

49
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**ANALISIS BIBLIOGRAFICO SOBRE LOS METODOS
EXISTENTES PARA LA DETERMINACION DE HEMOGLOBINA
GLICOSILADA Y SU IMPORTANCIA CLINICA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
RAQUEL SANCHEZ HERNANDEZ

DIRECTORA DE TESIS:
Q.F.B. IDALIA AVILA MIYAZAWA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX. 1987



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

	PAGINA
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO	
I.- GENERALIDADES.....	3
A.- Definición de hemoglobina.....	3
B.- Estructura y función de la hemoglobina.....	3
C.- Diabetes Mellitus.....	5
D.- Hemoglobina glicosilada (HbA _{1c}).....	8
E.- Breve historia de la hemoglobina glicosilada (HbA _{1c}).....	8
F.- Estructura y síntesis de la hemoglobina glicosilada (HbA _{1c}).....	10
II.- OBJETIVOS.....	13
III.- METODOS PARA LA CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA - GLICOSILADA (HbA _{1c}).....	14
A.- Fotométricos.....	15
B.- Cromatográficos.....	20
C.- Electroforéticos.....	30
IV.- EVALUACION DE LOS METODOS.....	36
A.- Fotométricos.....	36
B.- Cromatográficos.....	36
C.- Electroforéticos.....	37
V.- DISCUSION.....	38
VI.- CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	43

INTRODUCCION

El desarrollo de este trabajo tiene como objetivos principales,-- analizar los métodos que existen para la cuantificación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), posteriormente se indicará cual de ellos es el mejor para que se pueda realizar como un examen clínico de rutina y así mejorar el control terapéutico de diabetes mellitus, así mismo se destacará la importancia clínica que tienen las determinaciones - de hemoglobina glicosilada.

Para lograr lo antes propuesto se evaluaron bibliográficamente - varias metodologías de una manera concreta y directa.

En el capítulo primero se hablará de la definición, estructura y función de la hemoglobina, continuamos con aspectos más importantes-- sobre diabetes mellitus como son sus causas, complicaciones clínicas y técnicas que existen para el diagnóstico y control de ella. Poste - riormente se hablará de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), se describirá una breve historia, estructura y mecanismo de biosíntesis de la - misma.

En el capítulo segundo se proponen los objetivos que se plantean en esta revisión bibliográfica.

En el capítulo tercero se hace una descripción de las metodolo-- gías fotométricas, cromatográficas y electroforéticas, así como su - fundamento químico, sus resultados de cada una de ellas.

En el capítulo cuarto se evalúan los métodos destacandose las - ventajas y desventajas que estos presentan en el desarrollo de la meto dología indicada por los diferentes autores.

En el capítulo quinto se analizan principalmente cada una de las ventajas y desventajas existentes en los métodos proponiendose algunas soluciones a las desventajas, así mismo se propone cual es el mé todo elegido para cuantificar hemoglobina glicosilada como un examen clínico de rutina y se mejore el control terapéutico de pacientes - con diabetes mellitus.

En el capítulo sexto se indican las conclusiones a las que condujo esta revisión y análisis bibliográfico.

La bibliografía se presenta en orden alfabético por autor.

Y es el resultado de la consulta de;

MEDLARS ON LINE (INDEX MEDICUS) 1960-1986.

GENERALIDADES.

A.- Definición de hemoglobina.

Es una proteína conjugada que sirve de vehículo para el transporte de oxígeno y CO_2 . (64).

B.- Estructura y función de la hemoglobina.

Estructuralmente la hemoglobina consta de 4 cadenas de polipéptidos dos cadenas alfa de 141 aminoácidos y dos cadenas beta de 146 aminoácidos que forman la globina y cuatro grupos Hem que se unen cada uno a las cadenas polipeptídicas formando así la hemoglobina.(15, 16).

La síntesis del Hem se produce en la mayor parte de las células corporales, excepto en eritrocitos maduros, pero sobre todo en los precursores eritroides. La succinilcoenzima A se condensa con la glicina para formar un compuesto intermedio el ácido alfa-amino-betacetoácido, que es descarboxilado para dar el ácido delta-aminolevulínico - (ALA), esta condensación requiere de fosfato de piridoxal. Dos moléculas de ALA se condensan para formar el monopirrol, porfobilinógeno catalizado por la enzima ALA-deshidrasa. La protoporfirina se encuentra en los eritrocitos maduros, el hierro se inserta en la molécula de protoporfirina mediante la enzima mitocondrial ferroquelatasa para formar la molécula de Hem completa.

La síntesis de la globina se produce en el citoplasma de los eritroblastos y de los reticulocitos, según el mecanismo de la síntesis proteica, las cadenas de polipéptidos se originan en los ribosomas - situados en el citoplasma de células jóvenes de la serie eritroide.

Las pequeñas moléculas específicas de RNA soluble se unen a cada aminoácido y determinan el lugar de este aminoácido de acuerdo con el código del RNAmensajero. El crecimiento progresivo de la cadena de polipéptidos empieza en el grupo amino final, este proceso de síntesis proteica sucede en los ribosomas que están agregados como polisomas.

Se requieren por lo menos cuatro pares de genes estructurales - para cada una de las cuatro cadenas polipeptídicas normales, los ge-

nes estructurales de la cadena alfa ocupan un locus en un par de autosomas y los genes estructurales de las cadenas beta, gamma y delta ocupan un locus muy cercano unos a otros en un segundo par de autosomas, una mutación de punto en uno de estos genes lleva a cabo una producción de una hemoglobina anormal.(2,8,9,10).

Las cuatro cadenas de la globina son dos pares idéntico de cadenas de aminoácidos, dos cadenas alfa y dos cadenas beta conteniendo un total de 576 aminoácidos formando así una molécula tetramérica como se observa en la figura número 1.

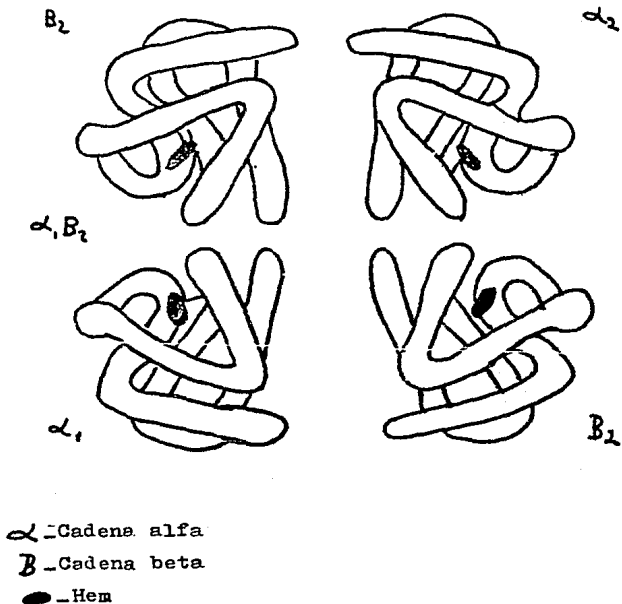


Figura No.1 Diagrama esquemático de la molécula de hemoglobina. En el momento actual se han descrito aproximadamente 250 hemoglobinas distintas, la gran mayoría de éstas se han caracterizado por

una sola sustitución de un aminoácido en una de las cadenas del polipéptido (alfa, beta, gamma ó delta).(40,41).

En los individuos genéticamente normales se encuentran generalmente tres tipos distintos de hemoglobinas y son:

Hemoglobina A ó A_1 .- Es la más importante de las hemoglobinas del adulto normal, la parte globínica de la molécula es de dos tipos dos cadenas alfa iguales con 141 aminoácidos y dos cadenas beta con 147 aminoácidos cada una.

Cada cadena está unida a un grupo Hem, la molécula es elipsoidal y los cuatro Hem se encuentran en su superficie donde cumplen sus funciones de combinarse con el oxígeno ó dióxido de carbono.

Hemoglobina A_2 .- Esta hemoglobina posee dos cadenas alfa y dos cadenas delta, estas últimas difieren en cuanto su secuencia de aminoácidos a las cadenas beta de la hemoglobina A.

Hemoglobina Fetal.- Es la hemoglobina principal del feto y del recién nacido presenta dos cadenas alfa y dos cadenas gamma, con 146 aminoácidos residuales es estas últimas.

Las proporciones de estas hemoglobinas en individuos normales son:

Hemoglobina A ó A_1 de 96 a 98 %.

Hemoglobina A_2 de 1.5 a 3.5 %.

Hemoglobina F de 0.2 % (2,14,15).

Las funciones de la hemoglobina son:

a).- Transporte del oxígeno de los pulmones a los tejidos y del bióxido de carbono de los tejidos a los pulmones.

b).- Participación en la regulación ácido-básica eliminando CO_2 en los pulmones y amortiguando los cambios de pH por acción de los grupos histidinimidazol de la hemoglobina.(8,9,10,64).

C.- Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es un trastorno crónico que se caracteriza por concentraciones anormalmente altas de glucosa en el plasma, que causan la excreción de esta sustancia en la orina y una forma es

pecífica de microangiopatía, dicha angiopatía implica un aumento del espesor de las membranas basales de casi todos los capilares del cuerpo. (26,32).

La diabetes mellitus se divide clínicamente en:

a).- Adulta o no insulino dependiente.

b).- Juvenil o insulino dependiente.

La diabetes adulta se presenta frecuentemente a una edad inferior a los 40 años, resultando rara la cetosis.

La diabetes juvenil aparece antes de los 30 años de edad y con rápido desarrollo, ocasionalmente el paciente experimenta períodos de remisión y resulta prominente la cetosis.

Causas de la diabetes mellitus:

a).- Deficiencia relativa de insulina.

b).- Disminución absoluta de la insulina.

La insulina juega un papel importante en el correcto metabolismo de azúcares, grasas, proteínas, agua y electrolitos.

La célula necesita glucosa para su metabolismo, al carecer de insulina se disminuye la utilización periférica de la glucosa en el músculo y tejido adiposo dando como resultado la hiperglucemia, que aumentará la glucogénesis en hígado y músculos por lo que la función gluconeogénica se incrementa y aparece glucosuria, diuresis con glucosuria, agua y electrolitos, dando lugar a deshidratación y hemoconcentración.

Complicaciones.

a).- Vasculares como la aterosclerosis.

b).- Renales se presenta después de 10 a 15 años del inicio con albuminuria y deterioro renal.

c).- Neurológicas como las neuropatías y accidentes vasculares.

Estas complicaciones se presentan debido a que en el nivel de proteínas existe una disminución de su síntesis; al aumento de la gluconeogénesis y a largo plazo las glucoproteínas y mucoproteínas se depositan en los grandes y pequeños vasos trayendo alteraciones

en el funcionamiento de la membrana basal capilar.

Para la detección de la diabetes mellitus sólo existen dos métodos:

- a).- Prueba de tolerancia a la glucosa.
- b).- Determinación de glucosa postprandial.

El primer método consiste en dar al paciente una carga oral de glucosa, posteriormente se cuantificará la glucosa antes y después de haberse administrado la carga de glucosa, los intervalos de tiempo para cuantificar la glucosa son los siguientes: 30 min, 60min, 90 min, 120min, 150min y 180 min.

Dependiendo de las concentraciones obtenidas de glucosa a estos intervalos de tiempo se determinará si el paciente es clínicamente normal ó no.

El segundo método consiste en administrarle una dieta rica en carbohidratos al paciente, se le cuantifica la cantidad de glucosa en estado de ayuno y dos horas después de haber ingerido la dieta.

Para el control y manejo de pacientes con diabetes mellitus existen en la actualidad los siguientes métodos:

- a).- Determinación de glucemia.
- b).- Determinación de glucosa en orina.
- c).- Determinación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}).

Para la cuantificación de glucosa en los dos primeros métodos para el diagnóstico y control de diabetes mellitus existen dos fundamentos químicos.

- 1.- Químicos.
- 2.- Enzimáticos.

Los químicos dependen de las propiedades reductoras de la glucosa que existe en varias formas, una de ellas es la de enediol, que es la que le da su propiedad fuertemente reductora y que resulta favorecida en condiciones alcalinas.

Los enzimáticos proporcionan una especificidad máxima para las valoraciones de glucosa, esta puede medirse por la reacción de la

glucosa-oxidasa en la que se forma ácido glucónico y peróxido de hidrógeno.

El último método resulta de gran utilidad por su sensibilidad y estabilidad para valorar la eficiencia de la terapia del paciente con diabetes mellitus. (5,6,11,16,17,26,54,55).

D.- Hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}).

La hemoglobina A tiene cuatro componentes menores, que son HbA_{1a}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} y HbA_{1c}, estos componentes fueron aislados por primera vez por Schoroeder y Allen en 1959 por cromatografía sobre resinas de intercambio iónico (I.R.C. 50) las cuales fueron designadas de acuerdo a su orden de elución y presentan la siguiente concentración HbA_{1a} hasta un 1%, HbA_{1a2} hasta un 1%, HbA_{1b} hasta un 1% y HbA_{1c} en un 3% ó más en caso de pacientes con diabetes mellitus. (31).

A estas hemoglobinas se les cuantifica colectivamente y se les llama " Hemoglobinas rápidas ó hemoglobinas glicosiladas " (51).

La hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) es uno de los componentes menores de la hemoglobina A que se encuentra en los eritrocitos, está estructuralmente relacionada con la hemoglobina de personas adultas - se forma por un proceso de condensación entre el último aminoácido - de la cadena beta de la hemoglobina A y la glucosa u otros azúcares presentes en el flujo sanguíneo.

E.- Breve historia de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}).

En la Universidad de Teherán U.S.A. el Dr. Allen en 1967 llevan do a cabo una electroforesis en acetato de celulosa de muestras sanguíneas de pacientes que tenían hemoglobinas anormales, observó una banda de electroforesis que parecía ser diferente a las variantes de las hemoglobinas conocidas.

Comparando este resultado con patrones de electroforesis de hemoglobinas normales se vió que esta banda formaba parte de un 10 a 15% de la hemoglobina total.

La primera persona seleccionada para el estudio fué un paciente con diabetes mellitus severa, primero se consideró una coincidencia -

En el colegio " Albert Einstein " U.S.A. en 1968 Elsa Paulsien - quién estaba a cargo del control de pacientes diabéticos se abastecio de 92 muestras sanguíneas y la existencia del nuevo componente en la hemoglobina fué encontrado.

Los métodos de purificación para esta hemoglobina fueron hechos por Schnei y Schoroeder, empleando cromatografía de columna (15,27.-33,36,54).

F.- Estructura y síntesis de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})

La HbA_{1c} es uno de los componentes menores y más abundantes de los eritrocitos comprendiendo de un 3 a 6 % del total de la hemoglobina A. Este componente HbA_{1c} se incrementa dos ó más veces en los eritrocitos de pacientes diabéticos. (31,33,45).

La estructura de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) ha sido establecida y se muestra en la figura número 3, la glucosa primero se condensa con el N-terminal de la cadena beta de la hemoglobina A, formando así la base de Schiff en un enlace lábil que es poco disociable.

Esta base de Schiff (Pre A_{1c}) puede tolerar un arreglo de Amadori a la forma más estable que es la cetoamida.

El mecanismo de biosíntesis de la hemoglobina glicosilada HbA_{1c} se muestra en la figura número 4 y consiste en la condensación bimolecular de componentes muy abundantes en el eritrocito que son la hemoglobina y la glucosa, a este fenómeno se le denominó " Glicosilación " de la hemoglobina este proceso es lento y no enzimático que se lleva a cabo durante los 120 días de vida del eritrocito. (31,34,-35,42).

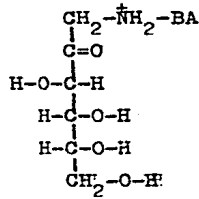


Figura No. 3.

Estructura de la Hemoglobina Glicosilada (HbA_{1c}).

BA= Cadena beta de la hemoglobina A.

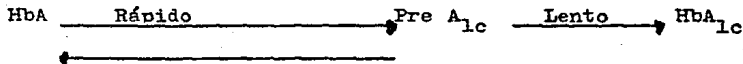
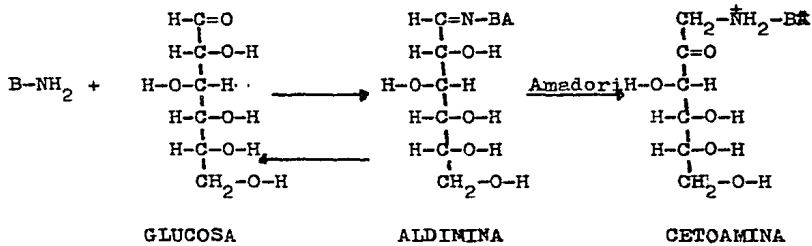


Figura No. 4.

Mecanismo de reacción para la síntesis de HbA_{1c} .

Recientes estudios indican que la HbA_{1c} es un buen indicador del nivel de glucosa en plasma bajo períodos prolongados y refleja el control metabólico de la diabetes mellitus durante tres meses (3,4).

Se ha visto que la cantidad de HbA_{1c} en un momento determinado -

no es afectada por el ejercicio , hora del día y alimentación de ese día, sino que es afectada directamente por la concentración de glucosa presente en sangre y del número de eritrocitos.(12,13,48).

Se ha probado que en pacientes diabéticos con dieta carente de - carbohidratos el valor de HbA_{1c} fluctúa entre ($10 \pm 0.5 \%$), en cambio en pacientes tratados con insulina ($12 \pm 0.3 \%$), pacientes tratados con sulfonilurea y biguanidas ($11.2 \pm 0.5 \%$) y solo con sulfonilurea ($9.8 \pm 0.4 \%$), por lo que se concluyó que la cuantificación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) puede ser un parámetro - muy útil para evaluar la efectividad del tratamiento que se le esta - aplicando al paciente con diabetes mellitus.(55,56,60,61).

OBJETIVOS.

- I.- Describir los métodos que existen para valorar hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}).
- II.- Evaluar ventajas y desventajas de dichos métodos.
- III.- Proponer la metodología más adecuada para ser utilizada en la rutina clínica.
- IV.- Destacar su utilidad clínica.

MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACION DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA_{1c})

A.- Métodos fotométricos.

- 1.- Determinación fotocolorimétrica de glicosilación de la hemoglobina por la reacción del hidroximetilfurfuraldehído (H.M.F.) y ácido tiobarbitúrico (T.B.A.) de (Chandrashekar V.).
- 2.- Un método fotocolorimétrico para medir hemoglobina glicosilada. (Parker K. Michael).
- 3.- Nuevo método espectrofotométrico para la determinación de (HbA_{1c}) de (Walinder Olov).

B.- Métodos cromatográficos.

- 1.- Un simple método para estimar la hemoglobina glicosilada y su evaluación con aplicación a pacientes diabéticos. de (Jinshen Chou).
- 2.- Un método rápido de determinación de hemoglobina glicosilada por cromatografía líquida de alta presión (H.P.L.C) de (Cole Soeldner).
- 3.- Cuantificación de HbA_{1c} y HbA_{1a} por un método automático de cromatografía líquida de alta presión. de (Gimber - Koets).
- 4.- Mejoramiento en la determinación de HbA_{1c} por rápida cromatografía de intercambio iónico. de (Rand G. Philip).
- 5.- Determinación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) con un nuevo procedimiento de columna de (Abraham E.C.).
- 6.- Un método rápido para medir HbA_{1c} como rutina de (R.E. - Davis).
- 7.- Colección de sangre sobre papel filtro para medir hemoglobina glicosilada por afinidad cromatográfica de (Randie R. Little).

C.- Métodos electroforéticos.

- 1.- Determinación cuantitativa de HbA_{1c} por electroforesis en agar gel de (Menard Lionel).
- 2.- Mediciones de hemoglobina glicosilada sobre membranas -

de acetato de celulosa por afinidad electroforética móvil de (Jeffrey Ambler).

3.- Dosificación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) por punto-isoelectrico. de (R. Schoes).

A.- Métodos fotométricos.

1.- DETERMINACION FOTOCOLORIMETRICA DE GLICOSILACION DE LA HEMOGLOBINA POR LA REACCION DEL H.M.F. CON T.B.A. de (Chandrashekar V.).

Fundamento.

Se evalúa la glicosilación por cuantificación de cetoaminas unidas a la hemoglobina (glucosil-valina), sometida a un proceso de calentamiento con ácido acético 10M. a $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, durante 16 horas, - este tratamiento convierte a las hexosas a 5-hidroximetilfurfuraldeído (H.M.F.) el cual es medido a través de la reacción con el ácido - 2-tiobarbitúrico (T.B.A.).

La glicosilación de la hemoglobina se expresa como micromoles de hidroximetilfurfuraldeído por gramo de globina.

Metodología.

2 ml. de sangre completa se lavan tres veces con solución salina fisiológica por centrifugación.

El paquete de células es recobrado y se lisa adicionando 12 ml.- de agua destilada y 0.5 ml. de tetracloruro de carbono, los restos celulares se eliminan por centrifugación a 1500G/min. y el hemolizado limpio se almacena a (-20°C) por 24 horas.

En los estudios preliminares efectuados, la presencia en forma soluble de Fe hemo y Fe no hemo en el digerido después de la precipitación de las proteínas con T.C.A. produce un color café oscuro que interviene fotocolorimétricamente en la reacción de H.M.F. y T.B.A., por esta razón se usa globina libre de Fe.

Para separar el Fe hemo y Fe no hemo presentes en la hemoglobina y obtener globina libre por cada ml. de este hemolizado se agregan -

15 ml. de acetona acidificada (2 ml. de HCl 12 N. en 100 ml. de acetona a (- 40°C). La globina precipitada se recuperará por centrifugación a 3600G a (- 40°C) se lava una vez con la acetona acidificada a - 4°C, para eliminar indicios de ácido en el precipitado. Finalmente se lava con dietil-eter y se seca con una corriente de N₂ y se almacena a (- 20°C) por 24 horas.

Dado que tanto el ácido tricloroacético como el ácido acético - participan en la preparación de este tipo de material de estudio, se diseñó un experimento en donde se incluía el tiempo y la temperatura de calentamiento en presencia de diversas concentraciones de ácidos- para ver su efecto, en el desarrollo y estabilidad de color del complejo resultante de la reacción de H.M.F. y T.B.A.

Para este fin los autores analizaron 75 mg. de globina obtenidos de pacientes diabéticos y controles normales respectivamente, digeridos con ácido acético 10 M. por el procedimiento de conversión de hemoglobina glicosilada a H.M.F. descrito, midiendo el contenido de H. M.F. con la reacción de T.B.A.

Mezcla de reacción.- Se adicionan 2 ml. de ácido tricloroacético- al 20 % a 1 ml. de precipitado de globina ó estandar disueltos en - agua ó en ácido acético, se mezcla por agitación dejándose reposar y a los 5 minutos se le adicionan 2 ml. de T.B.A. se mezcla y centrifuga a 1400G/10min. el sobrenadante se incubó por 50 min. a 40°C.

Se mide su absorbancia a 443 nm.

Resultados.

De acuerdo con los resultados a 40°C \pm 2 el desarrollo de color- fué máximo a los 50 min. en presencia de 1 a 2 moles de ácido acético y fué estable dos horas, en cambio hubo disminución y pérdida de la estabilización de color y temperaturas de 60 a 75 °C en presencia de 2 moles por litro de ácido acético, con este resultado ellos establecen el uso de temperatura de 40°C \pm 2 durante 50 minutos y hasta una concentración de 2 moles por litro de ácido acético.

Determinaciones repetidas del índice de hidroximetilfurfuraldehid

do de globina obtenido de la mezcla de hemoglobina reunidos de pacientes diabéticos y los controles mostraron una favorable reincidencia en los resultados.

(Índice de H.M.F.=umoles (micromoles) de H.M.F./g. de proteína globínica)

Un coeficiente de variación de 3.4 % para un índice de H.M.F. de 3.5 y un coeficiente de variación de 5.1% para un H.M.F. de 2.2.

Cuando los autores estudiaron la glicosilación de la hemoglobina A en 25 sujetos controles y 133 pacientes diabéticos encontraron los siguientes resultados.

	25 controles	133 pacientes diabéticos.
Índice de H.M.F.	---	1.54 a 5.95
Mediana	1.67	2.93
Desviación Estandar	0.23	0.95
Promedio de glucosa en sangre en 3 determinaciones previas en un lapso de 4 meses.	---	0.90 a 4.80 g/l. Mediana = 2.39 D.E. 0.88

Cuando la concentración de hemoglobina fué ajustada tomando como base molecular 32,000 para el dímero alfa y beta de la hemoglobina, el rango del índice de H.M.F. para pacientes diabéticos es (1.54 a 5.95) que corresponden a la presencia de 50-190 nmoles de glucosa/mol alfa-beta dímero de hemoglobina en pacientes diabéticos (12).

2.- UN METODO FOTOCOLORIMETRICO PARA MEDIR HEMOGLOBINA GLICOSILADA .de (Parker K. Michael).

Fundamento.

La mitad de las hexosas de la hemoglobina glicosilada son convertidas a 5-hidroximetilfurfuraldehído (H.M.F.) que reacciona con el ácido 2-tiobarbitúrico y el color resultante se mide en un fotocolorímetro a 443 nm.

Metodología.

Las muestras de sangre obtenidas en tubos con E.D.T.A. se centrifugan para quitar el plasma y se lava el paquete celular por centrifugación a 20°C con 5 volúmenes de solución salina, se repite este proceso dos veces más.

Se lisa el paquete de células con dos volúmenes de agua y un volumen de tetracloruro de carbono, se mezcla y refrigera toda la noche a 4°C se rescata el sobrenadante y se guarda a (- 70°C).

De la muestra almacenada se prepara una dilución adecuada ajustando a una concentración de hemoglobina de 10g/l. A 1 ml. de la muestra con 10g/l. de hemoglobina se adiciona 1 ml. de ácido oxálico 0.5M se corre un estándar con fructosa de 1 umol/l. y se somete a un calentamiento a una temperatura de 124°C en el autoclave durante 60 minutos.

A temperatura ambiente se mezcla el contenido del tubo por inversión y se adiciona a cada uno 1 ml. de ácido tricloroacético al 40%, se mezcla y pasa a una columna de intercambio iónico.

A 1.5 ml. de eluido se agrega 0.5 ml. de ácido tiobarbitúrico 0.5M se calientan los tubos en baño maria a 40°C por 30 minutos y se mide su absorbancia a 443 nm. para cada muestra se prepara un blanco adecuado.

Resultados.

Para las muestras de personas normales la absorbancia neta es de 84 % en 60 minutos mientras que en los pacientes diabéticos esta absorbancia se presentó a los 120 minutos.

El porcentaje promedio de hemoglobina glicosilada en personas es de 13.30 % con una desviación estándar de 0.30 y su coeficiente de variación es de 1.65.

Para personas con diabetes mellitus su valor medio es 27.32 % su desviación estándar es de 0.39 con un coeficiente de variación de 1.44 (43).

3.- NUEVO METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA DETERMINACION DE -
HbA_{1c} COMPARADO CON EL DE MICROCOLUMNA. de (Walinder Olov).

Fundamento.

Este ensayo espectrofotométrico esta basado en el hecho de que - los compuestos orgánicos fosforilados tales como el 2-3 difosfoglicerato (2,3 D.P.G.) y el inositol fosfato (ácido fítico) unido al - grupo aminoterminal del aminoácido de las dos cadenas beta de la hemoglobina A, causa un cambio conformacional de la molécula de hemoglobina este proceso puede ser medido espectrofotometricamente. El - prerrequisito para los cambios está en los residuos permisibles del - N-terminal, por consiguiente el espectro de la hemoglobina glicosilada no es cambiado por los compuestos orgánicos fosforilados, por el efecto bloqueante de la glucosa.

El cambio inducido en la absorbancia por el ácido fítico es así inversamente proporcional al % de la hemoglobina glicosilada.

Metodología.

Una alícuota de cada muestra sanguínea con E.D.T.A. ó estandar - se coloca en las copas de un Analizador Automático Bioromático, 10ul. de cada muestra se distribuyen automáticamente con 50 ul. de reactivo hemolizante, dentro de la cubeta apropiada y la diferencia en la absorbancia de 560 a 663 nm. es notable 50 ul. de ácido fítico es - distribuido en cada cubeta y la diferencia de absorbancia es anotada.

Resultados.

Los valores medios para las personas sanas de hemoglobina glicosilada es de 7.7 % con una desviación estandar de 1.3 % y para las - personas con diabetes mellitus su valor medio es de 11 % con una desviación estandar de 2.2 %, (61).

B.- Métodos cromatográficos.

- 1.- UN SIMPLE METODO PARA ESTIMAR LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA Y -
SU EVALUACION CON APLICACION A PACIENTES DIABETICOS. de (Jin
Ken Chou).

Fundamento.

Se describe un método de cromatografía líquida de alta presión -
(H.P.L.C.) la cual permite el aislamiento de HbA_{1c} en 27 minutos -
usando sólo 12 ug. de hemoglobina (100 ul. de sangre debido a inter
cambio iónico).

Metodología.

Las muestras de sangre con E.D.T.A. se lavan por centrifugación-
dos veces con solución salina fisiológica para eliminar el plasma y-
se hemolizan las células con un regulador de fosfatos pH=6.7 (un vo
lumen de células por seis volúmenes de regulador y se centrifugan).

La concentración final de la hemoglobina en el sobrenadante pue-
de ser de 30 a 50 g/l.

Se pasa una alícuota de 0.5 ml. del sobrenadante a una columna -
de intercambio iónico, se recuperan las fracciones diez cada una de-
10 ml. de eluido y se mide la absorbancia de cada fracción a 540 nm
(fracción fija).

La determinación de la hemoglobina total, otra alícuota de 0.5ml.
del sobrenadante se vierte en un recipiente volumétrico, se diluye -
el volumen con un regulador de fosfatos de pH=6.7.

A un volumen final de 5 se mide su absorbancia a 540 nm. en un-
espectrofotómetro Beckman Modelo 25.

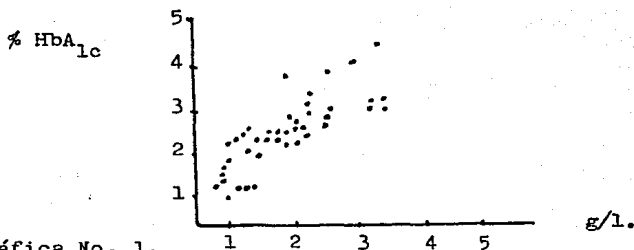
Cálculos del porcentaje de hemoglobina glicosilada.

$$\%HbA_{1c} = \frac{\text{Absorbancia de la fracción fija} \times 100}{\text{Absorbancia de la hemoglobina total.}}$$

Resultados.

Se hizo un análisis de regresión sobre los datos obtenidos entre
la hemoglobina glicosilada y la concentración de glucosa en plasma -

como se aprecia en la gráfica número 1.



"Correlación entre la concentración de glucosa en plasma y el % de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})." g/l.

El valor medio del porcentaje de HbA_{1c} en 52 personas normales es de 6.6 ± 0.31 .

El valor medio para las personas con diabetes mellitus es de 10.83 ± 0.34 (35).

2.- UN METODO RAPIDO DE DETERMINACION DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION (H.P.L.C.) de (Cole Soeldner).

Fundamento.

Se utiliza resina de intercambio iónico (Bio-Rex 70) para la cuantificación de hemoglobina glicosilada.

Metodología.

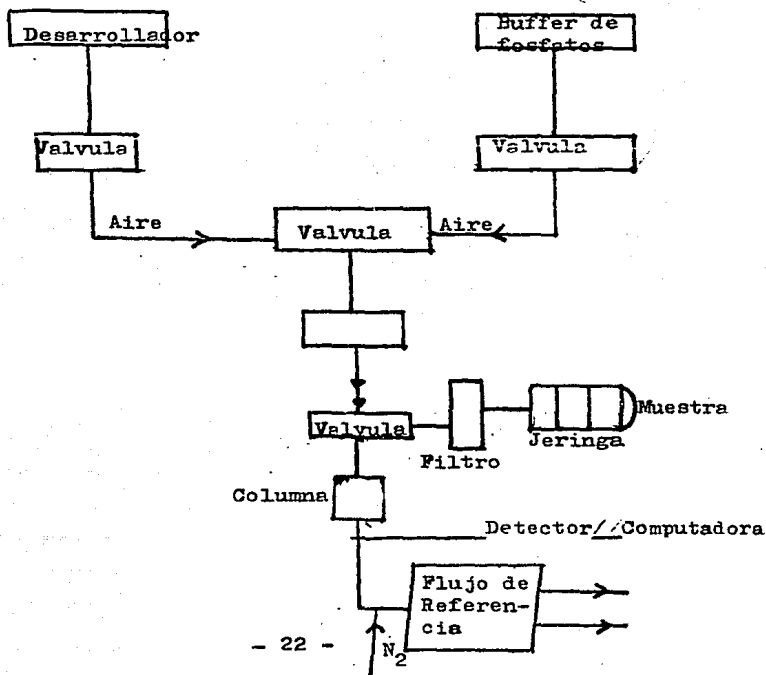
Una columna de 9 mm.x 5.8 cm. de resina (Bio-Rex 70) se le inyectan 10 ul. de muestra hemolizada a través de un inyector, la muestra se filtra a través de un filtro matriz posteriormente se pasa a muestra columna y se le agrega un regulador de fosfatos y el desarrollador No. 6 que contiene fosfatos y cianuro de potasio con un pH=6.7 este regulador se le agrega por 13 minutos para estabilizar el sistema y sus componentes.

Para un control cuantitativo se corre un estandar de concentra-

ción conocida de HbA_{1c} en un cromatograma para confirmar su concentración.

A la columna se le conecta una pila eléctrica dentro de la cual fluirán 20 ul. de muestra, con un detector y agitador colocado en una caja mezcladora para eluir las corrientes de aire, los componentes menores de la hemoglobina A son leídos a 405 nm. en un espectrofotómetro que tiene una escala sensible a 0.01 unidades de densidad óptica de HbA_{1c} .

En el esquema se ilustra esta metodología.



Micrométodo.- Para la determinación de los niveles de HbA_{1c} en pequeñas cantidades de sangre, se colectan 100 ul. de sangre completa y se colocan en tubos heparinizados, se centrifugan para la determinación del hematocrito, se cierra el final del capilar cortando y usando una micropipeta, aproximadamente 30 ul. del paquete celular son expelidos dentro de un tubo cónico de una centrífuga.

100 ul. de agua destilada y 100 ul. de tolueno se adicionan a las células y se mezclan vigorosamente, la solución final se centrifuga 8 minutos a 4°C. El hemolizado se diluye con el desarrollador No. 6 de pH=6.7.

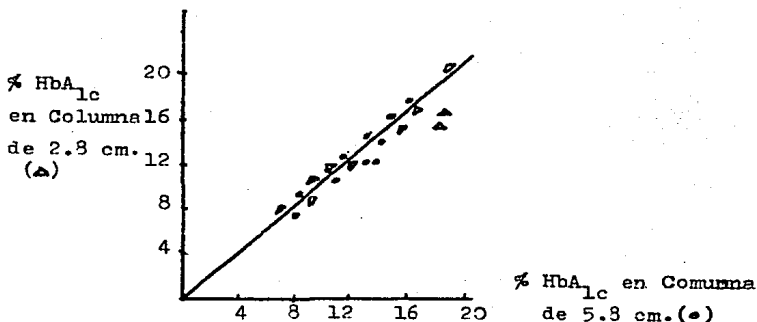
Resultados.

Los resultados para ambos métodos son:

De 36 ensayos en individuos normales se obtiene un valor medio de HbA_{1c} de 4.94 % \pm 0.12 con un coeficiente de variación de 2.4 y una desviación estandar de 1 ± 0.02 .

El valor medio para los diabéticos 57 fué de 6.8 a 20 % con un coeficiente de variación de 2.19 y una desviación estandar de 1 ± 0.14 a 5 pacientes se les administraron 100 g. de glucosa y se les realizó una curva de tolerancia a la glucosa y así mismo de les cuantifico la cantidad de HbA_{1c}, notandose en los valores obtenidos de HbA_{1c} que estos no se modificaron en ningun momento.

Se comparan los dos sistemas utilizados en este método en la gráfica número 2.



Gráfica No. 2.

"Relación entre el % de hemoglobina glicosilada HbA_{1c} utilizando cromatografía de alta presión (H.P.L.C.) y comparando los dos métodos (macrocolumna y microcolumna)."

3.- CUANTIFICACION DE HbA_{1c} Y HbA_{1a+b} POR EL METODO AUTOMATICO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION. de (Gimber Koets).

Fundamento.

La concentración de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c} y HbA_{1a+b})- refleja la posición integrada del metabolismo de carbohidratos en in individuos diabéticos durante las 4 ó 6 semanas precedentes. La cuantificación de hemoglobina A_{1c} es sugerida por un grupo de investigadores no sólo para el diagnóstico de la diabetes sino también como un medio de estudio del metabolismo de glucosa en diabéticos con la idea de lograr un control metabólico efectivo para la reducción e incidencia de secuelas secundarias asociadas con diabetes mellitus.

Metodología.

Las muestras de sangre con anticoagulante E.D.T.A. se almacena a 4°C hasta 24 horas, la muestra hemolizada que da libre de estroma y se dializa de acuerdo al método de Drabkin(30).

Una muestra de 5 ul. de sangre hemolizada equivalente a 240 ug. de hemoglobina con un rango de 125 a 280 ug. se inyecta a la columna

de 11 cm. empacada con resina catiónica Bio-Rex 70 de un cromatógrafo y se eluye con los reguladores de fosfatos pH=6.42 respectivos - con un flujo constante de 3 ml./min.

Por medio de una valvula selenoide activada y con una secuencia de tiempo integrado a la computadora hace programable los cambios - apropiados del regulador a los 4.2 min. y 6.4 min. respectivamente.

La hemoglobina A_{1a+b} y la HbA_{1c} se eluyen secuencialmente en 6.4 min. con un regulador de fosfatos de pH=6.42.

Con un detector de longitud de onda variable modelo 970 A, se miden las absorbancias de los eluidos a 410 nm. Los tiempos de retención para las hemoglobinas son:

HbA_{1a+b} de 0.9 min. y para HbA_{1c} 2.3 min.

El tiempo que tarda este proceso es de 27 minutos a una temperatura de 22°C.

Resultados.

Para un tamaño de muestra de 10 personas normales el valor medio de HbA_{1c} fué de 4.91 % \pm 0.0778 con un coeficiente de variación de 1.10.

Las hemoglobinas permanecen estables a las 24 horas, un retraso de 48 horas en el procesamiento aumenta la cantidad de estas hemoglobinas (30).

4.- MEJORAMIENTO EN LA DETERMINACION DE HbA_{1c} POR RAPIDA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO de (Rand G. Philip).

Fundamento.

Se determina la proporsión de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})- utilizando una resina de amberlita de intercambio iónico la cual reduce el pH de la hemoglobina, eluyendo con un buffer y un agente de fuerza iónica utilizandose un volumen de elución más completa de la fracción A_{1c} .

La resina de amberlita (6-50) de la forma ácida se lava brevemente para quitar las partes gruesas y convertirlas a la forma sódica

ca con hidróxido de sodio concentrado, se enjuaga con agua destilada el pH de la resina se ajusta y se lava por decantación varias veces con el buffer de pH=6.4 para asegurar el equilibrio por completo el pH y la fuerza iónica.

Metodología.

Las columnas son jeringas de 9.5 cm. de longitud se acomodan discos de polietileno para mantener la resina, los ensambles de la columna se llenan con 7.5 ml. de una suspensión de 500 ml. de resina equilibrada en pH para formar la cama de la resina e insertar los discos de polietileno.

Las muestras se preparan diluyendo un volumen de sangre con 2.4-volumenes de solución hemolizante, después de que el buffer de fosfatos está sobre la resina se deja pasar 1 ml. de hemolizado dentro de la columna.

0.20 ml. de buffer de fosfatos se aplica para enjuagar la hemoglobina que quedo dentro de la columna. Este líquido se desecha, las fracciones de la hemoglobina rápida se eluyen con 25 ml. de buffer y el eluido se guarda para posteriormente leerse en el espectrofotómetro y la hemoglobina presente se eluye con 5 ml. de buffer de fosfatos., este eluido se diluye 20 veces y las absorbancias de las soluciones se leen a 415 nm. y la HbA_{1c} se calcula como un porcentaje del total de la hemoglobina eluida.

Este método fué comparado con el equipo comercial de Isolab y Helena.

Resultados.

El porcentaje medio de HbA_{1c} fué de 8.83 ± 0.25 en personas con diabetes mellitus y en personas normales fué de 4.01 (51).

5.- DETERMINACION DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA_{1c}) CON UN NUEVO PROCEDIMIENTO DE COLUMNA (MICRO) de (Abraham E.C.).

Fundamento.

Se determina hemoglobina glicosilada por intercambio iónico.

Metodología.

Se colectan dos tubos con sangre, uno se utiliza para determinar hemoglobina en sangre y el otro para determinar el porcentaje de HbA_{1c} el hemolizado se prepara lizando un volumen de células lavadas con un volumen igual de agua destilada y una mitad de volumen de tetracloruro de carbono, el resto celular se remueve por centrifugación y la mitad de la microcolumna se obtiene de un laboratorio comercial.

Una suspensión de Bio-Rex 70 diluída 1:2 con un buffer de fosfatos se usa para cada columna, el pH requerido con un buffer de fosfatos y de 25 a 30 g. de hemoglobina se dializa toda la noche con el buffer de fosfatos el cual ha sido diluído con agua destilada.

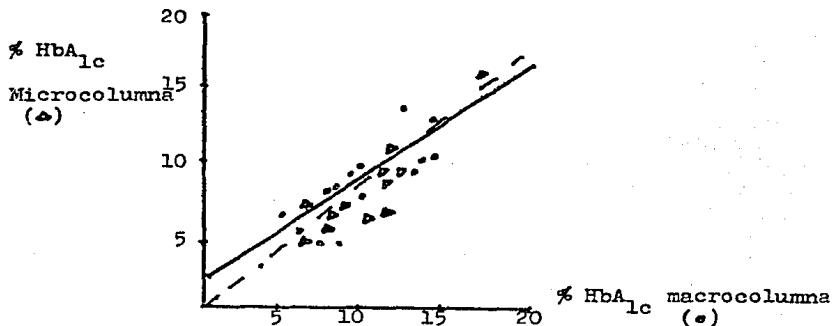
El buffer se utiliza para remover los desperdicios de la parte superior de la columna, después la muestra dializada se aplica a la columna permitiendo el paso del cromatograma con el buffer de fosfatos el fluido se mantiene de 14 a 15 ml/ min. y se dividen las hemoglobinas menores HbA_{1a+b}, HbA_{1c} son eluídas de 16 a 20 horas, con el buffer de fosfatos de alta molaridad 0.15 M. La elución permanente de la hemoglobina requiere de 8 a 10 horas adicionales, el cálculo de los componentes de la hemoglobina requiere y se basa en la absorbancia a 415 nm. en un espectrofotómetro Beckman.

Resultados.

El porcentaje medio de HbA_{1c} en sujetos normales es de 5.6 con una desviación estandar de 0.2 y el rango es de 5.3 a 6.0 %.

En sujetos diabéticos el valor medio es de 10.4 su desviación estandar es de 0.4 con un rango de 10 a 13 %.

En la gráfica número 3 se tienen los valores del % de HbA_{1c} obtenidos por los métodos de microcolumnas y macrocolumnas con relación a la concentración de glucosa sanguínea.(21).



Gráfica No. 3.

"Relación de HbA_{1c} por macrocolumna y microcolumna."

5.- UN METODO RAPIDO PARA MEDIR HEMOGLOBINA GLICOSILADA COMO RUTINA . de (R.E. Davis).

Fundamento.

Se describe un método utilizando resina de intercambio iónico.

Metodología.

100 g. de Fio-Rex 70 de malla 200-400 se le adiciona un buffer - de fosfatos de pH=6.7-6.8. La sangre con anticoagulante E.D.T.A. se centrifuga y a 0.5 ml. del paquete celular se transfiere a otro tubo al cual se le agrega de 4 a 5 ml. de hemolizante (saponina y cianuro de sodio), a 2 ml. de hemolizado se deja pasar a través de la columna que contiene la resina.

El buffer de fosfatos se adiciona a la reserva del eluente aproximadamente 15 ml. y los tubos son centrifugados a 1500-2000 G/min. el eluado (fracción de hemoglobina glicosilada) se recolecta su volumen y se anota. Para la determinación de la concentración de la concentración de la hemoglobina total 0.02 ml. del hemolizado original se diluye con el buffer de fosfatos pH=6.7.

La densidad óptica es leída a 414 nm. y el porcentaje de hemoglobina es calculado tomando en cuenta las siguientes diluciones.

$$\% \text{ de HbA}_{1c} = \frac{\text{D.O. Volumen del eluado} \times 100}{0.02 \times \text{D.O. Hb. Total} \times 500}$$

Resultados.

El valor medio de HbA_{1c} para personas normales es de 4.5 % y para personas con diabetes mellitus es de 11.38 % (53).

7.- COLECCION DE SANGRE SOBRE PAPEL FILTRO PARA MEDIR HEMOGLOBINA GLICOSILADA POR AFINIDAD CROMATOGRÁFICA. de (Randie R. - Little).

Fundamento.

Se presenta un sistema en el cual se recolecta sangre sobre un papel filtro impregnado de glucosa oxidasa, el cual posteriormente se le procesa una cromatografía de intercambio iónico.

Metodología.

Se colecta sangre en tubos vacutainer con E.D.T.A. y sangre capilar la cual se coloca en un papel filtro, este papel esta impregnado de glucosa oxidasa, los papeles son secados a temperatura ambiente, una alícuota es almacenada de sangre venosa a (-70°C) y otra fué dejada para el hemolizado de los eritrocitos.

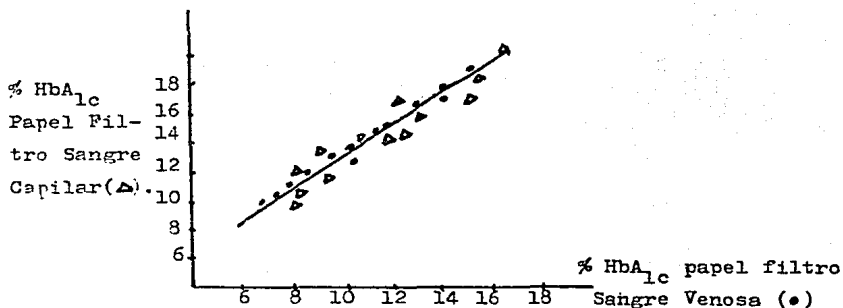
La preparación del hemolizado fué para el análisis de HbA_{1c} por H.P.L.C. directamente en la columna.

Para el control de calidad para nuestro ensayo de afinidad cromatográfica fué hecho por duplicado.

Resultados.

El valor medio para 28 pacientes normales de HbA_{1c} fué de 7.21% y el valor medio para pacientes diabéticos fué de 11.57 %, para sangre venosa y sangre capilar.

Existe una buena correlación entre los dos métodos para la obtención de muestras procesadas en este sistema H.P.L.C. como se muestra en la gráfica número 4.



Gráfica No. 4.

"Correlación entre el % de hemoglobina A_{1c} cuantificada por el sistema de H.P.L.C. procesándose las muestras por diferentes métodos de obtención sobre papel filtro con glucosa oxidasa." (Sangre capilar y sangre venosa).

C.- Métodos electroforéticos.

1.- DETERMINACION CUANTITATIVA DE HbA_{1c} POR ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAR . de (Menar Lionel).

Fundamento.

Se describe un procedimiento por densitometría después de la electroforesis en gel de agar de 1 ul. de hemolizado al cual se le aplica 60V/40 min. para determinar la hemoglobina glicosilada.

Metodología.

Preparar un buffer 0.1 M. de citrato pH= 6.3 en cual se utiliza como cambiador.

Para la electroforesis se prepara una mezcla de 20 g. de agar y 1.40 g. de sorbitol, citrato de sodio 32 mól, ácido cítrico 25 nmol y se ajusta el pH a 6.3.

Se calienta la mezcla para que se disuelva completamente, se en-

fría antes de que el gel se molde en una capa de poliéster flexible.

Reactivo hemolizante.- Mezcla 100 g. de saponina con 100 ml. de agua deionizada, se colecta la sangre con E.D.T.A. y se prepara el hemolizado para la electroforesis dentro de las 48 horas de su colección mezclandolo en Vortex, una parte de sangre completa con tres partes de reactivo hemolizante y se almacena a (-4°C).

Se coloca 1 ul. del hemolizado dentro de los pozos de gel agar, se adicionan 95 ml. de buffer par: hemoglobina glicosilada para cada electrodo, en el intercambiador insertar dentro del agar el cassette-receptor de la tapa de la celda para la electroforesis.

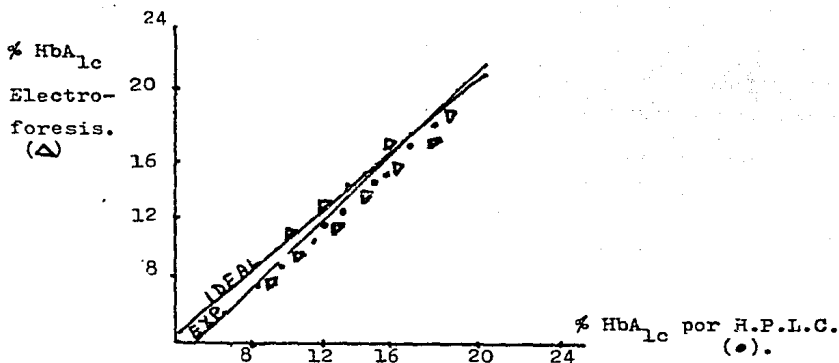
Aplicar 60 V. por 40 minutos, se coloca el gel a 53°C por 20 minutos en el horno, enjuagar el revés del gel y determinar la porción de hemoglobina glicosilada, examinar por densitometría a 420 nm. con un densitometro Modelo 720.

Resultados.

Los valores para el rango de HbA_{1c} son de 5,6 a 7.5 % con una media de 6 % y una desviación estandar de 0.5 % en personas normales con una concentración de glucosa de 92.5 a 94.4 mg/100ml.

El valor medio para los pacientes diabéticos fué de 13.8 % con una desviación estandar de 0.5 % y su valor de glucosa en sangre fué de más de 200 mg/100 ml.

Este método fué comparado con el de cromatografía líquida de alta presión (H.P.L.C.) y existe una buena correlación entre los dos métodos, como se muestra en la gráfica número 5. (39).



Gráfica No. 5.

"% de HbA_{1c} por electroforesis en gel agar y por cromatografía líquida de alta presión."

2.- MEDICIONES DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA SOBRE MEMBRANAS DE ACETATO DE CELULOSA POR AFINIDAD ELECTROFORETICA MOVIL. de (Jeffrey Ambler).

Fundamento.

En este método para separar la hemoglobina glicosilada en sangre sobre membranas de acetato de celulosa, se aplica la afinidad de la masa molecular menor del sulfato de dextran de la fracción no glicosilada, después las bandas son aclareadas y coloreadas cuantificando se las dos fracciones por densitometría.

Metodología.

La sangre se colecta en tubos con E.D.T.A. como anticoagulante se adicionan 100 ul. de sangre completa a 5 ml. de cloruro de sodio al 0.85 % en un tubo se centrifuga suavemente y centrifugando el fluido del sobrenadante se aspira completamente, 350 ul. de la solución hemolizante de saponina se le adiciona.

Para la electroforesis las membranas se equilibran con un buffer

de afinidad electroforética de pH=6.4 por 10 minutos en las cámaras electroforéticas separadoras Ann Arbar N.I. 48106 llenas de buffer.

El aplicador se carga con 7 ul. de muestra usando pipetor manual las membranas ya manchadas se colocan en la cámara y las muestras se aplican para que después sean absorbidas lentamente.

Después de la electroforesis de 150 V por 40 minutos las bandas fueron puestas rápidamente en coloración por 10 minutos, el exceso de colorante se quita con una agitación constante con lavadas de 50-ml/1 de ácido acético por 5 minutos.

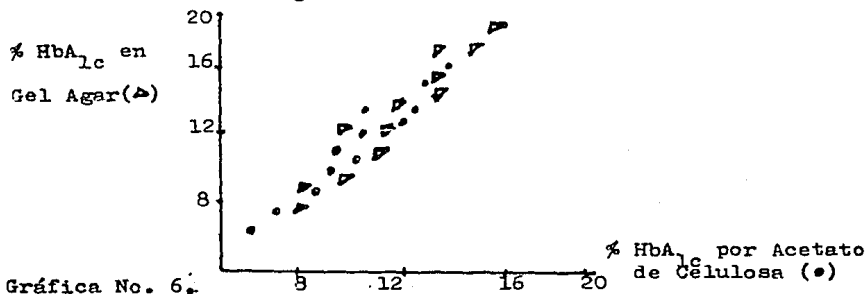
Las membranas son aclaradas por 2 minutos y se transfieren a un plato de vidrio y se exponen a 80-90°C por más de diez minutos hasta que queden transparentes.

Las separaciones del anodo son examinadas con un densitometro - A.C.D. 18 a una longitud de onda de 520 nm.

Resultados.

El coeficiente de variación para pacientes normales es de 0.49 - con un valor medio de 7.5 % y para pacientes diabéticos su coeficiente de variación es de 0.38 % con un valor medio de 15 %.

Se comparó este sistema con el de electroforesis en agar gel y se observó que existe una buena correlación dentro de los dos sistemas, como se indica en la gráfica número 6. (34).



Gráfica No. 6. "Cuantificación de HbA_{1c} por electroforesis en gel agar y por afinidad electroforética móvil en acetato de celulosa."

3.- DOSIFICACION DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA_{1c}) POR PUNTO - ISOELECTRICO de (R. Schoes).

Fundamento.

Se propone este método de dosificación como una rutina usando - una delgada capa de gel, se determina el punto isoeléctrico, ya que la hemoglobina migra con el alto voltaje en el gel de policrilamida a través de un gradiente de pH.

Metodología.

Una solución al 1 % de ácido ascórbico buffereada a pH=6.9 y un buffer de fosfatos 0.1 M. se añaden a un hemolizado de eritrocitos a razón de 1 ul. a 5 ul. de mezcla se coloca dentro de un papel filtro de 2.5 x 5 mm.

El gel de policrilamida consta de 10 ml. de glicerol al 87 %, a 0.75 ml. de un anfólito de pH=6.8; 0.4 ml. de una solución de ribo - flavina al 0.04 %. La solución se polimeriza y se pasa bajo la luz - de neón la diseeminación del gel es de 250 x 115 x 1 mm.

El gel modificado de policrilamida y un equipo multiporo L.K.B.- para punto isoeléctrico.

Los pozos de cristal son de 83 x 115 x 1 mm. colocados de lado a lado, se les añade un gel dentro del equipo original y el grosor del gel se reduce a 1 mm. cortando en tres partes iguales hace posible - la determinación densitométrica, después de la migración pueden migrar 27 muestras a la vez.

La migración y la localización de la hemoglobina se hace bajo un máximo de 20 Watts con una velocidad máxima de 30 V cm, al principio los pozos del gel de policrilamida se mantienen a 10°C con agua corriente y el tiempo de vinealización es de 90 a 120 minutos.

Después de la localización de la hemoglobina se hace una precipitación de proteínas con una solución de ácido tricloroacético y ácido sulfosalicílico al 5 %, el color de la hemoglobina hace un teñido superfluo.

Los pozos son leídos con un densitometro modelo Beckman 112 a -

660 nm.

Resultados.

Los niveles de HbA_{1c} en personas normales varían entre 3 y 7 % - con una media de 4.66 % y una desviación estandar de 1.05, los niveles para pacientes diabéticos son de 8 a 15 % con una desviación estandar de 1.8 (57).

EVALUACION DE LOS METODOS.

A.- Fotométricos.

a).- Ventajas.

1.- El análisis estadístico de estos métodos indican que existe una buena reproducibilidad en estos.

2.- Se procesan varias muestras al mismo tiempo.

b).- Desventajas.

1.- Una alta concentración del ácido utilizado para el procesamiento de la muestra y temperaturas elevadas en la reacción interfieren en ésta disminuyendo la intensidad de color y a su vez la concentración de hemoglobina glicosilada.

2.- Un almacenamiento del hemolizado por más de 48 horas — aumenta la concentración de HbA_{1c}.

3.- La hemoglobina fetal interfiere en la cuantificación de HbA_{1c} ya que por estos métodos no es posible separarla.

4.- Se requiere de más de 60 minutos para realizar la determinación de HbA_{1c} por estos métodos.

B.- Cromatográficos.

a).- Ventajas.

1.- Se emplea muy poca cantidad de muestra para cuantificar HbA_{1c} por estos métodos.

2.- El almacenamiento de los hemolizados a 4°C y a 22°C por más de 24 horas no afecta la concentración de HbA_{1c} ya que los valores encontrados de ésta en hemolizados almacenados a estas temperaturas y en frescos ha sido exactamente el mismo.

3.- El tiempo que se emplea para la ejecución de estos métodos es menor a los 60 minutos.

b).- Desventajas.

1.- Para realizar cualquiera de los métodos cromatográficos — anteriormente mencionados se requiere de equipo complicado.

2.- Cuando no se controla el pH indicado en la metodología - se eleva el valor de HbA_{1c} .

3.- Si la temperatura no es controlada la concentración de HbA_{1c} se incrementa.

C.- Electroforéticos.

a).- Ventajas.

1.- Se emplea poca muestra para la realización de la prueba.

2.- El análisis estadístico presenta una buena correlación - comparado con otros métodos que no sean electroforéticos.

3.- Se pueden procesar varias muestras al mismo tiempo.

b).- Desventajas.

1.- Un cambio de pH en la electroforesis afecta la concentra ción de HbA_{1c} que se obtenga.

2.- Si se presentan cambios de temperatura durante el proce- so se verá afectada la concentración de HbA_{1c} .

3.- Se emplean más de 60 minutos para la realización de es - tos métodos.

DISCUSION.

En los métodos fotométricos el material y equipo empleados para la cuantificación de hemoglobina glicosilada es de fácil adquisición para un laboratorio clínico de rutina ya que no hay necesidad de importar equipo y reactivos mencionados en los métodos.

En cuanto a su análisis estadístico presentan una buena correlación entre ellos, pero no con los cromatográficos y electroforéticos ya que se han procesado muestras de un mismo lote de pacientes - por estos métodos y existe una diferencia muy grande entre los valores encontrados de HbA_{1c}, generalmente se encuentran valores mucho más elevados en los fotométricos que en los demás, porque al realizar estos se debe de tener un especial cuidado en que la concentración - del ácido utilizado sea la correcta y que la temperatura también sea la indicada ya que si no se controlan estos dos factores alteran la concentración de la hemoglobina glicosilada.

Otro de las factores ó causas por las cuales la concentración de HbA_{1c} se altera es el almacenamiento de los hemolizados por un tiempo mayor a 48 horas ya que el valor encontrado no es el real por lo que se recomienda realizar el método en cuanto se obtenga la muestra de sangre.

Además si los datos proporcionados de HbA_{1c} no son reales el médico no controlará efectivamente al paciente con diabetes mellitus - y su terapia será insuficiente.

En los métodos fotométricos no es posible eliminar la interferencia de la hemoglobina fetal dentro del mismo método ya que al cuantificar la hemoglobina glicosilada también estamos cuantificando la fetal por lo que los resultados obtenidos son de las dos hemoglobinas, se podría pensar en una solución a este problema cuantificando por otro método a la hemoglobina fetal como puede ser un método cromatográfico, una vez obtenido el valor de la hemoglobina fetal se le restaría al valor obtenido de la hemoglobina glicosilada obtenido por -

métodos fotométricos, pero al realizar este sistema antes mencionado implica más tiempo, equipo, reactivos y presupuesto económico por lo que no es conveniente para un laboratorio clínico.

Por las razones anteriormente señaladas creemos que los métodos fotométricos son inadecuados para un estudio de rutina.

Los métodos cromatográficos son mucho más sensibles que los fotométricos, presentan una buena correlación estadística entre ellos y los electroforéticos, por lo que los hace reproducibles y confiables.

Se emplea poca cantidad de muestra y de reactivos por lo que los hace un poco más económicos en cuanto ya se tiene el equipo completo ya que si se va a adquirir por primera vez el costo de este es muy elevado.

Entre los factores que pueden interferir para la cuantificación de HbA_{1c} son el pH y la temperatura, pero son fáciles de controlar por la persona que realiza la prueba, además ofrecen la ventaja de que los hemolizados una vez preparados se pueden almacenar a 4°C y a 22°C por 7 días, para posteriormente trabajarse.

Por este razonamiento se propone que la metodología ideal de todas las cromatográficas es la propuesta por R.E. Davis porque es muy sensible, tiene buena reproducibilidad, emplea poco tiempo para su elaboración y no existen otras interferencias de otras hemoglobinas por lo que lo hace aún más confiable para poderse realizar como un examen de rutina en un laboratorio clínico.

En cuanto al equipo empleado es un poco complicado de conseguir en México ya que se utiliza resina Bio-Rex 70 y tanto el equipo como la resina son de importación y por el momento es inaccesible el empleo de este método y de otros que impliquen el uso de Bio-Rex 70 aunque las ventajas son muchas con respecto a otras.

Debido a esta situación creemos que los métodos electroforéticos que se basan en el punto isoelectrico de la hemoglobina glicosilada son una segunda opción, por su confiabilidad, sensibilidad y reactivos que se consiguen fácilmente por lo que se pueden utilizar para la cauntificación de hemoglobina glicosilada, otra ventaja que presentan en que se emplea muy poca cantidad de muestra y se procesan varias muestras al mismo tiempo.

Los factores que pueden afectar en un momento determinado son el pH y la temperatura y son controlados por la persona que efectua la prueba.

CONCLUSIONES.

- 1.- De acuerdo a la descripción y evaluación realizada en esta revisión de los métodos que existen para cuantificar hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), concluimos que la metodología ideal es la cromatográfica propuesta por R.E. Davis.
- 2.- La cuantificación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) en pacientes con diabetes mellitus es de utilidad para valorar la terapia de estos pacientes, a su vez concentraciones elevadas de HbA_{1c} indican especificidad para diabetes mellitus y para el seguimiento de las anomalías o secuelas de la enfermedad.
- 3.- La validez de la concentración de hemoglobina glicosilada para la detección o seguimiento de un control depende en gran parte del método utilizado.
- 4.- La cantidad de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) refleja el tiempo promedio de glicosilación.
- 5.- Para una buena utilidad clínica de la concentración de HbA_{1c} se requiere que las cantidades determinadas sean reales ya que es una medida integrada de glucemia en pacientes con diabetes mellitus sobre los 60 ó 90 días precedentes a la obtención de la muestra sanguínea.
- 6.- La cuantificación de HbA_{1c} puede ser un examen clínico de rutina ya que puede reemplazar otras pruebas de laboratorio clínico como son las glucemias en estado de ayuno y la determinación de glucosa en orina, ya que se evita la presencia del paciente diabético en el laboratorio frecuentemente y esta opción ofrece para él un estado emocional menos es -

tresado, además de que le permite al médico seguir más rigoro-
zamente su terapia.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ahmed K. Saleh and Mohamed A. Mousse " An automated liquid - chromatographic system for convenient determination of glycated hemoglobin. Clinical Chemistry 131(11):1972-1975 1985.
- 2.- Alperin B. Jack N.D. " Hemoglobins A levels in health and various hematologic disorders " American Journal Clin Pathol 67(3):219-226 1977.
- 3.- Arye Lev-Rand M.D. " Glycohemoglobin, its use in the follow-up of diabetes and diagnoses of glucose intolerance " Arch Inter Med 41(2):747-749 1981.
- 4.- Bar-Or Davis M.D."Glycosilated hemoglobin and late complications of diabetes mellitus " Journal Clin Invest 304(26):1007 1974.
- 5.- Berstein E. Ralph " Glycosilated hemoglobin; Hematologic considerations determine. Wich assay for glycohemoglobin is advisable" Clinical Chemistry 26(1):174-175 1980.
- 6.- Bookin M. Robert and Paul M. Gallop," Structure of hemoglobin A_{1c} nature of N-terminal B chain blocking group" Biochemical and Biophysical Research Communications 32(1);86-94 1968.
- 7.- Bolli G. Maria G. Cartechini " Hemoglobin glicosylated-considerations hematologics" Lancet 1206(1):1143-1144 1979.
- 8.- Braubitzer G. Chering Mueller " The structure of normal adult human hemoglobins" Physiol Chem 325(11):283-286 1961.
- 9.- Braunitzer G. Hilsman N."The composition of B chain of the main component of normal adult human hemoglobin" Physiol Chem 322(2): 96-100 1960.
- 10.- Braunitzer G. Lisbold B."The hemoglobin chemical structure - of the peptide chains in human hemoglobin A" Physiol Chem 320(34): 239-301 1960.
- 11.- Brenna Sand and Precive N. " Assessing the automatic DIAMAT - liquid chromatographic for glycosilated hemoglobins" Clinical Chemistry 32(5):896 1986.
- 12.- Chandrashekar V. Subramanian and Bhandaru R. " Photometric - determination of glycosilation of hemoglobin in diabetes mellitus" -

Clin Chem 26(12):1683-1687 1980.

- 13.- Cole R.A. J.S. Soeldner "A rapid method for the determination of glycosilated hemoglobins using high pressure liquid chromatographic" Metabolism 27(1):239-301 1978.
- 14.- Clegg J.B. "Separation of the alpha and beta chains of human hemoglobins" Nature 219(5):69-70 1983.
- 15.- Davidson Israel J.B. Henry "Diagnóstico Clínico por el Laboratorio" 7a edición Ed. Salvat. 1980.
- 16.- D.J. Nicold and D.H. Gurnov "Standardization of colorimetric assay for glycosilated hemoglobins" Clin Chem 29(9): 1694-1695 1983.
- 17.- D.O.E. Gebbart "Some factors affecting the determination of glycosilated hemoglobin levels in insulin dependent diabetes" Metabolism 29(7):1449-1450 1983.
- 18.- Daneman Denis Nancy "Diurnal glucose dependent fluctuations in glycosilated hemoglobin levels in insulin dependent diabetes" Metabolism 31(10):989-993 1982.
- 19.- Dix-Douglas "Evaluation of glycohemoglobin kit" Clin Chem 24(11):2073-2074 1978.
- 20.- Dunn P.J. and Cole R.A. Further development automation of a high pressure liquid-chromatographic method for the determination of hemoglobins glyated" Metabolism 28(7):777-779 1979.
- 21.- E.D. Abraham and Rufh Cope "Determination of the glycosilation hemoglobins (HbA_{1c}) with a new microcolumn procedure suitability of the technique for assessing the clinical management of diabetes mellitus" Diabetes 27(9):931-937 1978.
- 22.- E. Godsteins David and Randie L. Little "An commercially available paper sample ion exchange and affinity chromatographic for measuring glyated hemoglobin evaluated" Clin Chem 32(5):896 1986.
- 23.- E. Mullins Richard and Gart E. "Sensitivity of isoelectric focusing ion exchange and affinity chromatographic to labile glyated hemoglobin" Clin Chem 32(8):1460-1463 1986.
- 24.- Fraser D.M. and A.F. Smith "Glycosilated hemoglobin concen-

trations in newly diagnosed diabetes before and during treatment" -
British Medical 11(10): 979-981 1979.

25.- Fraser D.M. and M.B." Total glycosilated haemoglobin (HbA_{1c}) and relation of diabetes control to type of diabetic treatment" The British Journal of Clinical Practice 10(10):346-349 1979.

26.- Galloway A. John "Diabetes Mellitus" Lilly Research Laboratories Copyright 1978.

27.- G. Schertharner K.H." Glycosilated hemoglobin in chronic renal failure"Lancet 7(8): 774-779 1979.

28.- Glenn E. and Hamons Kurt "Evaluation of the minicolumns procedures for measuring hemoglobin A_{1c} " Clin Chem 28(8):1775 1980.

29.- Goteinier David "Glycohemoglobin a new test for evaluation of diabetic patient and its clinical importance" J.A.M.A 102(5):57-58 1981.

30.- Gubber A. Carolyn and Michael D. Koets "Quantitations of - hemoglobins A_{1a+b} and hemoglobin A_{1c} by automated high-performance liquid chromatographic" Clin Chem 25(11):1970-1971 1979.

31.- H. Franklin Bunn M.D. "Nonenzimatic glycosilation protein relevante diabetes" The American Journal of Medicine 70(4):325-330 1981.

32.- H. Keen Snagtang Fui "The determination and clasification - of diabetes mellitus" Clinics Endocrinol Metabolism 11(2):279-301 - 1982.

33.- Helena Laboratories "Glycosilated fast fracction hemoglöbin quick column method A micro-chromatographic metodölogy for the cuation- titation of glycosilated hemoglobin" 1980.

34.- Jefry Ambler and Boreck Janick "Measurement of glycosilated hemoglobin on acetate cellulose membranes by movile affinity eletro phoresis " Clin Chem 29(2):340-43 1983.

35.- Jinsyen Chou and Andrew Robinson "Simple method for estimig glycosilated hemoglobins and its evaluation of diabetic patient" Clin Chem 24(1): 1708-1709 1978.

- 36.- Jovanovic M.D. and Chartis M. Peterson " The clinical utility of glycosilated hemoglobin" The American Journal Medicine 70(8): - 331-337 1981.
- 37.- Krause R. John and M.D. Vietter " The affect of hemoglobin - F upon glycosilated hemoglobin determination" The American Journal Clinical Pathol 28(5): 767-769 1982.
- 38.- Marcia Simon and Jose Gaun " Hemoglobin A_{1c} by isoelectric - focusing" Clin Chem 28(1):9-12 1982.
- 39.- Menard Lionel and M.E. Demsey " Quantitative determination - of glycosilated hemoglobin by agar gel electrophoresis" Clin Chem - 26(11):1598-1602 1980.
- 40.- Perutz M.F. " The hemoglobin molecule" Scientific American 6(2):76 1964.
- 41.- Perutz M.F. " Hemoglobin structure and respiratory transport" Scientific American 18(6): 68-86 1978.
- 42.- P.J. Bunn R.A. and Cole J.S. " Stability of hemoglobin A_{1c} - levels on repetitive determination in diabetes out patients" Journal Clinical Endocrinol and Metabolism 52(1):1019-1027 1981.
- 43.- Parker K. Michael and Jack D. " Improvement colorimetric - assay for glycosilated hemoglobin" Clin Chem 27(5): 669-673 1981.
- 44.- Ploytur S. and M. Burrin " Rapid in vitro glycosilated of the moglobin a hazard of colum chromatographic but no colorimetric tecni ques" Clin Chem 28(5):1233-1234 1982.
- 45.- P. Mann Nicholas and Derk " Total glycosilated hemoglobin- A_{1c} levels in diabetic children" Archieves of Disease in Choolhod - 57(11): 434-437 1982.
- 46.- Pollak A.K. and Windalsh L. " Glycosilated hemoglobin A_{1c} and plasma lipoproteins in juvenile onset the diabetes mellitus" Acta - Paedriatic Scand 69(4):474-479 1980.
- 47.- Postmes J. Th and Halders H. " Colorimetry vs. colum chroma tographic in HbA_{1c} assay" Clin Chem 27(4):635-636 1981.

- 48.- R.D.G.Leslie and D.A.pyke " Interlaboratory standarization- of the hemoglobin" The Lancet 10(11): 773 1979.
- 49.- R. Little Randie and Jack " Interlaboratory standarization- of glycated hemoglobin determinations by affinity chromatographic" Clin Chem 32(2):358-360 1986.
- 50.- R. Little Randie and Edith M." Collection of blod of paper- filter measurement of glycated hemoglobin by affinity chromatographic Clin Chem 32(5): 869-871 1980.
- 51.- Rand G. Philip Cristine Nelson " Improvements in hemoglobin A determination for rapid cation exchange chromatographic affinity" Clin Chem 26(8): 1209-1210 1980.
- 52.- Randie R. Little Jack " Effects of whole storage on results for glycosilated hemoglobin as measurement by on exchange affinity - chromatographic and colorimetric" Clin Chem 29(6):1113-1116 1983.
- 53.- R.E. Davis and D.J. "A rapid simplified method for rutine - measurement of glycosilated hemoglobins" The Lancet 178(3): 350 1978.
- 54.-Rabhar Samuel " Glycosilated hemoglobins" New York State Me- dicine 2(9): 553-557 1980.
- 55.- Robinson Andrew " Simple method estimating glycosilated he- moglobins and its application to evaluation of disbetic patient" Clin Chem 24(10): 1708-1710 1978.
- 56.- Saibebe Vicenzo and Luisa Brambila " Chromatographic and co- lorimetric detection of glycosilated hemoglobins a comparative analy- sis of two diferents methods" Clin Chem 93(4): 199.205 1979.
- 57.- Schoda R.S. and Barbette Lambort " Dosage of hemoglobin A_{1c} by isoelectric focusing" Clin Chem Acta 86(9): 61-65 1978.
- 58.- Smith B. David " Some aspects of structure hemoglobin" Cana- dian Journal Biochemistry 42(4): 755-762 1964.
- 59.- Spicer M.K. and Allen " A simplified assay of hemoglobin - A_{1c} in diabetic patients by use of isoelectric focusing and cuantita- tive microdensitometry" Diabetes 27(4): 481.483 1977.

60.- Vetter V.E. and Hubse " Haemoglobin A_{1c} a predictor for duration of the remission phase in juveniles insuline dependent diabetes patients" Acta Paediatric Scand 69(1): 481-483 1980.

61.- Walinder Olov and Gunnar " New spectrophotometric method for determination of hemoglobin A_{1c} compared with a microcolumn technique " Clin Chem 28(1); 96-99 1982.

62.- W.L. Williams and D.C. Savage " Glycosilated haemoglobins in children with diabetes mellitus" Archives of Disease in Childhood 54(7): 285-298.

63.- W.G. Wood Ph and Clegg " Development biology of human hemoglobin " Progress in Hematology 32(5): 43-46 1980.

64.- Wintrobe M. Maxwell "Hematología Clínica" Ed. Interamericana 6a edición Tome I 5671979