

# Valoración de Hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>) y la constante de unión de glucosa en pacientes diabéticos

REYNALDO EMILIO POLO L., Ph.D.<sup>(1)</sup>

LEOBARDO SUAREZ R., M.D.<sup>(2)</sup>

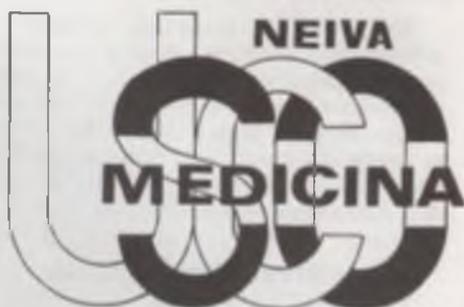
BLANCA MARIA LARA S.<sup>(3)</sup>

## INTRODUCCION

En los últimos dos decenios, han aparecido en la literatura estudios orientados a establecer cuál es el significado real de las fracciones menores de la hemoglobina en la valoración de las perturbaciones del metabolismo, de los carbohidratos en el organismo y cuál es el mecanismo fisiológico de la compensación de este parámetro clínico en enfermos diabéticos.<sup>1</sup>

La electroforesis en láminas de acetato de celulosa a pH por encima de 7.4 permite la separación de hemoglobinas presentes en una muestra de sangre en un individuo adulto. El patrón electroforético más frecuente en nuestro medio es aquel en el cual aparecen como bandas principales, las correspondientes a las hemoglobinas A, F, S y A<sub>2</sub>.<sup>2</sup> Las bandas que se obtienen por este método electroforético corresponden cada una, a una mezcla de proteínas.

Estas se pueden separar teniendo en cuenta otras de sus propiedades fisicoquímicas, para ello es necesario emplear métodos con un mayor índice de resolución. Técnicas modernas como el isoelectroenfoco permiten la obtención de las denominadas fracciones menores de la hemoglobina, grupo al cual pertenece la HbA<sub>1c</sub>, que es la forma más aceptable de una variedad glucosilada de la hemoglobina.<sup>3</sup>



(1) Profesor Titular, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

(2) Especialista en Endocrinología, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

(3) Licenciada en Enfermería, Departamento de Enfermería, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia.

Debido a la importancia clínica que tiene la HbA<sub>1c</sub>, se han normalizado métodos cromatográficos y colorimétricos, para medir los niveles sanguíneos de esta fracción proteica. Esta importancia está relacionada con el hecho de que el proceso de glucosilación de la hemoglobina, tiene que ver con los niveles de glucosa sanguínea presentes en el individuo durante los 2-3 meses previos a la determinación de HbA<sub>1c</sub>, es decir, durante el período de vida de eritrocito<sup>1</sup>. Se ha encontrado que en enfermos de diabetes insulino-dependiente no controlada el valor para este parámetro clínico es de  $8.44 \pm 1.12$ , mientras que en los diabéticos de tipo II no controlados el nivel sanguíneo es de  $6.29 \pm 0.66$ . Además de esto se ha demostrado que una buena compensación de la diabetes sacarínica produce una disminución de los niveles de HbA<sub>1c</sub> independientemente del carácter de la terapia, hasta alcanzar un valor de  $3.94 \pm 0.13$ <sup>5</sup>. Esto ha permitido establecer que la medición de este parámetro se puede emplear como criterio para valorar el estado de gravedad en que se encuentra un paciente diabético. Por esta razón, este parámetro de valoración se introdujo en los establecimientos de sanidad en varios países.<sup>6</sup>

Se ha encontrado niveles máximos de HbA<sub>1c</sub> en pacientes diabéticos con infecciones de diversa etiología y en estado cetoacidótico grave, según parece, la formación excesiva de HbA<sub>1c</sub> es una respuesta del organismo a la hiperglicemia y no depende de las particularidades genéticas de algunas clases de diabetes<sup>4</sup>. El fortalecimiento del proceso de glucosilación tiene como fin disminuir los niveles de glucosa sanguínea libre en un proceso de carácter compensatorio.

El establecimiento de la probabilidad de la glucosilación de la HbA permitió suponer que la glucosa puede unirse con otro tipo de proteínas sanguíneas. Esto ha permitido introducir nuevos métodos para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes sacarínica y actualmente en los servicios de salud de muchos países se emplea como parámetro, la determinación cuantitativa de proteínas séricas que tienen afinidad por la glucosa.<sup>3</sup>



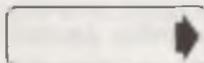
A comienzos de la última década un grupo de investigadores búlgaros introdujo un nuevo concepto que permite valorar el estado metabólico de la glucosa en un individuo. Este parámetro mide la relación que hay entre los niveles totales de glucosa sanguínea y la glucosa unida a proteínas. Ha sido demostrado que este coeficiente es constante para cada individuo y por ello este parámetro se denomina LA CONSTANTE DE UNIÓN DE GLUCOSA. En individuos sanos, con poca predisposición a la diabetes, este coeficiente tiene un valor por debajo de 4.5, mientras que los diabéticos y las personas con alta predisponibilidad a esta enfermedad tienen una constante por encima de este valor.

Con el fin de introducir en nuestro país métodos más confiables para la valoración del estado patológico de diabéticos, se normalizaron técnicas para la determinación cuantitativa de HbA<sub>1c</sub> y para el cálculo de la constante de unión de glucosa en el laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Surcolombiana.

#### MATERIALES Y METODOS

Se estudió un pequeño grupo de 18 pacientes pertenecientes a la Asociación Hullense de Diabéticos. El grupo estuvo conformado por individuos residentes en la ciudad de Neiva. En su mayoría eran mujeres que presentaron cuadros clínicos de diabetes sacarínica no insulino dependiente. Aproximadamente la mitad del grupo presentó complicaciones de diversa etiología como se observa en la Tabla 1.

Para la determinación de HbA<sub>1c</sub> se empleó sangre oxalata y la cuantificación se hizo por un método colorimétrico, el cual se basa en la propiedad que tiene el 5-hidroximetilfurfural de formar un complejo coloreado con el ácido tiobarbitúrico. La absorbancia medida a 443 nm. para este complejo, está directamente relacionada con los niveles sanguíneos de la forma



cetoamínica estable de la hemoglobina glucosilada denominada  $HbA_{1c}^2$ .

Los pasos que se siguieron para el análisis cuantitativo de  $HbA_{1c}$  fueron los siguientes:

A. Preparación del hemolizado

B. Diálisis

C. Hidrólisis

D. Sedimentación de proteínas con ácido tricloroacético

E. Formación del complejo coloreado con ácido tlobarbitúrico

F. Determinación de la absorbancia a 443 nm.

Para la determinación de la constante de unión de glucosa se estudió la interacción entre la glucosa sanguínea y una cantidad de glucosa agregada a una muestra de sangre in vitro de acuerdo con un método empleado en Bulgaria<sup>5</sup>. Para ello un volumen de sangre venosa oxalata se dividió en tres volúmenes iguales y cada fracción se colocó en un frasco de penicilina de 10 cc previamente numerado que contenía un volumen de anticoagulantes. En el frasco 2 se vertió un volumen de solución de glucosa de concentración conocida. Posteriormente los tres frascos se incubaron en un baño de agua a 37°C durante una hora. Pasado este tiempo se sedimentaron las proteínas con ácido tricloroacético. De cada frasco se tomó una cantidad igual de sobrenadantes y al obtenido del frasco No. 3 le agregamos una cantidad de glucosa igual a la adicionada al frasco 2 antes de la incubación a 37°C. Posteriormente se determinó colorimétricamente con el reactivo de O-toluidina los niveles de glucosa en cada sobrenadante. Todo el procedimiento hasta aquí descrito aparece esquematizado en la Figura 1.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos para los parámetros estudiados aparecen en la Tabla 1. Como puede verse en este cuadro, los valores de  $HbA_{1c}$  oscilaron entre 2.9% y 11.15% y los de la constante de unión de glucosa entre 1.55 y 10.9.

El análisis de las muestras indicó que el 82% de las personas estudiadas tuvieron una hemoglobina glucosilada por encima de  $3.84 \pm 0.13$  y el 47% tuvieron una constante de unión de glucosa por debajo de 4.5. Tres de los pacientes estudiados tuvieron niveles de  $HbA_{1c}$  dentro del rango normal, de los cuales dos te-

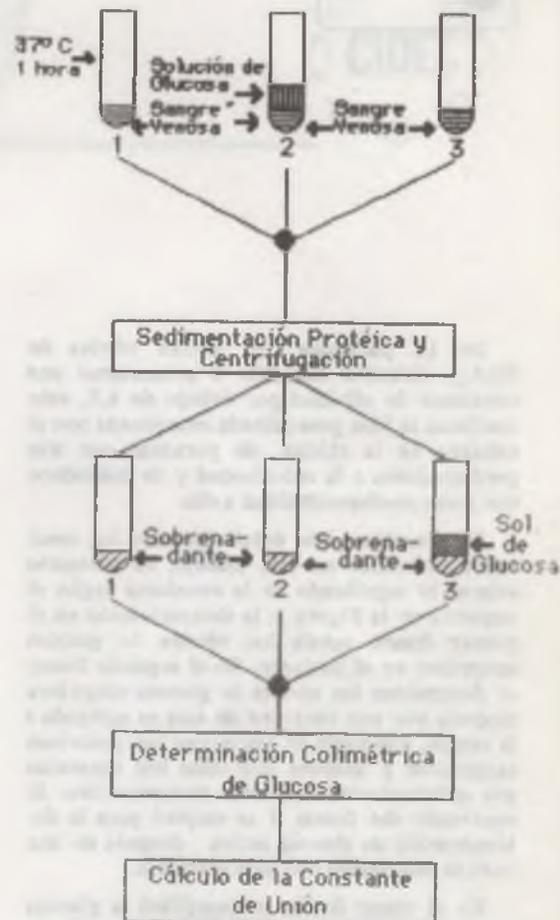
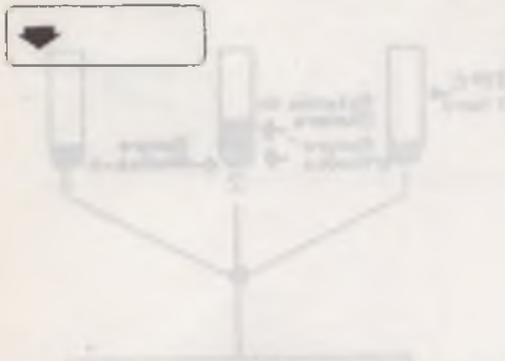


Fig 1 Esquema general del procedimiento empleado para la valoración de la Constante de Unión de Glucosa

nían una constante de afinidad por debajo de 4.5. Debido a que la  $HbA_{1c}$  es un índice de control diabético, se puede decir que los tres pacientes tienen una diabetes controlada, aunque (P.L) tiene más tendencia a mantener niveles de glucosa, por lo tanto su predisposición a ser hiperglucémico es mayor que las otras dos personas y por ende el control terapéutico para ella debe ser más estricto.



De 11 pacientes que tenían niveles de HbA<sub>1c</sub> elevados tan sólo 5 presentaron una constante de afinidad por debajo de 4.5, esto confirma la idea generalizada relacionada con el hallazgo en la clínica, de personas con alta predisposición a la enfermedad y de individuos con poca predisponibilidad a ella.

Para analizar más detalladamente los resultados obtenidos en este trabajo, es necesario aclarar el significado de la constante según el esquema de la Figura 1; la determinación en el primer frasco señala los niveles de glucosa sanguínea en el paciente. En el segundo frasco se determinan los niveles de glucosa sanguínea después que una cantidad de ésta es agregada a la sangre, que parte de ella se une con proteínas sanguíneas y después que éstas son separadas por sedimentación con ácido tricloroacético. El contenido del frasco 2 se empleó para la determinación de glucosa activa después de una hora de sobrecarga con esta sustancia.

En el tercer frasco se cuantificó la glucosa sanguínea después de incubación, separación de proteínas y posterior sobrecarga con glucosa, es decir, se determinó la glucosa total sin la acción de proteínas sanguíneas. La glucosa activa o unida a proteínas se valoró cuantificando la diferencia de los niveles de glucosa entre las pruebas segunda y tercera. Como se deduce en esta técnica hay sólo una unión mecánica entre la glucosa y un grupo de proteínas sanguíneas, las cuales por gozar de esta propiedad han sido denominadas proteínas glucosofílicas. Ha sido propuesto que estas proteínas juegan un papel importante como amortiguadores, no permitiendo variaciones bruscas en la concentración de glucosa sanguínea y de esta forma disminuyen "el esfuerzo" del aparato insulínico preservándolo así de su "agotamiento". Según parece algunas participan en procesos enzimáticos de degradación de glucosa, aunque ellas en sí no son enzimas.

En los diabéticos estudiados por nosotros el 53% tuvo un coeficiente por debajo de 4.5, tres pacientes con complicaciones diversas tuvieron valores por encima de 5. En un 57% de los pacientes en los cuales se midieron los dos parámetros, observamos una buena correlación entre los niveles de HbA<sub>1c</sub> y el valor de la constante.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, difícilmente nos permiten establecer si hay dependencia entre la clínica y la gravedad de la enfermedad y el valor de la constante de unión de glucosa, pero las variaciones en los valores de este nuevo parámetro, nos lleva a concluir que existen factores complementarios de riesgo de complicaciones en los diabéticos que tienen que ver con el mecanismo fisiológico de las denominadas proteínas glucosofílicas.

Los datos experimentales obtenidos por nosotros, nos permiten recomendar la determinación de HbA<sub>1c</sub> en nuestro país en la práctica clínico-diagnóstica de daños funcionales, que tienen que ver con el metabolismo de los carbohidratos en nuestro organismo, con el fin de valorar la gravedad de la enfermedad y para controlarla adecuadamente con una terapia efectiva. De los métodos existentes para medir este parámetro clínico recomendamos el colorimétrico, normalizado por nosotros, el cual tiene las ventajas siguientes: es un método de alta sensibilidad, rápido, el complejo coloreado que se obtiene es muy estable y, lo más importante de todo, es que es un método muy económico y de alta reproducibilidad.

Debido a la muestra tan pequeña y las malas condiciones infra-estructurales de nuestro laboratorio, no podemos hacer generalizaciones relacionadas con la constante de unión de glucosa, simplemente queremos recomendar hacer estudios adicionales, con grandes poblaciones, relacionados con el valor clínico-diagnóstico de las variaciones de este parámetro propuesto por otros grupos de investigación. Por ello consideramos importante introducir esta medición en los establecimientos de sanidad en Colombia, con el fin de hacer estudios estadísticos que muestren qué tipo de dependencia hay entre la clínica, la gravedad de la diabetes sacarina y el valor de este coeficiente.

**TABLA 1. Relación de Hemoglobina Glucosilada (HbA<sub>1c</sub>) y la constante de unión de glucosa en pacientes diabéticos**

Número de orden	Paciente	Sexo	Edad años	HbA <sub>1c</sub> (%)	Constante de unión	Complicaciones
1	A.M.O.	F	13	11.15	7.56	Retinopatía-Nefropatía
2	F.M.V. de V.	F	41	9.41	3.87	Retinopatía-Nefropatía
3	M.L.A.	F	48	8.94	7.38	Retinopatía-Nefropatía
4	U.R. de V.	F	66	4.63	(*)	
5	P. L.	F	54	3.30	6.34	Neuropatía
6	L.S.O.	F	76	7.62	3.06	Neuropatía
7	M.F.G.	F	70	3.55	2.90	Neuropatía
8	I.F.	F	56	7.76	1.55	Arteriopatía-Neuropatía
9	R.F.T.	F	66	(*)	1.80	Arteriopatía-Neuropatía
10	F.V.	F	44	8.76	2.84	Arteriopatía
11	A.C. de V.	F	67	7.50	5.05	Arteriopatía-Neuropatía
12	I.M.G.	F	53	5.52	7.76	Arteriopatía-Neuropatía
13	R.V.	F	22	5.72	10.90	Retinopatía
14	I.M.	F		2.90	2.72	Retinopatía
15	H.F.R.	M	44	5.52	(*)	Retinopatía
16	A.S.	M	53	8.0	5.0	Retinopatía
17	G.C.	M	61	10.1	(*)	Retinopatía
18	H.A.	M	32	6.72	3.40	Retinopatía

(\*) No se hizo

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 BUM HF, Gabbay KH, Gallop PM. *Science* 1978. 200; 21-27.
- 2 FLUCKIGER R., Winterhalter K.H. *FEBS Letters*. 1978. Vol. 71 p.356-360.
- 3 JOHNSON R.N., METCALF P.D., Baker J.R. *Clínica Química Actas* 1983. Vol. 127 p. 87-95.
- 4 KOHNER E.M., Meneschl, F., Cassar J et al *Diabetología* (Berlín), 1980, Bd 19, 5, 21.
- 5 LAZAROV N. *Laboratornoye Diela* Sofía. N.R.B. 1986 a 58-60.
- 6 PAISEY RB, Macfarlane DG., Sherriff RJ., Hartog M., Stade RR, White DAJ. *Diabetologia* 1980; 19: 31-34.
- 7 POLO L., Reynaldo Emilio. *Revista Entorno* No. 1. USCO-CIDEC.
- 8 SCHOOS R., Segoo-Barbette S., Lambotte C. *Clin-Chim. Acta* 1978. Vol. 86. p.81-85.
- 9 WALINDER O., Ranquist G., Eget P.J. *Clinical Chemistry* 1984. Vol. 30. p.1686-1688.

#### GLOSARIO DE TERMINOS

- ELECTROFORESIS.** Técnica empleada en investigación médica para separar compuestos presentes en líquidos biológicos por medio de un campo eléctrico.
- ESTADO CETOACIDOTICO.** Estado crítico, en el cual además de aumentar la acidez hay un incremento en los niveles de cuerpos cetónicos en la sangre.
- FORMA CETOAMINICA DE LA HEMOGLOBINA.** Forma estable de la hemoglobina A<sub>1c</sub> que se emplea en medicina para determinar el estado glucémico en que se ha encontrado un individuo durante 2-3 meses antes de su cuantificación.
- HbA<sub>1c</sub>.** Siglas que se emplean en medicina para denotar una variedad de la hemoglobina denominada GLUCOSILADA, debido a su gran afinidad por la glucosa. También se le representa como gHb.
- PROTEINAS SERICAS.** Hace referencia a las proteínas presentes en el suero sanguíneo.
- SANGRE OXALATADA.** Sangre mezclada con oxalato de amonio, el cual se emplea como anticoagulante.