

## HEMOGLOBINAS GLICOSILATADAS

Dr. Gastón Arévalo L. \*

La hemoglobina presente en los eritrocitos de los sujetos adultos normales es la hemoglobina A. Su estructura química está formada por cuatro cadenas de aminoácidos, dos alfa y dos beta, unidas cada una de ellas a un grupo Hem. que contiene hierro.

Las cadenas alfa tienen un peso molecular de 15.126. Están constituidas por 141 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En sus extremos se encuentra una molécula de Valina en el extremo N - terminal y una molécula de Arginina en el extremo C - terminal. El hierro se une a las cadenas alfa por medio de dos moléculas de Histidina presente en las posiciones 58 y 87.

Las cadenas beta están formadas por 146 aminoácidos presentando una molécula de Valina en el extremo N - terminal y una molécula de Histidina en el extremo C - terminal. Su peso molecular es 15.866.

El hierro se une a la cadena beta a nivel de dos moléculas de Histidina presentes en las posiciones 63 y 92.

En el adulto normal el 98% o algo más de su hemoglobina circulante es hemoglobina A. En cambio, durante la vida fetal sólo entre el 15 y 40% de la hemoglobina es tipo A, siendo el resto del tipo fetal hemoglobina F.

Al final del primer año de vida la hemoglobina A llega a su nivel normal, observándose sólo trazas de hemoglobina F.

La diferenciación de los diversos tipos de hemoglobina normales y anormales se ha logrado por medio de separación electroforética, utilizando gran variedad de buffers y modificando el soporte de la electroforesis, especialmente gel de agar, acetato de celulosa, gel de almidón y originalmente papel.

La velocidad electroforética de los diversos tipos de hemoglobina depende de la disposición de los aminoácidos en las cadenas peptídicas.

La hemoglobina normal del adulto hemoglobina A se identifica en acetato de celulosa por tener la máxima movilidad electroforética, es decir, es la fracción más lejana al punto de aplicación.

---

\* Jefe de la Sección de Endocrinología del Laboratorio Principal - Hospital Universitario de Caracas. Endocrinólogo - Centro Médico de Caracas.

Utilizando electroforesis se ha establecido que la hemoglobina A puede estar formada por tres subfracciones A-1, A-2 y A-3. La fracción A-1 es la más importante y representa el 98% de la hemoglobina normal del adulto.

En 1958 investigadores trabajando con hemoglobina A-1 normal y utilizando cromatografía en columna con resina de intercambio catiónico identificaron tres subfracciones de movimiento rápido en la columna.

Estas subfracciones se mueven con mayor velocidad y son eluidas en los primeros volúmenes, mucho antes que el resto de la hemoglobina A-1. Las subfracciones de movimiento rápido fueron designadas con el nombre de hemoglobinas A-1a, A-1b y A-1c.

En estudios practicados con hemolizado de eritrocitos de adultos normales se estableció que la hemoglobina A-1a representa el 1.6%, la A-1b el 0.8% y la A-1c el 4% del total de la hemoglobina A-1 presente en los eritrocitos.

La hemoglobina A-1c muestra una estructura idéntica a la hemoglobina A-1, salvo que contiene una molécula de glucosa o de glucosa 6 fosfato unida al aminoácido Valina N - terminal de la cadena beta.

En estudios posteriores se demostró que las hemoglobinas A-1a y A-1b también contienen un hidrato de carbono en la misma posición, considerándose pueden ser punto intermedio en la conversión de hemoglobina A-1a en hemoglobina A-1c.

Al conjunto de estas tres subfracciones de movimiento rápido se les ha llamado hemoglobinas glicosiladas (G-HB), por contener una molécula de glucosa unida a su cadena beta.

La incorporación de la glucosa a la molécula de hemoglobina ocurre en forma continua, durante los 120 días de vida del eritrocito. Es un fenómeno lento, casi irreversible, que depende de la concentración de glucosa dentro del eritrocito, la cual es similar a la glucosa plasmática. Como la incorporación de glucosa a la hemoglobina es lenta, la producción de las hemoglobinas glicosiladas es directamente proporcional a la concentración de glucosa promedio en los últimos tres meses.

Las hemoglobinas glicosiladas están aumentadas en casos de diabetes mellitus descontrolada.

Los cambios bruscos del nivel de glucosa plasmática no afectan al porcentaje de hemoglobina glicosilada. La concentración de G-HB regresa a lo normal después de varias semanas de permanecer el paciente diabético bien controlado, con valores de normoglicemia.

#### **METODO:**

La determinación de hemoglobinas glicosiladas se realiza por cromatografía en columna, utilizando una resina de intercambio catiónico en buffer fosfato a pH 6.7.

Una pequeña muestra de sangre total, 7 a 10 microlitros, se hemolisa con agua destilada.

Se aplica la muestra hemolisada en la columna por encima del nivel de la resina y se deja gotear para que la hemoglobina se incorpore a la columna.

Se agrega buffer fosfato pH 6.7 que contiene cianuro de potasio, por encima del nivel de la resina para lograr la elución de las G-HB —fracción rápida—. Se recoge debajo de la columna la totalidad de esta elución y se completa con agua destilada hasta 3 ml. En esta forma se eluyen las tres fracciones de glicohemoglobinas en una sola fracción Hb A-1a+b+c. La diferenciación de las tres fracciones no tiene utilidad clínica, ya que todas están elevadas en pacientes diabéticos descompensados.

Al finalizar la elución de la fracción rápida, se aplica sobre el nivel de la columna el eluyente para el resto de la hemoglobina A-1 que permanece en la columna —fracción lenta—. El eluyente está formado por buffer fosfato pH 6.7 conteniendo cianuro de potasio y solución salina 2 molar.

Se recoge esta fracción totalmente y se lleva el volumen a 15 ml. con agua destilada.

Se lee la densidad óptica del líquido contenido en cada fracción en un espectro fotómetro a 415 nm, ajustando el cero con agua.

La concentración de G-HB se expresa como porcentaje del total de la hemoglobina presente en el hemolisado.

#### **MUESTRA REQUERIDA Y CONDICIONES PARA LA PRUEBA:**

- 1.—El paciente no requiere estar en ayunas. Los resultados no dependen del nivel de glicemia en el momento de tomar la muestra.
- 2.—Se debe usar sangre fresca, tomada con EDTA. La Heparina puede elevar falsamente los resultados.
- 3.—La muestra es estable cinco días refrigerada, entre 2 y 5° C.
- 4.—Controlar los cambios de temperatura en la habitación. Los valores normales están calculados para una temperatura ambiente de 22° C.

#### **VALORES NORMALES:**

Los valores normales de G-HB varían si son valores aislados para cada fracción o si representan la suma de las tres fracciones juntas. Los valores normales promedio para el método son: (G-HB A-1a+b+c)

Sujetos normales:  $6.9 \pm 1.5\%$  (Rango: 3.0 a 8.4%)

Diabéticos descontrolados:  $13.5 \pm 3.0$  (Rango: 10 a 21 %)

#### **APLICACION CLINICA:**

- 1.—Evaluación del grado de control en diabetes mellitus.

Pacientes diabéticos bien controlados con su tratamiento muestran valores de hemoglobina glicosiladas en el mismo rango que los sujetos normales  $7.0 \pm 1.0$ .

En cambio, los pacientes diabéticos con hiperglicemia crónica y claras evidencias de poco control de su enfermedad muestran valores elevados  $13.5 \pm 3.0\%$

Se ha propuesto el método de G-HB como indicador de posibles complicaciones de la diabetes. Valores elevados de G-HB se observan en sujetos propensos a las complicaciones vasculares de la diabetes, ya que en forma general se acepta que las complicaciones están relacionadas a la hiperglicemia crónica y a la elevación de los lípidos, frecuentemente observada en pacientes descontrolados.

- 2.—Para el diagnóstico propiamente de la diabetes subclínica, la determinación de G-HB no ha sido un método de gran valor, ya que los sujetos que muestran glicemia en ayunas normal con postprandial elevada, generalmente tienen un valor normal de G-HB.

Sin embargo, los valores elevados de G-HB confirman el diagnóstico de diabetes en sujetos que presentan un test de tolerancia a la glucosa dudoso. En esta circunstancia, debe mantenerse el diagnóstico de diabetes y proceder al tratamiento adecuado.

- 3.—En casos de anemia hemolítica, el nivel de G-HB es más bajo que lo normal, debido a la menor sobrevivencia de los eritrocitos. En pacientes diabéticos descontrolados de raza negra se han reportado valores normales de G-HB. Estudiando la hemoglobina de estos pacientes se demostró que presentan concentraciones variables de hemoglobinas anormales S y C, las cuales aparentemente no se glicosilatan. Se estima que estas hemoglobinas anormales podrían tener dificultad en unirse a la glucosa, en virtud de que su diferencia estructural con la hemoglobina A-1 radica en modificaciones en la cadena beta, a la cual se une la glucosa.

La hemoglobina S presenta una molécula de Valina en posición 6 sustituyendo al Acido Glutámico de la hemoglobina normal y la hemoglobina C en cambio, tiene una molécula de Lisina en posición 6. En presencia de hemoglobinas anormales, la concentración de G-HB se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{G-HB corregida} = \frac{\text{G-HB obtenida} \times 100}{(100 - \% \text{ de HB anormal})}$$

El valor de G-HB calculado con esta fórmula en pacientes diabéticos descontrolados, que presentan hemoglobinas anormales en sus eritrocitos, es similar al observado en pacientes diabéticos descontrolados con hemoglobina normal.

- 4.—La determinación de G-HB depende de la temperatura del laboratorio. Las determinaciones deben practicarse entre 21 y 24 °C. Una temperatura

superior aumenta el porcentaje y lo contrario en temperaturas bajas. Las modificaciones por la temperatura se pueden corregir usando una tabla establecida para valores normales a diversas temperaturas o usando una sangre control como referencia.

#### REFERENCIAS:

1. RAHBAR, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. Clin. Chim. Acta 22:296, 1968.
2. BUNN H.F., HANCY D.N., KAMIN S., et al: The biosynthesis of human hemoglobin A-1c. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. J. Clin Invest. 57:1652, 1976.
3. KOENING R.J. et al.: Hemoglobin A-1c as an indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. Diabetes 25:230( 1976.
4. GABBAY K. H. et al.: Glycosylated hemoglobins and long - term blood glucose control in diabetes mellitus. J. Clin. Endocr. and Metab. 44:859, 1977.
5. LEV - RAN A Y VANDER LAAN W. P.: Glucohemoglobinas y tolerancia glucosada JAMA en Venezuela 2:423, 1979.
6. ALEYASSINE H.: Low proportions of Glycosylated Hemoglobin associated with Hemoglobin S and Hemoglobin C. Clin. Chem. 25:1484, 1979.