL en PBS. Hicimos lavados extensivos de la matriz con PBS en flujo regulado a 0,5 mL/min. Recogimos fracciones de 0,5 mL en colector de fracciones FRAC-100.

Empleamos NaOH 0,1 N como tampón de elución para los PFGA. A cada fracción le determinamos la absorbancia a 280 nm en espectrofotómetro Spectronic 21 D contra blanco PBS. Graficamos los valores obtenidos en una computadora empleando el programa graficador HG.

RESULTADOS

CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON MATRIZ DE LISOZIMA

OBTENCIÓN DE LOS PFGA

Para obtener PFGA, incubamos una mezcla de AG y otra de ASG como control. En la misma se evidenció la cinética de la formación por la presencia de los PFGA fluorescentes en las longitudes de onda de 370/440 nm y el cambio de coloración de las mezclas. La mezcla de AG mostró una coloración amarillo-marrón y su fluorescencia fue mayor que la mezcla ASG (tabla).

Montamos las mezclas de AG y ASG en la CAML, por separado. A las fracciones eluidas les determinamos la densidad óptica a 280 nm. Las fracciones eluidas con PBS de la mezcla AG mostraron menores densidades ópticas que las mezclas ASG y las fracciones siguientes que se eluyeron con NaOH 0,1 N de la mezcla AG mostraron un área bajo la curva mayor que la mezcla ASG (fig.).

TABLA. Fluorescencia (en unidades arbitrarias) y coloración de las mezclas incubadas 6 sem a 37 °C, en oscuridad y esterilidad

Mezclas	Color	Al inicio	6 sem después	
		Fluorescencia	Color	Fluorescencia
Albúmina con glucosa	Incolora	27,0	Amarillo-marrón	346,8
Albúmina sin glucosa	Incolora	26,0	Incolora	46,25

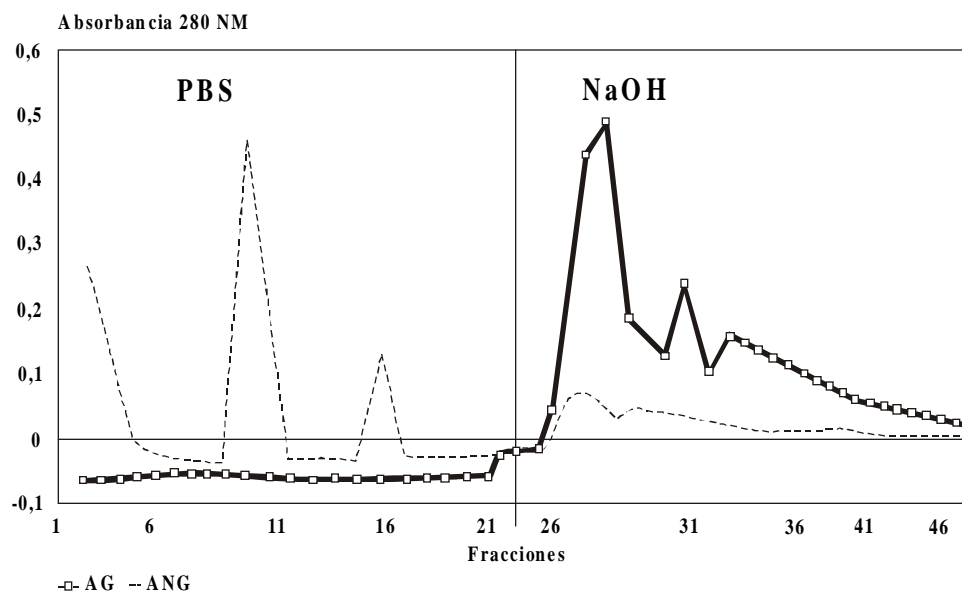


FIG. Cromatograma de las mezclas AG y ANG a 280 nm.

DISCUSIÓN

La importancia de la determinación de los PFGA en las complicaciones de la DM es aceptada en la actualidad por la mayoría de los autores. La CAML se ha estudiado para el aislamiento de los PFGA del suero y como método analítico para su cuantificación. En nuestro trabajo no analizamos la presencia de los PFGA en cada fracción que eluyó de la columna por carecer de PFGA marcado con isótopos radiactivos, sin embargo, las densidades ópticas a 280 nm de las fracciones describieron una figura muy similar a las presentadas en otros estudios que emplearon PFGA marcados con yodo radiactivo.^{6,9} La presencia de estos picos nos indica que nuestra columna CAML, fue capaz de retener los péptidos que contenían PFGA. Estos péptidos-PFGA pudieran ser empleados en la elaboración de inmunógenos para producir anticuerpos

policlonales de los métodos inmunológicos (ELISA ó RIA) de detección. La detección de PFGA en suero, plasma y tejidos del paciente diabético pudiera servirnos como un indicador del estado metabólico a largo plazo y como un predictor de complicaciones de la diabetes. Esto puede ayudar a tomar conductas terapéuticas para su prevención. Igualmente las CAML, pudieran servirnos para el análisis de alimentos y de tabaco que contienen PFGA para regular su consumo en los diabéticos.

En conclusión, la CAML es un método eficaz para aislar los PFGA de una mezcla de albúmina glucosilada que puede servir para elaborar métodos inmunológicos de detección. Con la lectura de las densidades ópticas a 280 nm se puede demostrar la presencia de los péptidos con PFGA que eluyen con NaOH 0,1 N y con el empleo de patrones con concentración conocida la CAML pudiera emplearse para cuantificar PFGA en mezclas de proteínas, en suero humano y en alimentos.

SUMMARY

A procedure to obtain advanced glycosylation end products starting from a mix of albumin that had been glycosylated and incubated at 37 °C under conditions of sterility, darkness and in the presence of glucose for 6 weeks was described. Affinity chromatography with a matrix of lysozyme was used to isolate the glycosylated peptides that eluted with sodium hydroxide 0,1 N. It was determined the optic density of each fraction at 280 nm. It was observed that eluted fractions of the mix of albumin and glucose described a curve with a higher area than the mix of albumin without glucose. This fact coincided with what is stated in other papers. It was concluded that affinity chromatography with a matrix of lysozyme is an efficient method to isolate the advanced glycosylation end products. It was suggested that these products could be used to prepare immunochemical methods of detection in blood, tissues or other body fluids. The readings of the optic densities were useful to show the glycosylated peptides that eluted.

Subject headings: GLYCOSYLATION END PRODUCTS, ADVANCED/isolation and purification; CHROMATOGRAPHY, AFFINITY/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vlassara H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complication. *Diabetes* 1997;46(Suppl 2):s19-s25.

2. Burssenwenger P, Moore I, Curphey T. Relation of glycemic control collagen-linked advanced glycation end products in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1993;16:689-94.
3. Cohen MP, Ziyadeh FN. Role of Amadori-modified nonenzimatically glycosylated serum proteins in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:183-90.
4. Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bukala R. Immunochemical detection of glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 1992;267:5133-8.
5. Bucala R, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis* 1995;26:895-8.
6. Mitsuhashi T, Li Y, Fishbane S, Vlassara H. Depletion of reactive advanced glycation end products from diabetic uremic sera using a lysozyme-linked matrix. *J Clin Invest* 1997;100:847-54.
7. Wrobel K, Garay-Sevilla M, Nava L, Malacara J. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on line spectrophotometric and spectrofluorimetric detection in a flow system. *Clin Chem* 1997;43:1563-9.
8. Kohn J, Wilchek M. A colorimetric method for monitoring activation of Sepharose by cyanogen bromide. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;84:7-14.
9. Korchinski T, Jiang-He C, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Bueting C, et al. Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6474-9.

Recibido: 7 de enero de 2000. Aprobado: 9 de marzo de 2000.

Dr. *Manuel Ayra Rivas*. Instituto Nacional de Endocrinología. Centro de Atención al Diabético, Calle 17 No. 505 entre D y E, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.