

Abordaje metabolómico del N-glicoma como herramienta para predecir DM2 y sus complicaciones

Martínez Cano Emmanuel¹, Saldívar Barajas Dominic Yaret², Fuerte Aguilar Ana Pamela³, García Olivares José Javier³, Figueroa Vega Nicté Guadalupe¹, Reyes Martínez Juana Elizabeth².

¹ Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Salud. Departamento de Ciencias Médicas, Campus León, Col. Obregón, 37320; León, Gto.

² Universidad de Guanajuato, División de Ciencias Naturales y Exactas. Sede Noria Alta, Col. Noria Alta, S/N, C.P.: 36050; Guanajuato, Gto.

³ Universidad de Guanajuato, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías. Campus Celaya-Salvatierra, Av. Ing. Javier Barros Sierra #201 Ejido Santa María del Refugio, C.P.: 38110; Celaya, Gto.

Resumen

La N-glicosilación, que es un proceso bioquímico enzimático, en el cual se adicionan carbohidratos al grupo amino libre de un residuo de asparagina en una secuencia consenso. Esta modificación postraduccional es una de las alteraciones tempranas inducidas por el descontrol de la hiperglucemia. La importancia del estudio de la N-glicosilación y su relación con complicaciones micro- y macrovasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) se fundamenta por la alta tasa de mexicanos con prevalencia de DMT2, además de las complicaciones de alta mortalidad y morbilidad en la población, por ello, urgen perspectivas novedosas para la identificación anticipada de los factores que intervienen en el deterioro mediante la implementación de patrones de N-glicanos, estableciendo una huella química del N-glicoma a través del uso de librerías, y además su relación con las enfermedades subsecuentes como enfermedades cardiovasculares, renales y oculares.

Palabras clave: Diabetes mellitus tipo 2, N-glicosilación, glicanos

Introducción

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica genéticamente determinada que se caracteriza por una ausencia absoluta o relativa de la insulina, hiperglicemia y trastorno en el metabolismo de carbohidratos, proteínas, lípidos y minerales. Es una enfermedad sistémica, degenerativa, incurable, de etiología desconocida [1]. La diabetes mellitus de tipo 2, se caracteriza por ser un síndrome heterogéneo de etiología multifactorial con alteraciones endocrinas metabólicas complejas. Por ello, la búsqueda de patrones moleculares que permitan identificar correlación entre los N-glicanos y la forma en la que se presenta la enfermedad, proporcionarían un método diagnóstico más eficaz para su temprana detección.

El estudio de las modificaciones postraduccionales ha tomado auge por su papel en el desarrollo de enfermedades metabólicas. Un ejemplo es la N-glicosilación, que es un proceso bioquímico enzimático, en el cual se adicionan carbohidratos al grupo amino libre de un residuo de asparagina en una secuencia consenso. Esta modificación postraduccional es una de las alteraciones tempranas inducidas por el descontrol de la hiperglucemia. La importancia del estudio de la N-glicosilación y su relación con complicaciones micro- y macrovasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 se fundamenta porque:

- 1) México tiene una alta prevalencia de DMT2 donde la mayoría de estos pacientes tienen un control deficiente de la enfermedad y como consecuencia las tasas de complicaciones son elevadas en riñón, ojos y sistema cardiovascular.
- 2) Las complicaciones tienen alta mortalidad y morbilidad en la población y urgen perspectivas novedosas para la identificación anticipada de los factores que intervienen en el deterioro micro- y macrovascular.
- 3) El estudio de la N-glicosilación en pacientes con DMT2 permitirá identificar patrones de N-glicanos y establecer la huella química del N-glicoma a través del uso de librerías, y además su relación con las complicaciones.
- 4) Construir modelos de predicción y/o seguimiento.

La síntesis de N-glicanos puede alterarse fácilmente por condiciones fisiopatológicas como enfermedades inflamatorias y autoinmunes y en el proceso fisiopatológico de envejecimiento. En consecuencia, las alteraciones de los glicanos relacionadas con la glucosa podrían ser relevantes para comprender los complejos cambios fisiológicos en el síndrome metabólico y la diabetes mellitus [2]. Por lo tanto, se busca determinar los cambios de N-glicoma en las glicoproteínas séricas en una gran cohorte de sujetos sanos y pacientes con diabetes tipo 2.

Materiales y recursos

- 120 juegos de copias, cada juego incluye: Consentimiento informado, cuestionario, escala de MICHIGAN.
- 50 lápices.
- 20 plumas.
- 2 computadoras.
- 2 básculas Tanita.
- Cinta métrica lukfin.
- Estadímetro SECA.
- Lancetas accu check 150 lancetas.
- Tiras reactivas accu check 150 tiras.

El Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato, campus León, cuenta con la siguiente infraestructura:

Laboratorio Clínico: equipado con espectrofotómetro, autoanalizador de química húmeda, centrífuga refrigerada, microscopio de luz blanca, congelador de -20°C , espectrofotómetro.

Laboratorio de Inmunología y Unidad de Citometría de Flujo: El laboratorio cuenta con cuarto de cultivo, microscopio, campana de flujo laminar vertical, baños, incubador, termociclador en tiempo real para placa, centrífuga refrigerada, microcentrífuga refrigerada, ultracongelador, congelador y refrigerador, cámaras de electroforesis horizontal y vertical, cuantificador de ácidos Nucleicos. La Unidad de Citometría está equipada con un citómetro FACSCanto II de 3 láseres (azul, rojo y violeta) con el aditamento High Throughput Sampler Option Innovation with Impact (lector en placa), y el equipo de cómputo con el software FACSDiva.

Unidad de Espectrometría de masas: cuenta con un equipo de UPLC/UHPLC/HPLC acoplado a un detector de espectrometría de masas marca Waters (LC-MS) con un rango de 25-1250 Da.

Método

Pacientes

Se registraron en el estudio a 90 pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (47.34 ± 7.623 años) y 67 sujetos de control sanos (37.9 ± 7.504 años). El N-glicoma se evaluó en glicoproteínas séricas.

Obtención de muestras

Se obtuvo muestra sanguínea para detectar los niveles de glucosa en ayuno, HbA1c, perfil de lípidos, creatinina, e insulina. En la primera orina de la mañana se determinará la creatinina horaria y microalbuminuria. Recolectada con las medidas sanitarias adecuadas y etiquetadas con un número de identificación y nombre, así mismo, se les brindo a los voluntarios la información correspondiente a los cuidados posteriores a la toma, además se les realizó un historial clínico con el fin de recabar la información necesaria para el experimento. Las muestras fueron transportadas al laboratorio para su almacenamiento, en contenedores especiales a una temperatura de 4 C.

Pruebas de laboratorio

Las concentraciones en sangre, perfil lipídico, triglicéridos, creatinina, glucosa en ayunas, HbA1c, y TFG se midieron mediante procedimientos estándar y se registraron en la base de datos.

Identificación de N-glicanos

Se cuantificaron los N-glicanos en proteínas plasmáticas utilizando el kit GlycoWorks RapiFluor-MS N-Glycan, previo al análisis por LC-MS, se realizó la desglicosilación utilizando enzimas diseñadas para dicho fin (PNGase F). A 7.5 μ L de la matriz biológica, se adiciono 7,5 μ l de solución de glicoproteína con una concentración de 2 mg/ml.

Posteriormente, se añadió 1 o 2 μ L de GlycoWorks Rapid PNGase F mezclando hasta homogenizar. En seguida se adicionaron 12 μ L de la Solución de Reactivo RapiFluor-MS a la mezcla. Se acondicionaron los pozos de una placa GlycoWorks HILIC μ Elution con 200 μ l de agua por pozo y se equilibraron añadiendo 200 μ l de agua/acetronitrilo 15:85. Finalmente, los glicanos eluidos se diluyeron con 310 μ l de diluyente de muestra GlycoWorks-DMF/ACN antes del proceso cromatógrafo HILIC.

En un tubo de 1 mL se le adicionaron 15.3 μ L de agua, 7.5 μ L de la solución de glicoproteínas con una concentración de 2 mg/mL, más 6 μ L de la solución tamponada que contiene RapiGest SF al 5 % (p/v). Se mezclaron hasta homogenizar, una vez homogenizada se calentó a 90 °C por 3 minutos, se enfrió a temperatura ambiente aproximadamente en 3 minutos. Posteriormente se le adiciono 1.2 μ L la solución

GlycoWorks Rapid PNGase F, se mezcló hasta homogenización y se calentó a 50 °C durante 5 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 3 min. Se disolvió 23 mg de GlycoWorks Rapifluor-MS en 335 µL de DMF anhidro y se tomó 12 µL de esta solución a la mezcla de desglicosilación previamente preparada. Se dejó atemperar por 5 min. Transcurrido el tiempo se diluyó con 358 µL de ACN.

Se acondicionaron los pozos de una placa GlycoWorks HILIC microElution con 200 µL de agua por pozo, para equilibrar los pozos se añadieron 200 µL agua/acetoneitrilo con una relación 15:85, en seguida se cargaron 400 µL de muestra diluida en acetoneitrilo, y en seguida se lavó cada pozo dos veces con ~600 µL de ácido fórmico/agua/ acetoneitrilo. 1:9:90 (v/v/v). Los glicanos se eluyeron con tres volúmenes ~30 µL de tampón de elución (acetato de amonio 200mM en acetoneitrilo al 5 %).

Finalmente, los glicanos eluidos se diluyeron con 310 µL de diluyente de muestra GlycoWorks-DMF/ACN antes de la inyección en el LC-MS utilizando columna HILIC.

Desecho de las muestras biológicas

Una vez se realizaron los análisis correspondientes, se procedió a desechar las muestras recolectadas en base a la norma **NOM-087-ECOL-1995**, la cual establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica.

Resultados

Tabla 1. Características clínicas de los grupo de estudio

Variable	Sujetos de control	Pacientes con DM2	T student test	P - value
Edad (Años)	37.9 ± 7.504	47.34 ± 7.623	7.733	<0.0001
IMC (Kg/m ²)	23.76 ± 2.204	29.22 ± 4.388	9.346	<0.0001
Peso (Kg)	62.43 ± 10.12	72.94 ± 12.97	5.503	<0.0001
Masa grasa (%)	25.89 ± 7.608	35.51 ± 7.967	7.623	<0.0001
Masa músculo (%)	43.89 ± 8.431	44.46 ± 8.21	0.4223	0.6734

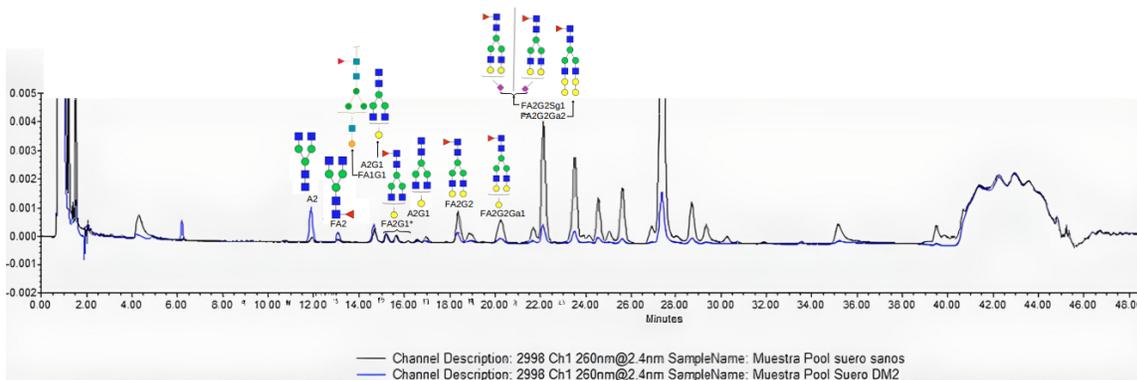
Agua Corporal (%)	51.8 ± 5.706	44.44 ± 6.795	7.177	<0.0001
Cintura (Cm)	81.51 ± 7.088	95.23 ± 10.8	9.034	<0.0001
Cadera (Cm)	96.57 ± 5.467	102.8 ± 8.942	5.053	<0.0001
Cuello (Cm)	35.06 ± 3.033	36.9 ± 3.095	3.701	0.0003
TA (mmHg)	84.08 ± 6.798	87.79 ± 12.32	2.226	0.0275
Sarcopenia	39.61 ± 31.85	24.72 ± 25.23	3.258	0.0014
Tiempo dx (años de evolución)	—	3.335 ± 3.521	—	—
Glucosa (mg/dl)	85.96 ± 9.09	162.2 ± 76.44	8.117	<0.0001
Hb1Ac (%)	5.612 ± 0.6029	7.284 ± 1.736	7.543	<0.0001
Colesterol (mg/dl)	182.9 ± 31.97	197.7 ± 45.65	2.266	0.0249
HDL (mg/dl)	44.75 ± 10.73	41.3 ± 9.698	2.097	0.0377
No-HDL (mg/dl)	138.1 ± 31.62	156.4 ± 45.86	2.792	0.0059
LDL (mg/dl)	116.6 ± 25.78	120.2 ± 39.92	0.6391	0.5237
VLDL	21.51 ± 16.71	34.44 ± 23.62	3.823	0.0002

Triglicéridos (mg/dl)	107.6 ± 83.46	174.2 ± 117.4	3.95	0.0001
Creatinina (mg/dl)	0.9179 ± 0.1914	0.8685 ± 0.2264	1.439	0.1522
microAlbuminuria (mg/ul)	17.83 ± 10.75	23.18 ± 25.42	1.594	0.113
Índice albumina/creatinina	10.19 ± 12.05	21.6 ± 32.07	2.692	0.0079
Estimado de filtración glomerular	83.12. ± 18.90	83.68. ± 16.46	0.1973	0.8439

*Desglose de resultados pertenecientes al análisis estadístico de las pruebas de laboratorio de los pacientes sanos y con DM2.

Las muestras de los sujetos participantes se sometieron a un análisis de espectrometría de masas y se contrastaron los sueros de ambas muestras con la librería estándar RapiFluor.MS N-glycan de Waters Corporation la cual incluye las masas (m/z) y iones para determinados N-glicanos. En consecuencia, se obtuvo un cromatograma (Fig. 1) en el cual se presenta el perfil de expresión de N-glicanos en pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 en contraste con el espectro correspondiente a los sujetos control, pacientes aparentemente sanos. En consecuencia, se observa que el patrón de los picos pertenecientes a los N-glicanos presenta diferencias en ambas poblaciones, ya sea que en pacientes con DM2 su perfil de expresión sea mayor que en pacientes sanos; por ejemplo, los N-glicanos A2, FA2G2, FA2G2Ga1, FA2G2Sg1 (nomenclatura Oxford), por mencionar algunos, y viceversa como puede observarse en la siguiente figura.

Fig. 1 Comparación del perfil de expresión de N-glicanos en muestras de pacientes sanos y con DM2



Una vez obtenidos los resultados controles de los sujetos de prueba se examinó el perfil de N-glicoma en el cromatograma (fig. 1) generado a partir del suero de las 157 muestras de sujetos diagnosticados con DM2 y sujetos sanos contrastado con el espectro estándar del espectrómetro de masas para poder conocer cuáles de los N-glicanos del estándar se encontraron en las muestras, tabulando los resultados en la siguiente tabla:

Tabla 2. Distribución del perfil de expresión de N-glicanos en cromatogramas de HPLC-MS con muestras de sujetos sanos y pacientes con DM2.

N-Glicano	Sujetos Sanos	Pacientes con DM2
A2	↓	↑
FA2	↓	↑
A2G1	↓	↑
F(6)A2[6]G(4)1	=	=
F(6)A2[3]G(4)1	=	=
FA2G2	↑	↓
FA2G2Ga1	↑	↓
FA2G2Ga2	↑	↓
FA2G2Sg1	↑	↓

**(↑) perfil de expresión aumentado, (↓) perfil de expresión disminuido, (=) perfil de expresión igualado.*

Tabla 3. Identificación de los N-glicanos a través de los iones y tiempos de retención.

Tiempo de retención (min)	Iones (m/z)	Glicanos (nomenclatura oxford)	Sujetos sanos	Pacientes con DM2

10.768	814.88	NI	NO	SÍ
10.817	814.83	A2	SÍ	SÍ
11.872	888.88 899.17	NI	SÍ	NO
11.878	887.8	NI	SÍ	NO
11.917	679.87 888.49 916.95	NI	SÍ	NO
11.937	814.83	NI	SÍ	NO
11.94	887.8 887.7	FA2	SÍ	SÍ
13.05	990.04	NI	SÍ	NO
13.081	989.91 989.4	FA2B	SÍ	NO
13.517	867.3	FA1G1	SÍ	NO
13.93	895.86	A2G1	NO	SÍ
14.74	968.89	FA2G1	SÍ	SÍ
15	895.86	NI	SÍ	NO
15.21	976.89	A2G2	SÍ	SÍ
15.607	679.89 1070.43	FA2BG1	SÍ	NO

	1071.2			
18.389	1050.58	NI	SÍ	NO
18.42	1049.91	FA2G2	SÍ	SÍ
19.068	1223.27	NI	NO	SÍ
20.184	679.68 772.86 1115 1216.6	NI	SÍ	NO
20.6	743.8 763.32 1021.92 1114.91 1143.96	NI	SÍ	NO
21.666	811.55	NI	SÍ	NO
22.1	1030.94	FA2Ga1	SÍ	SÍ
22.15	1128.3 1128.08 1128.1	NI	SÍ	SÍ
22.818	1122.79 1122.99 1123.08 1123.37 1123.66	NI	SÍ	SÍ

	1123.93 1124.12			
23.54	1195.4 1195.93 1196.01 1196.3 1196.35	FA2G2S1	SÍ	SÍ
23.615	679.84 846.17	NI	NO	SÍ
23.64	1196.09 1196.7	NI	SÍ	SÍ
24.5	846.36 866.22	NI	SÍ	SÍ
24.519	865.07 865.57	FA2BG2S1	NO	SÍ
25.59	1203.46	FA2G2Sg1	SÍ	SÍ
25.63	846.36	NI	SÍ	NO
25.84	1211.97	FA2G2Ga2	SÍ	SÍ
25.9	846.28 846.41	NI	SÍ	SÍ
27.321	846.26 846.36 846.41	NI	SÍ	SÍ

28.753	895.09	NI	NO	SÍ
29.436	962.43 962.72	FA2BG2S2	NO	SÍ
29.8	1065.38 1065.49 1072.22	NI	SÍ	SÍ
30.81	723.14 1120.67	NI	NO	SÍ
35.1	679.8 1064.8 1065.63 1070.85 1071	NI	SÍ	SÍ
36.543	679.81	NI	SÍ	NO
39.9	1066 1111.9	NI	SÍ	NO
40.988	1181.19	NI	NO	SÍ
45.5	546.54 546.62 591.66 678.91 722.82 722.87	NI	NO	SÍ

	810.88			
--	--------	--	--	--

*(NI) *Glicano no identificado con respecto al tiempo de retención.*

Softwares y bases de datos

- Gyts
- Glycoworkbench
- GraphPad Prism versión 10.0.0

Discusión

Una vez que se obtuvieron los espectros y se cotejaron los tiempos de retención para la identificación de los N-glicanos presentes con el apoyo la base de datos (*Glycoworkbench*), de los cuales 15 picos espectrales correspondieron a los siguientes glicanos: A2, FA2, FA2B, FA1G1, A2G1, FA2G1, A2G2, FA2BG1, FA2G2, FA2Ga1, FA2G2S1, FA2BG2S1, FA2G2Sg1, FA2G2Ga2, FA2BG2S2.

La presencia o ausencia de estos N-glicanos en los pacientes sanos y con DMT2, abre un parámetro para la detección temprana la diabetes mellitus tipo 2, pero es necesario un abordaje más profundo con un mayor número de sujetos de prueba y bases de datos más completas para presentar un diagnóstico certero ante dicha enfermedad, al ser un modelo relativamente nuevo en el área de valoración diagnóstica de pacientes con enfermedades metabólicas.

Conclusiones

En conclusión, el perfil de los N-glicanos de pacientes con DMT2 y pacientes sanos, presentan cambios relativamente significativos, evidenciando las alteraciones en la biosíntesis de estos compuestos al presentar la enfermedad. Donde con un enfoque dirigido, esta técnica puede ser usada en el método diagnóstico ante el tratamiento a la DMT2 y medir su eficacia.

Bibliografía/Referencias

- 1- Cárdenas, S., Contreras, A., & Melguizo, I. (2000). Fisiopatología de la Diabetes Tipo 2. Revisión del tema. *Medicina UPB*, 19(2), 169-178.
- 2- Testa, R., Vanhooren, V., Bonfigli, A. R., Boemi, M., Olivieri, F., Ceriello, A., ... Franceschi, C. (2015). N-Glycomic Changes in Serum Proteins in Type 2

Diabetes Mellitus Correlate with Complications and with Metabolic Syndrome Parameters. PLOS ONE, 10(3), e0119983.

- 3- Wittenbecher, C., Štambuk, T., Kuxhaus, O., Rudman, N., Vučković, F., Štambuk, J., ... Lauc, G. (2020). Plasma N-Glycans as Emerging Biomarkers of Cardiometabolic Risk: A Prospective Investigation in the EPIC-Potsdam Cohort Study. *Diabetes Care*, dc191507. doi:10.2337/dc19-1507
- 4- Chatterjee, B., Thakur, S.S. Investigation of post-translational modifications in type 2 diabetes. *Clin Proteom* 15, 32 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12014-018-9208-y>
- 5) Singh, S. S., Naber, A., Dotz, V., Schoep, E., Memarian, E., Sliker, R. C., ... van Hoek, M. (2020). Metformin and statin use associate with plasma protein N-glycosylation in people with type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(1), e001230. doi:10.1136/bmjdr-2020-001230