

1988 - 92

085372408

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“ HEMOGLOBINA GLUCOSILADA EN FAMILIAS CON DIABETES
MELLITUS TIPO I. POR UN METODO CROMATOGRAFICO
Y UNO COLORIMETRICO ”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A:

MARICELA CASAS CASTAÑEDA

GUADALAJARA, JAL.,

1994

T E S I S

**HEMOGLOBINA GLUCOSILADA EN
FAMILIAS CON DIABETES
MELLITUS
TIPO I POR UN METODO
CROMATOGRAFICO
Y UNO COLORIMETRICO**

PRESENTADA POR:

MARICELA CASAS CASTAÑEDA

DIRIGIDA POR:

M en C. BERTHA IBARRA CORTES

Esta Tesis fué elaborada en el Centro de Investigación Biomédica de Occidente, División de Genética, Laboratorio de Bioquímica II del Centro Médico Nacional de Occidente, Instituto Mexicano del seguro Social. Bajo la Tutoría de la M. en C. Bertha Ibarra Cortés y la Asesoría de: M. en C. Francisco Javier Perea Díaz y M. en C. Alma Rosa Villalobos Arambúla.

DEDICATORIAS

A DIOS

Por haberme dado la vida y todo lo que me rodea

A MI MADRE

Si pones a Dios en todo lo que haces lo encontraras en todo lo que acontece.

Esta tesis es dedicada especialmente a ti por que tu me has enseñado a valorar lo que Dios nos pone a nuestro alcance y gracias a esto he podido realizar un paso más de mi caminar, gracias te doy por todo el apoyo, cariño y amistad que me has brindado durante toda mi vida.

A MIS HERMANOS

Paty, Belén, Humberto con sus respectivos esposos (as) e hijos que de alguna manera han estado conmigo en la realización de esta tesis otorgandome su apoyo moral en mi superación.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

La vida siempre es más hermosa cuando es compartida con un amigo.

A todos mis compañeros de la Facultad por tantos momentos y experiencias vividas que pasamos juntos, y a mis grandes amigas especialmente a Gina, Silvia, Adriana, Rosa y Trinidad.

A Juan, Arturo, Lidia y Gabriel por su valiosa amistad, comprensión y por el apoyo que me han brindado durante mi superación personal y académica.

AGRADECIMIENTOS

DE UNA MANERA MUY ESPECIAL A:

M. en C. BERTHA IBARRA CORTES

*Las mejores cosas y las más bellas del mundo
no pueden ser vistas siquiera tocadas.
Deben ser sentidas con el corazón.*

Bety no sabes lo agradecida y contenta que estoy de poder trabajar contigo y con todos los del Laboratorio. Siento que no pude haber estado mejor que con ustedes, tuve experiencias muy gratas durante la realización de la tesis y eso te lo debo a ti. Gracias por la confianza, conocimientos, apoyo y amistad que me has brindado.

M. en C. FRANCISCO JAVIER PEREA DIAZ

*Hay dos maneras de hacer las cosas:
una bien y otra nada más para salir
del paso, lo que se hace bien se hace
para siempre.*

Javi muchas gracias por todo lo que me has ayudado durante la elaboración de la tesis y mi superación académica. Es muy grato trabajar con personas que además de transmitirme sus conocimientos también te brinden su amistad, gracias Javi por creer en mi.

M. en C. ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA

*Toda semilla que se siembra tarde
o temprano florece.*

Alma a veces las palabras salen sobrando yo no soy muy expresiva pero quiero que sepas que estoy muy contenta de conocerte porque eres una muy linda persona. Te doy las gracias por todos los conocimientos que me has brindado, por tu amistad y confianza y sobre todo tu valiosa colaboración para que esta tesis se haya realizado.

DIVISION DE GENETICA HUMANA

A todos los Investigadores, Trabajadores y Estudiantes que se encuentran adscritos a esta división muchas gracias por todas las facilidades que me otorgaron para la realización de este trabajo.

LABORATORIO DE BIOQUIMICA II

Gracias a todos mis compañeros, Perita, Juan Carlos, Rosy, Edna, Lupita y Maru que aquí laboran por su amistad y apoyo que me brindaron para realizar este trabajo.

DRA. CARMEN RAMOS

Gracias por su valiosa colaboración en la obtención de las muestras estudiadas y por el tiempo e interés mostrado durante la realización de la tesis, y por todas las facilidades otorgadas en la obtención de material bibliográfico y esclarecimiento de dudas.

Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA

Gracias por su interés y colaboración, así como de su incalculable experiencia que prestó en la realización de esta tesis.

M. en C. LOURDES RAMIREZ DUEÑAS

Gracias por el interés y apoyo personal a mi tesis. Además por su ayuda en la revisión y crítica de la misma.

DR. JOSE MARIA CANTU GARZA y DR. SANCHEZ CORONA

Por el apoyo prestado en la revisión del escrito y crítica del mismo.

BIOL. GEORGINA HERNANDEZ FLORES

Por su incondicional ayuda en la obtención de las muestras estudiadas.

*A ti lector que por ahorro de espacio
no puedo nombrarte, y sin embargo,
me distingues al leer
el producto de mi esfuerzo y trabajo.*

	PAGINA
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	2
- DIABETES MELLITUS TIPO I	2
- DIABETES MELLITUS TIPO II	3
- DIABETES SECUNDARIAS	3
- DESARROLLO DE LA DM-I	5
- GLUCOSILACION DE LA HEMOGLOBINA	12
- IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACION DE LA HEMOGLOBINA A _{1c} (HbA _{1c})	15
- VENTAJAS DE LA CUANTIFICACION DE LA HbA _{1c}	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
	17
HIPOTESIS	
	18
OBJETIVOS	
	19
MATERIAL	
	20
METODOS	
	21
- 1.- Glucosa por el método Enzimático	21
- 2.- HbA _{1c} por el método Cromatográfico	22
- 3.- HbA _{1c} por el método Colorimétrico	25
RESULTADOS	
	33
DISCUSION	
	43
CONCLUSIONES	
	46
BIBLIOGRAFIA	
	47

RESUMEN

RESUMEN

En 10 familias con Diabetes Mellitus tipo I (DM-I), 20 individuos afectados con DM-I, y 40 familiares (FAM), (5 individuos con DM-II y 35 individuos normales), se determinó la hemoglobina glucosilada (HbA_1) por un método cromatográfico y otro colorimétrico, y los niveles de Glucosa en ayunas. Como grupo Control se incluyeron 6 familias sanas (26 individuos). Como era lo esperado, los valores más elevados de los parámetros estudiados se observaron en el grupo DM-I, seguido del grupo FAM DM-II, HbA_1 $\bar{X} \pm s$: 10.6 ± 2.3 y $9.1 \pm 0.7\%$; nmHMF (nmol hidroximetilfurfural/g de Hb) $\bar{X} \pm s$: 29.4 ± 5.6 y 25.6 ± 6.5 y Glucosa $\bar{X} \pm s$: 153 ± 88 y 79.6 ± 48.3 mg/dl respectivamente, en los 3 casos la p contra los grupos FAM Normales y Control fue < 0.001). Los grupos FAM Normales y Control no mostraron diferencias estadísticamente significativas (HbA_1 $\bar{X} \pm s$: 6.3 ± 1.0 y $6.2 \pm 0.8\%$; nmHMF $\bar{X} \pm s$: 18.8 ± 3.0 y 17.9 ± 3.2 y Glucosa $\bar{X} \pm s$: 88.4 ± 22.6 y 83.9 ± 15.1 mg/dl respectivamente).

Al analizar el grupo DM-I por subgrupos de acuerdo al grado de control metabólico reflejado por la HbA_1 , y considerando datos de referencia reconocidos internacionalmente, el subgrupo A con valores $< 8.0\%$ (buen control), el subgrupo B, entre 8.0 y 11% (control intermedio), y el subgrupo C $> 11.0\%$ (mal control), con el método cromatográfico se identificaron 4 (20%), 7 (35%) y 9 (45%) individuos respectivamente, mientras que con método colorimétrico se identificaron 3 (15%), 16 (80%) y 1 (5%) individuos. El mismo análisis en el grupo FAM normales y control, mostró por el primer método 3 y 1 individuos en el subgrupo B y por el segundo todos quedaron incluidos en el subgrupo A. Los estudios confirmatorios revelaron DM-II en los 3 primeros, y en el último una curva de tolerancia a la glucosa anormal. Estos datos indican, que aún cuando existe una alta correlación entre el método cromatográfico y el colorimétrico ($r = 0.8$ y $p < 0.001$), capaz de distinguir los individuos con DM-I o DM-II de los Controles y de sus familiares, el segundo carece de sensibilidad cuando los pacientes se encuentran en mal control.

Por otra parte, el coeficiente de variación intrafamiliar (cvi) de la HbA_1 en 6 de las 10 familias con DM-I estudiadas, 5 mostraron un alto cvi, $X = 19.8\%$, mientras que de las familias control, 4 mostraron cvi $< 10\%$ y 2 valores elevados 17.8% y 10.96% , el padre en ambas familias mostró alguna anomalía, HbA_1 elevada el primero (8.7%) e hipoglucemia el segundo (45 mg/dl) el primero corresponde al individuo identificado en el subgrupo B descrito previamente y el segundo los estudios confirmatorios revelaron que la curva de tolerancia era anormal. Estos datos sugieren que cuando existe algún grado de susceptibilidad genéticamente determinada se observa un mayor cvi en los niveles de HbA_1 , que permite distinguir a los individuos con DM-I o DM-II de los controles y aún de sus familias.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

La Diabetes Mellitus (DM) es una entidad determinada por diferentes factores genéticos y ambientales, con alteraciones en la síntesis, estructura o función de insulina, o de sus receptores, lo que se manifiesta con diferentes alteraciones bioquímicas, principalmente incremento de glucosa sanguínea (1). La prevalencia de la Diabetes Mellitus es difícil de estimar debido a que las frecuencias difieren de acuerdo a la raza, edad y sexo (1,2,3).

La clasificación más utilizada se basa en el fenotipo clínico del paciente, reforzado por la patogénesis de la hiperglucemia, (Tabla 1) en dos grandes grupos: A) Primarias; Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DM-I), Diabetes Mellitus Insulino Independiente (DM-II) y B) Secundarias (1,4,5,6).

A) Diabetes Primaria

Diabetes Mellitus Tipo I (Insulino-dependiente, DM-I)

Los pacientes con DM-I generalmente son delgados, la administración de insulina previene el desarrollo de cetosis, usualmente son menores de 30 años, ambos sexos están igualmente afectados, el 10% de los pacientes tienen un familiar diabético.

La hiperglucemia produce glucosuria, poliuria, polidipsia, pérdida de peso a pesar de polifagia, visión borrosa y fatiga (1,3,4,5).

La DM-I necesita de una base genética permisiva y un activador ambiental. El mecanismo etiopatogénico es la destrucción de las células β de Langerhans por un proceso autoinmune (1,7,8).

Diabetes Mellitus Tipo II (Insulino-Independiente, DM-II)

Algunos pacientes con esta enfermedad buscan atención por síntomas como glucosuria; muchos otros son captados durante el curso de investigaciones ginecológicas, oftamológicas, cardiovasculares, revisiones periódicas o por asociación con otras enfermedades (1,4).

Los individuos son usualmente obesos, se desarrolla cetosis solamente cuando hay estrés, habitualmente los pacientes inician a una edad mayor de 30 años, existe un porcentaje mayor de mujeres afectadas que de hombres (1,4,5).

La hiperglucemia en DM-II es el resultado de la combinación de una deficiencia de insulina y resistencia a la acción de esta misma. La deficiencia de insulina es ocasionada por una alteración en las células beta del páncreas con pérdida progresiva de respuesta a la glucosa. La resistencia a la acción de insulina es debida a la disminución en el número de receptores para insulina en la membrana citoplasmática de células blanco, o a bloqueos post-receptor para el metabolismo de glucosa intracelular (1,4,5,8,9).

B) Diabetes Secundarias

Denota el grupo de pacientes en quienes la hiperglucemia se desarrolla como consecuencia de otras enfermedades, o por terapias con drogas. Hay numerosas condiciones que ocasionan la diabetes secundaria, las más comunes son: Desórdenes Pancreáticos, Desórdenes Hormonales, Drogas, Receptores de Insulina, Síndromes Genéticos, y Desnutrición severa (1,4,5).

Tabla 1. CLASIFICACION DE DIABETES MELLITUS DE ACUERDO A SU ORIGEN.

PRIMARIA	CARACTERISTICAS
TIPO I. Insulino dependiente (DM-I)	Delgados, cetosis sin insulina Usualmente < 30 años Hombres=Mujeres
TIPO II. Insulino independiente (DM-II)	Usualmente obesos, cetosis solamente con tensión, usualmente > 30 años mujeres > hombres
SECUNDARIA	CARACTERISTICAS
Enfermedades pancreáticas	Pancreatectomia, pancreatitis crónica, carcinoma fibrosis quística, hemocromatosis.
Exceso hormonal	Síndrome de Cushing, acromegalia, feocromocitoma aldosteronismo, glucagonoma.
Drogas	Glucocorticoides, diuréticos, anticonceptivos orales, dilantin, antidepresores triciclicos etc.
Indisponibilidad del receptor a insulina	Con o sin anticuerpos circulantes.
Síndromes genéticos	Hiperlipemias, distrofia miotónica, lipoatrofia, ataxia de Friedreich, síndrome de Prader Willi, síndrome de Turner etc.
Otros	Principalmente desnutrición.

DESARROLLO DE DM-I

El desarrollo de la DM-I se divide en seis estadios, iniciando con la susceptibilidad genética y finalizando con la destrucción completa de las células B (10).

El primer Estadio es la susceptibilidad genética, algunos sujetos genéticamente susceptibles tienen una activación hipotética (Estadio II), y desarrollan una actividad autoinmune (Estadio III), inicialmente aún los pacientes con anormalidades inmunológicas tienen secreción normal de insulina. Durante el Estadio IV se va perdiendo progresivamente la secreción de insulina a pesar de los niveles normales de glucosa en sangre. En el Estadio V, la diabetes es clínicamente reconocida aún cuando hay secreciones bajas de insulina, desarrollándose hiperglucemia, el Estadio VI se caracteriza por una destrucción completa de las células B y aparición de complicaciones secundarias (10).

ESTADIO I. SUSCEPTIBILIDAD GENETICA

La predisposición genética para DM-I se asocia con la región HLA-D del complejo mayor de histocompatibilidad que comprende tres loci: DP, DQ y DR los dos últimos relacionados con la Diabetes (1, 11, 12).

Hace tiempo se descubrió que los genes que determinan las proteínas (Antígenos) DR1, DR3 y DR4 están presentes en más del 90% de los individuos con DM-I (1, 8, 10-16) mientras que DR2 y DR5 rara vez se encuentran (13, 14). Este hallazgo sugiere que los genes DR1, DR3 y DR4 aumentan la predisposición a la diabetes o que su herencia está ligada a un gen "sensibilizador", y los antígenos DR2 y DR5 confieren cierta

protección contra la enfermedad (13, 14).

El gen DR4 suele ir ligado al gen que codifica para una proteína DQ: la DQw3.2 (w constituye una designación provisional). Los individuos que heredan este arreglo genético son más propensos a sufrir diabetes, la sensibilidad a la enfermedad parece estar determinada por el aminoácido 57 de la cadena β de la proteína DQ, cuando esta posición se encuentra ocupada por el ácido aspártico la probabilidad de desarrollar la diabetes es baja y cuando esta ocupada por valina o serina el riesgo aumenta (14, 16).

Se puede concluir que la predisposición genética para desarrollar DM-I es necesaria, pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Podría ser que la susceptibilidad para una respuesta inmune anormal, y a autoinmunidad endócrina son los factores heredados.

ESTADIO II. ACTIVACION DE LA DM-I

Basados en algunas observaciones se ha sugerido la participación de factores ambientales (virus y algunas drogas) en la activación del proceso de autoinmunidad contra células β en los islotes del páncreas. Es difícil establecer el agente primario de los factores ambientales diabetogénicos ya que actúan durante años antes de desarrollar hiperglucemia (1, 7, 10).

Una lesión temprana en todas las formas de diabetes es la pérdida de la liberación de insulina inducida por glucosa (1, 4, 10).

ESTADIO III. PROCESO AUTOINMUNE

La causa primaria para el desarrollo del proceso autoinmune en DM-I es desconocida, sin embargo, los estudios se han enfocado en dos áreas de interés: 1) El desequilibrio en inmunoregulación debido a anomalías en la función supresora de células T, y 2) la aparición de moléculas HLA de la clase II sobre la superficie de células B en el páncreas, donde normalmente no se encuentran (1, 10, 14).

Se han postulado dos hipótesis que explican el desarrollo del proceso autoinmune, pero a la fecha no han sido completamente comprobadas (1, 14, 17, 18).

ESTADIO IV. PERDIDA PROGRESIVA DE SECRECIÓN DE INSULINA

Este Estadio se caracteriza por una inflamación de los islotes (insulinitis) con pérdida específica de muchas células B productoras de insulina. Muchos pacientes diagnosticados tempranamente como DM-I tienen anticuerpos contra las células de los islotes (AcI), autoanticuerpos reactivos contra la superficie de los islotes (AcSI), o autoanticuerpos anti-insulina (AcAI). Antes de que se manifieste clínicamente la enfermedad, existe un período de latencia prolongado, identificado por la detección de AcI y/o AcAI, y por disminución de la secreción de insulina durante fases tempranas en la respuesta a glucosa intravenosa. Varios grupos demostraron que AcI y AcAI pueden ser utilizados como marcadores predictivos para DM-I (7, 19-24).

ESTADIO V DIABETES DECLARADA

En el Estadio V las células β se han destruido de un 80% a un 90% y no existe la insulina suficiente para controlar los niveles sanguíneos de glucosa, aún cuando, muchas células de los islotes producen glucagon, somastostatina, y otros polipéptidos.

Durante el tiempo que ocurre la destrucción extensiva de células β se inicia el desarrollo de hiperglucemia, (manifestación principal de la DM), debido a que no se introduce glucosa a las células, y no se produce suficiente energía, lo que conduce a fatiga. Cuando la glucosa no entra en la célula, aparece una sensación de hambre y el individuo come de más (*Polifagia*). Al disminuir los niveles de insulina, el glucógeno es degradado para proveer glucosa, las grasas son convertidas en energía y los aminoácidos son transformados por vías anabólicas a glucosa y energía, para satisfacer las demandas energéticas de las células, así se incrementan los niveles de glucosa y de metabolitos intermediarios los cuales tampoco son utilizados para abastecer las necesidades de las células corporales por la falta de insulina, volviéndose un círculo vicioso (5).

Esta sobrecarga de glucosa circulante al pasar por el riñón, no es recuperada por completo, y una gran parte es desechada a la orina (*glucosuria*), esto conduce a un aumento de la filtración y eliminación de agua por la orina, con micciones repetidas (*poliuria*). Como hay pérdida de agua por la orina, se presenta la sensación de sed (*polidipsia*), para recuperar los líquidos perdidos. Por lo tanto los síntomas clínicos que

se presentan en DM-I son: debilidad, poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso (5).

Otra consecuencia metabólica en la DM es la formación de cetoácidos o cuerpos cetónicos originados por degradación excesiva de grasas almacenadas (5, 25).

CETOACIDOSIS

La cetoacidosis puede ocurrir en cualquier época de la vida de los pacientes con DM-I. Como los niveles de azúcar circulante aumentan debido a la falta de insulina, el organismo pierde cantidades enormes de líquido, el paciente está deshidratado. El organismo degrada grasas en un intento por conseguir energía, produciendo los cuerpos cetónicos que son los productos finales de la degradación incontrolada, acumulándose en la sangre y desechándose en la orina (*Cetonuria*). Conforme se degradan las grasas se forman más cuerpos cetónicos y el paciente se deshidrata más aún, el medio sanguíneo se vuelve ácido por los cuerpos cetónicos (*Cetoacidosis*), y los pacientes en este estado pueden llegar al coma (1, 5, 14).

ESTADIO VI COMPLICACIONES DIABETICAS

La dificultad principal de los pacientes diabéticos consiste en tener un control metabólico adecuado de glucosa con el fin de mantenerlos asintomáticos y evitar la glucosilación de proteínas por mecanismos no enzimáticos, proceso que está implicado en el desarrollo de complicaciones secundarias (5, 26, 28) como Retinopatías, Nefropatías, Neuropatías, y Arteriosclerosis. Estas complicaciones tardías o de larga

evolución son generalmente más serias que las complicaciones anteriormente discutidas (5).

RETINOPATIA

La retinopatía diabética se clasifica en: 1) retinopatía de fondo menos severa y 2) retinopatía proliferativa (1, 5, 26).

La enfermedad de la retina es la más seria de todas las complicaciones diabéticas del ojo. Los cambios iniciales se presentan sutilmente, los vasos retinianos y su membrana basal de soporte se debilitan y engruesan volviéndose frágiles e incompetentes (5, 29).

La retinopatía proliferativa, causa principal de ceguera en DM-I es debida a un proceso llamado neovascularización. Los vasos se rompen a través de la vaina retiniana, dentro del fluido del ojo, coloreando el vítreo de modo que se bloquea la visión, proceso llamado hemorragia vítrea. Afortunadamente las hemorragias pequeñas son absorbidas en algunos días o semanas, aún la hemorragia vítrea puede aclararse ya que el líquido del ojo se cambia continuamente. Las hemorragias mayores en vasos frágiles conduce a la formación de pequeñas vetas oscuras (5, 26).

Si las hemorragias son lo suficientemente grandes para cubrir una área sensitiva, ello interfiere con la visión (5, 26).

NEFROPATIA

La complicación más seria de larga duración en la DM-I es la Nefropatía, debida a una combinación de tres alteraciones como:

a) infección, b) esclerosis (endurecimiento de las pequeñas arterias renales) y c) daño a los glomérulos (aparato de filtración del riñón).

La función de filtrar los productos de desecho de la sangre y retener los elementos importantes para uso posterior se deterioran gradualmente, estos cambios aumentan a menudo con la evolución de la DM (1, 5, 30).

Al principio de las alteraciones, las proteínas que por lo común son retenidas por los riñones, empiezan a aparecer en la orina en cantidades crecientes (como por ejemplo albúmina); y en la sangre se retienen más productos de desecho (1, 5, 30).

NEUROPATIAS

La causa principal de la neuropatía se desconoce, los síntomas más comunes son entumecimiento moderado, hormigueo o dolor. Puede existir una pérdida de la sensibilidad o dolor intenso. Estos síntomas no dependen de la edad o sexo, y cualquier diabético puede presentar estas manifestaciones, en contadas ocasiones, un período de diabetes incontrolada precede a la aparición de los síntomas. Un posible origen de estas complicaciones es por una vía metabólica alterna descrita recientemente como "La vía del Sorbitol" (5, 25, 31).

ARTERIOSCLEROSIS

La DM produce alteraciones en el metabolismo de las grasas con manifestaciones sistémicas de arteriosclerosis en arterias de mediano y de gran calibre y lesiones específicas en las arteriolas que pueden observarse en el fondo del ojo (18).

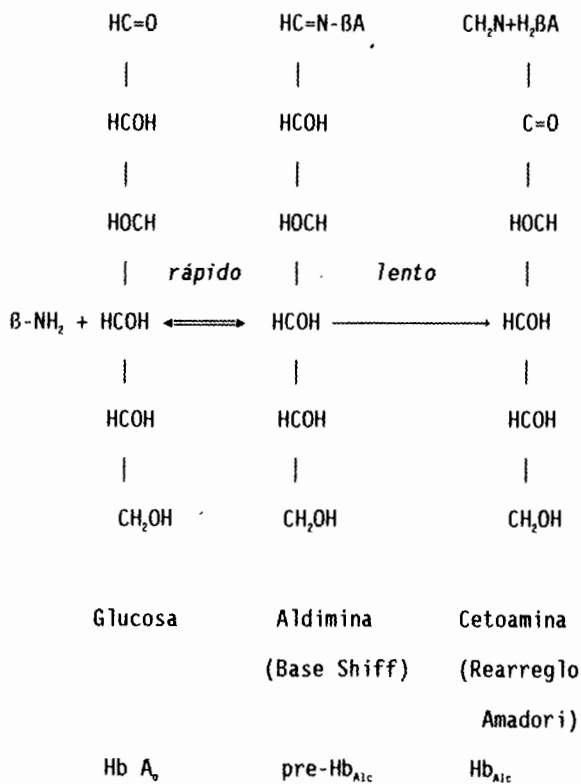
La arteriosclerosis esta caracterizada por la acumulación de colesterol y de esteres de colesterilo y de lipoproteínas que contienen Apo-B-100 en el tejido conjuntivo de las paredes arteriales. En las

enfermedades en las cuales ocurren en la sangre concentraciones elevadas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de baja densidad (LVL), y lipoproteínas de alta densidad (HDL) durante tiempos prolongados, como se encuentran en DM (5).

GLUCOSILACION DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina adulta (HbA_0 , α_2 β_2) normalmente en presencia de glucosa sufre un proceso de glucosilación no enzimática mediante la unión del grupo amino terminal de la cadena β de la HbA_0 con el grupo aldehído de la glucosa formando una base de Schiff (aldimina) altamente reversible e inestable, por la presencia de un doble enlace, que posteriormente es cambiado a un rearreglo de Amadori (cetoamina) por una reacción de reducción lenta, este enlace es estable e irreversible, formando así la hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}) (Esquema 1) (28, 33, 34, 35, 36).

Esquema 1. FORMACION DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA



En general, HbA₁ describe una porción de la HbA₀, que se modifica por la adición de diferentes azúcares mediante un mecanismo no enzimático, las formas HbA_{1a1} y HbA_{1a2} tienen azúcares fosfatados (<1%), la HbA_{1b} manosa (1%) y la HbA_{1c} glucosa (33, 34). La síntesis de HbA₁ ocurre continuamente en el eritrocito durante los 120 días de su vida, y su concentración refleja el promedio de los niveles de glucosa en sangre (33, 35, 36).

La HbA₁ ha sido utilizada por más de una década para monitorear el control metabólico (2 a 3 meses previos) de la glucosa sanguínea en pacientes con DM, sin llegar a discernir la DM-I de la DM-II (33, 34, 35).

Se ha reportado una alta correlación entre los valores de glucosa sérica y los de HbA₁ (33, 37). La cuantificación de otras proteínas glucosiladas permiten monitorear tiempos más cortos del control metabólico, por ejemplo las proteínas séricas permiten evaluar de 15 a 20 días, y distinguen entre DM-I y DM-II (37), la calmodulina plaquetaria puede evaluar de 10 a 14 días aún cuando no depende del estado glucémico del individuo (38). La Asociación Americana de Diabetes establece los siguientes valores de HbA_{1c} como un valor indicativo del grado de control metabólico en pacientes con DM-I: **en buen control <8.0%, en control intermedio entre 8 y 11% y sin control >11%** (39). Recientemente, se desarrolló un método inmunológico para cuantificar los productos terminales de la glucosilación progresiva en Hb (Hb-AGE), útil para evaluar la contribución de la glucosilación gradual en complicaciones

diabéticas (40).

La HbA_{1c} se ha empleado además como prueba de tamizaje de DM en estudios epidemiológicos en individuos no diabéticos, han mostrado una distribución normal con ligeros incrementos en individuos con varios factores de riesgo (edad, obesidad, historia familiar de diabetes, e hijos con alto peso al nacimiento) (41, 42, 43, 44) La validez de la HbA_{1c} para el control metabólico o para la detección de DM depende en gran parte del método utilizado para medirla, algunos requieren de aparatos sofisticados que quedan fuera del presupuesto de laboratorios clínicos de primero y segundo nivel de atención médica, otros basados en colorimetría resultan sencillos y económicos, y otros más, disponibles comercialmente, porque son costosos para realizarse de manera cotidiana (43).

IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACION DE LA HbA_{1c}, - La importancia de conocer los porcentajes de HbA_{1c} es resumida en los siguientes puntos:

- 1.- Para juzgar el grado de control de los niveles de glucosa.
- 2.- Para juzgar el manejo y control terapéutico.
- 3.- Para identificar sujetos tratados con insulina con alto riesgo de hipoglucemia

VENTAJAS DE LA CUANTIFICACION DE HbA_{1c},

- 1.- El paciente no requiere ayuno previo a la toma de sangre
- 2.- Es formada lenta e irreversiblemente durante el período de vida del eritrocito
- 3.- Su formación depende de la concentración de glucosa en sangre y el tiempo que se exponga el eritrocito.

- 4.- Provee un control de glucosa de dos a tres meses precedentes a la toma.
- 5.- No es modificada por fluctuaciones de glucosa en sangre recientes o pasajeras.
- 6.- Mide la fracción de Hb unida a la glucosa.

— PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La HbA_{1c} ha sido utilizada como un indicativo del control metabólico en DM, ya que el nivel observado en un momento dado refleja lo ocurrido en los últimos 2 a 3 meses por lo que se recomienda medirla al menos una vez cada 3 meses. Sin embargo, este procedimiento es caro por lo que su uso en la medicina institucionalizada en nuestro país es reducido. Dado que se ha descrito un método colorimétrico sencillo, confiable y económico (Parker et al, 1981), nos propusimos investigar, por una parte, si realmente este método tiene las características descritas y, por la otra, si es suficientemente sensible para ser utilizado como indicativo del control metabólico en las clínicas de primero y segundo nivel. Para ello seleccionamos familias con al menos 2 miembros afectados con DM-I en quienes además investigamos el grado de variación intrafamiliar en los niveles de HbA_{1c} (en los sanos) y la posibilidad de detectar tempranamente a individuos afectados.

_____ **HIPOTESIS**

HIPOTESIS

La HbA_{1c}, cuantificada por el método colorimétrico es suficientemente sensible para identificar pacientes con DM-I en mal control.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1.- Evaluar la HbA_{1c} en pacientes con DM-I e individuos normales con los métodos colorimétrico y cromatográfico.

2.- Comparar la confiabilidad de los valores de HbA_{1c} obtenidos por ambos métodos.

3.- Analizar si los valores de HbA_{1c} de los familiares sanos en familias con DM-I son diferentes a los valores de las familias normales.

4.- Investigar la variabilidad intrafamiliar de los niveles de HbA_{1c} en familias con DM-I.

5.- Facilitar las condiciones de trabajo del método colorimétrico de manera que pueda implementarse en laboratorios de primero y segundo nivel de atención médica.

MATERIAL

MATERIAL

El trabajo se realizó en 10 familias con DM-I, que incluyen a 20 individuos con DM-I y 40 familiares (FAM), estos últimos están divididos en 5 individuos con DM-II y 35 Normales. El diagnóstico de DM-I o DM-II fue realizado por el Servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades del CMNO, IMSS. Adicionalmente, se estudiaron 26 individuos de 6 familias sin antecedentes de DM como grupo control (Tabla II, Figuras 1a-c).

Tabla II. DISTRIBUCION DE LOS INDIVIDUOS ESTUDIADOS

FAMILIAS	GRUPO	n
10	DM-I	20 F = 16 M = 4
	DM-II	5 F = 3 M = 2
	FAM	35 F = 20 M = 15
6	CONTROL	26 F = 16 M = 10
TOTAL	16	86

METODOS

MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de sangre periférica (6-10 ml), por punción venosa en tubos con y sin anticoagulante. En las muestras obtenidas se realizaron las siguientes pruebas:

- 1.- GLUCOSA, por el método enzimático con GOD-PAD (Glucosa Oxidasa)
- 2.- HbA_{1c}, por Cromatografía de intercambio iónico.
- 3.- HbA_{1c}, por el método Colorimétrico.

1.- ESTIMACION DE GLUCOSA SERICA POR EL METODO ENZIMATICO

RECOLECCION Y PREPARACION DE LA MUESTRA

Se tomaron aproximadamente 2 ml de sangre por punción venosa sin anticoagulante y se separó el suero para la determinación de glucosa con el Kit STANBIO GLUCOSA GOD-PAD (STANBIO™).

FUNDAMENTO

La glucosa en presencia de la enzima glucosa oxidasa (GOD) es oxidada a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno formado, reacciona bajo la influencia de peroxidasa (POD) con el fenol y 4 aminofenazona para formar un complejo rojo-violeta de quinona. La intensidad del color es proporcional a la concentración de glucosa.

REACCION



REACTIVOS

Buffer de fosfatos, pH 7.5 (0.1 mol/l)

4-aminofenazona, (0.25 mmol/l)

Fenol (0.75 mmol/l)

Glucosa Oxidasa (15.0 U/ml)

Peroxidasa (1.5 U/ml)

Estándar de glucosa

100 mg/dl (5.56 mmol/l) de Glucosa en solución acuosa de ácido benzoico.

2.- HbA_{1c} POR EL METODO CROMATOGRAFICO

Este método consiste en separar por cromatografía de intercambio catiónico la HbA_{1c} de la Hb total mediante un gradiente de pH.

REACTIVOS

Kit diagnóstico para Hemoglobina glucosilada (Sigma Chemical Co.)

PROCEDIMIENTO

1.- Medir 200 μ l del reactivo hemolizante en un tubo de vidrio, agregar 50 μ l de sangre total (con EDTA al 10%), limpiar el exceso de sangre en el exterior de la punta, lavar la punta tomando y expulsando el líquido de 2 a 3 veces.

2.- Agitar constantemente.

- 3.- Preparar una columna nueva para cada prueba como sigue:
 - a) Quitar el tapón superficial de la columna
 - b) Quitar el tapón inferior de la columna
 - c) Espere a que drene el buffer que trae la columna hasta el disco, en este punto, la columna deja de fluir.
- 4.- Colocar 50 μL del hemolizado directamente sobre el disco y esperar hasta que se absorba completamente dentro del disco.
- 5.- Lavar las paredes de la columna con 200 μL del buffer de lavado HbA_1 , hasta que drene el nivel del líquido al tope del disco.
- 6.- Colocar la columna dentro de otro tubo limpio y añadir 4.0 ml del buffer de lavado Hb A_1 , para obtener la fracción de lavado que contiene la HbA_1 .
- 7.- Cambiar a otro tubo y añadir 4.0 ml de la solución eluyente, para colectar la fracción de elusión y diluirla con 16 ml de agua destilada.
- 8.- Medir la densidad óptica (DO) a 415 nm. (nota: realizar la medición en el transcurso de una hora de recolectada la fracción).
- 9.- Calcular la concentración de HbA_1 mediante la siguiente formula:

$$\text{HbA}_1 (\%) = \frac{W}{W+5E} 100$$

DONDE

W = DO fracción de lavado

E = DO fracción de elusión

EJEMPLO

D.0

$$HbA_1 (\%) = \frac{230}{0.230 + 5(0.416)} 100 = 10.0\%$$

W = 0.230

E = 0.41

Si el ensayo se realiza a una temperatura diferente a 23°C es importante realizar una corrección de temperatura (Tabla III).

Tabla III. CORRECCION DE TEMPERATURAS.

<u>Temp en que la prueba fue desarrollada</u>	<u>Factor de Corrección</u>	<u>intercepción de Y</u>
18	1.46	1.81
19	1.34	1.32
20	1.24	0.89
21	1.15	0.55
22	1.07	0.26
23	1.00	0
24	0.94	-0.22
25	0.89	-0.42
26	0.84	-0.60
27	0.80	-0.76
28	0.76	-0.87

Ejemplo con temperatura corregida.

Temperatura ambiente = 26 °C

$$\text{HbA}_1 \% = (10.0)(0.84) + (-0.60) = 7.80\%$$

3.- HbA₁ POR EL METODO COLORIMETRICO

Los valores de HbA₁ se determinaron por el método colorimétrico descrito por Parker et al (45). El método se fundamenta en la conversión de la porción hexosa de la Hb glucosilada en 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) por calentamiento a 100°C en presencia de un ácido débil (ácido oxálico). El HMF formado reacciona con el ácido 2-tiobarbitúrico formando un compuesto de color amarillo que se mide a 443 nm. Los valores de HbA₁ son expresados en nM de HMF o en equivalentes de fructosa (µM/L).

OBTENCION DE LA MUESTRA

Se tomaron aproximadamente 4 ml de sangre periférica por punción venosa en tubo vacutainer con EDTA al 10 %.

PREPARACION DEL HEMOLIZADO

- 1.- Centrifugar la sangre por 10 minutos a 3000 rpm, remover el plasma y lavar el paquete celular 3 veces con 5 volúmenes de solución salina al 0.15 M.
- 2.- Lisar el paquete de eritrocitos con 2 volúmenes de agua destilada y un volumen de tetracloruro de carbono, agitar vigorosamente y centrifugar a 3000 rpm durante 60 minutos, recuperar el sobrenadante sin tocar las membranas (estromas).

REPORTE DE ANOMALIAS

CUCBA

A LA TESIS:

LCUCBA00456

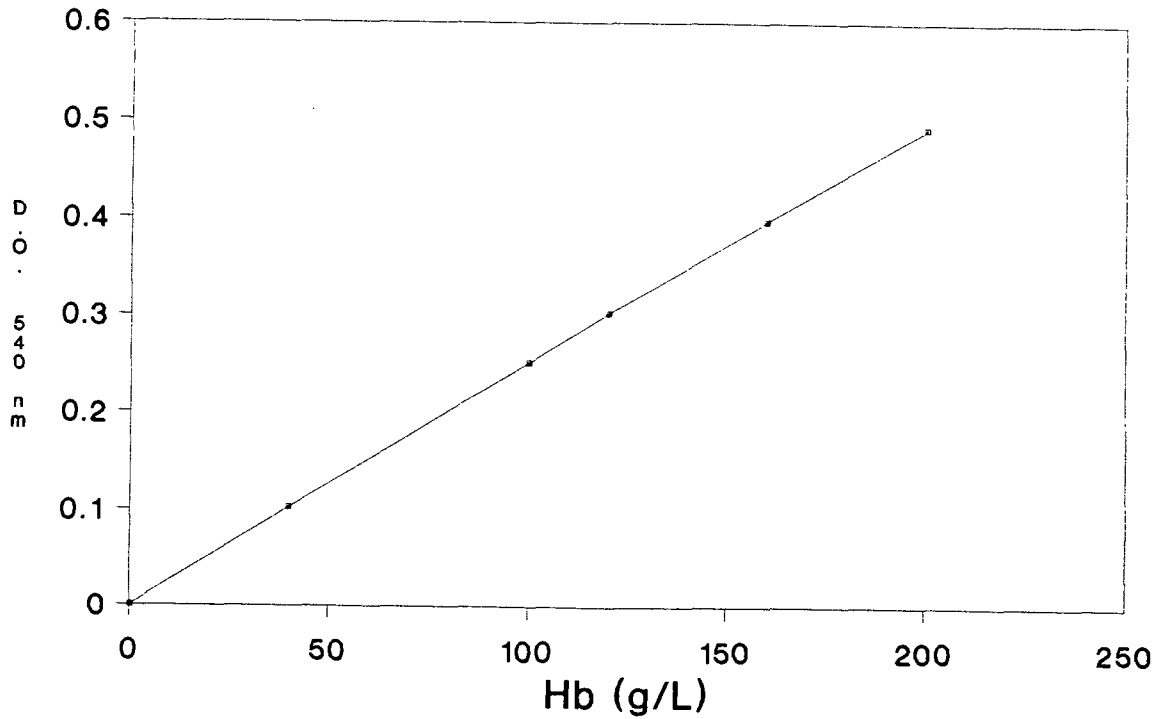
Autor:

Casas Castañeda Maricela

Tipo de Anomalía:

Errores de Origen: Faltan paginas 26 y 27

Grafica 1.
Curva de la concentración de Hb



Cálculos para ajustar el hemolizado a 10g/L

Formula: $V_1C_1=V_2C_2$ Despejando

V_1 tenemos

$$V_1=V_2C_2/C_1$$

DONDE: [hemolizado]= DO hemolizado \bar{X} FC

$$DO= 0.335$$

$$(0.335)(401.5)= 134.82 \text{ g/L}$$

$$V_1= ?$$

$$V_1=(7000\mu\text{l})(10 \text{ g/L}) / 134.82 \text{ g/L}$$

$$C_1= 134.82 \text{ g/L}$$

$$V_1= 70000\mu\text{l} \text{ g/L} / 134.82 \text{ g/L}$$

$$V_2= 7000 \mu\text{l}$$

$$V_1= 519.21 \mu\text{l}$$

$$C_2 = 10 \text{ g/L}$$

A un tubo de ensaye se adicionan 519.21 μl (Concentración del hemolizado sin diluir), añadir 6480.71 μl de agua destilada para ajustar el volumen a 7000 μl . Agregar a 5 ml de Drabkin, 20 μl de la muestra ajustada y leer a 540 nm. La DO se multiplica por el FC para obtener la concentración real del hemolizado ajustado.

$$DO = 0.026$$

$$FC= 401.25$$

$$[\text{Hemolizado}] = 0.026 \times 401.25= 10.43 \text{ g/L}$$

PREPARACION DE REACTIVOS

- 1 - ACIDO TRICLOROACETICO 400 g/L. Disolver 40 g de ácido tricloroacético y aforar a 100 ml con agua desmineraliza.
- 2 - SOLUCION SALINA 0.15 M. Disolver 8.76 g de cloruro de sodio y aforar a 1000 ml con agua desmineralizada.
- 3 - ACIDO OXALICO 0.5 M. Disolver 6.3 g de ácido oxálico en 100 ml de agua desmineralizada.
- 4 - ACIDO TIOBARBITURICO 0.05 M. Disolver 0.721 g de ácido tiobarbitúrico y aforar a 100 ml con agua desmineralizada. Ajustar el pH a 6.0 ± 0.1 con Hidróxido de Sodio 5 M.
- 5 - SOLUCION PATRON DE FRUCTOSA 1 mM. Disolver 180 mg de fructosa en solución salina 0.15 M y aforar a 100 ml.
- 6 - ESTANDAR DE FRUCTOSA. Diluir la solución patrón de fructosa 1 mM en solución salina para preparar estándares de las siguientes concentraciones: 40, 50, 60, 70 y 80 μM / L. (Tabla VI)

Tabla V. VOLUMEN DE SOLUCION PATRON DE FRUCTOSA PARA

PREPARAR 25 ml DE SOLUCION ESTANDAR.

$\mu\text{M}/\text{L}$	Solución Patrón 1M	
40 μM	- 1000 μl	
50 μM	- 1250 μl	
60 μM	- 1500 μl	Aforar a 25 ml con solu_
70 μM	- 1750 μl	ción salina.
80 μM	- 2000 μl	

PROCEDIMIENTO TECNICO

- 1 - En 3 tubos se coloca 1 ml de hemolizado con una concentración de hemoglobina aproximadamente de 10 mg/dl o 1 ml de cada uno de los estándares de fructosa. Se adiciona 1 ml de ácido oxálico 0.5 M.
- 2 - Incubar en autoclave a 121 libras de presión durante 1 hr.
- 3 - Enfriar a temperatura ambiente, y mezclar el contenido del tubo por inversión, adicionar 1 ml de ácido tricloroacético a cada tubo y mezclar.
- 4 - Filtrar en pipetas Pasteur con un botón de algodón
- 5 - A 1.5 ml del filtrado, adicionar 0.5 ml de ácido tiobarbitúrico, preparar un blanco para cada muestra omitiendo el desarrollo de color con el ácido tiobarbitúrico.
- 6 - Incubar todos los tubos, en baño maría a 40° C durante 30 min.
- 7 - Enfriar a temperatura ambiente y medir su absorbancia a 443 nm

INTERPRETACION DE RESULTADOS

La cantidad de HbA₁ puede expresarse en nM de HMF o equivalentes de fructosa en $\mu\text{M/L}$ (13).

Para la expresión de HbA₁ en nM de HMF se utilizó un valor de absorbitividad relativa de 0.009 para el aducto formado entre HMF y el ácido tiobarbitúrico, de acuerdo al ejemplo mostrado.

$$DO / 0.009 = \text{nM HMF.}$$

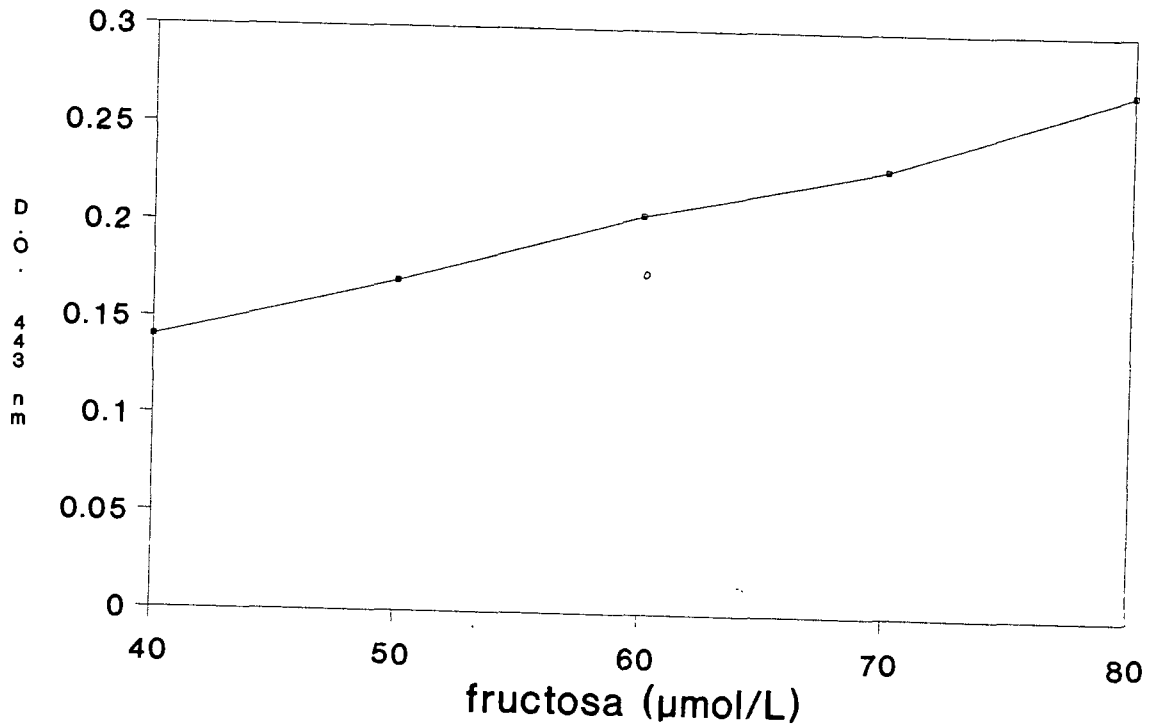
Además, se convirtió a equivalentes de Fructosa, utilizando la curva del estándar de Fructosa y la absorbancia de cada muestra (Gráfica 2).

Ejemplo:

DO de la muestra = .119

40 μ M	----	.140	X = 34 μ M Equivalentes de Fructosa
X	----	.119	

Grafica 2. Curva estandar de fructosa



valor promedio (n= 9)

RESULTADOS

RESULTADOS

En la Tabla VI se muestran los valores de HbA_{1c}, nmHMF, EqFruC y Glucosa en los grupos DM-I, FAM (DM-II y Normales) y Control. Puede observarse que el grupo DM-I mostró los valores más elevados en todas las pruebas, seguido del grupo FAM DM-II, FAM Normales y grupo Control. El análisis estadístico (t de Student) mostró diferencias significativas en todas las pruebas al comparar DM-I vs Control y DM-I vs FAM Normales (P_1 y P_5 con $P < 0.001$). Al comparar FAM DM-II vs Control y FAM DM-II vs FAM Normales (se observaron diferencias con $P < 0.001$, para HbA_{1c}, nmHMF y $P < 0.01$ para EqFruC, P_2 y P_6), pero no significativas para Glucosa. Los grupos DM-I vs FAM DM-II y FAM Normales vs Control no mostraron diferencias significativas (P_3 y P_4).

El análisis de correlación entre HbA_{1c} vs nmHMF y HbA_{1c} vs glucosa en todos los individuos estudiados mostró valores estadísticamente significativos (Tabla VII).

En la Figura 2 se muestran los valores de HbA_{1c} de los grupos estudiados, se observó que el grupo Control es homogéneo con excepción de un caso, en el grupo FAM la distribución es heterogénea debido a la presencia de DM-II, y en el grupo DM-I los valores están más dispersos. Lo mismo se aprecia cuando se analiza en base a los valores en nmHMF (Figura 3).

En la Tabla VIII analizamos los pacientes de acuerdo a los niveles establecidos de HbA_{1c} que indica el grado de Control Metabólico y observamos que de los pacientes con DM-I 4(20%) se encontraron en el subgrupo A (<8% que en base a los valores observados en nuestro grupo control corresponden a $\bar{X} + 2.25$ s), 7(35%) en el subgrupo B (>8% y < 11%) y 9(45%) en el subgrupo C (>11% $\bar{X} + 6$ s), de los 40 individuos del grupo FAM; los 5 con DM-II se encontraron en el subgrupo B y de los 35 Normales 32(90.7%) en el subgrupo A y 3(9.3%) en el subgrupo B. De los 26 individuos del grupo Control 25 se encontraron en el subgrupo A y 1(4%) en el subgrupo B (8.7%), (Fig 2).

Con el fin de formar por el método colorimétrico (nmHMF) subgrupos similares a los del método cromatográfico, se utilizaron los valores mencionados $\bar{X} + 2.25$ s, subgrupo A (<25.4 nmHMF), y $\bar{X} + 6$ s, subgrupo C (>37.1 nmHMF). En la Tabla IX se muestra la distribución de los individuos estudiados del grupo DM-I, se encontraron, 3(15%) en el subgrupo A, 16(80%) en el subgrupo B (>25.4 y <37.1 nm HMF) y 1(5%) en el subgrupo C; de los 40 individuos del grupo FAM 3(60%) con DM-II y 35(100%) Normales, se encontraron en el subgrupo A y 2(40%) con DM-II en el subgrupo B. Los 26 individuos del grupo Control se encontraron en el subgrupo A (Fig 3).

En la Tabla X se muestran los valores de HbA_1c , nmHMF, EqFruc y Glucosa de los subgrupos A, B y C del grupo DM-I y se observa que el subgrupo C mostró los valores más elevados en todas las pruebas, seguido del subgrupo B y el subgrupo A. El análisis estadístico (t de Student) mostró diferencias significativas al comparar los subgrupos A y B $p < 0.01$ para HbA_1c , $p < 0.05$ para nmHMF y EqFruc y no se encontró significancia para Glucosa. Al comparar los subgrupo A y C se observó $p < 0.001$ para HbA_1c , nmHMF y EqFruc y $p < 0.05$ para Glucosa, y al comparar los subgrupos B y C, $p < 0.001$ para HbA_1c y EqFruc, $p < 0.01$ para nmHMF y no se encontró significancia en Glucosa.

Al comparar el mismo grupo (DM-I), pero ahora respecto al grado de control reflejado por nmHMF (Tabla XI), se observó que para HbA_1c , nmHMF, EqFruc y Glucosa el subgrupo C mostró los valores más altos, seguido del subgrupo B y del subgrupo A. El análisis estadístico mostró diferencias significativas al comparar los subgrupos A y B $p < 0.01$ para HbA_1c , $p < 0.001$ para nmHMF y EqFruc y no significativas para Glucosa. Al comparar los subgrupos A y C $p < 0.01$ para nmHMF y EqFruc, y no significativas para HbA_1c y Glucosa, al comparar los subgrupos B y C se encontraron diferencias significativas para nmHMF y EqFruc $P < 0.01$, pero no para Glucosa.

Se analizó el coeficiente de variación intrafamiliar *cvi* en 6 de las 10 familias con DM-I estudiadas (Familias V a X, Figs. 1b y 1c) con los siguientes resultados: 4.96, 11.83, 14.26, 19.20, 23.44 y 28.00 que en promedio dan 16.34% si se toman en cuenta las 6 o 19.34% si se excluye el primer caso que presenta el *cvi* más bajo. Los *cvi* en las 6 familias control fueron de: 4.76, 6.79, 8.25, 9.72, 10.96 y 17.19%, con un promedio de 9.61%. El *cvi* del promedio observado en el grupo FAM normales es de 14.92% y de los controles es de 12.90%, lo cual difiere de lo observado al hacer el análisis intrafamiliar.

Figura 2
Representación de los porcentajes de HbA₁

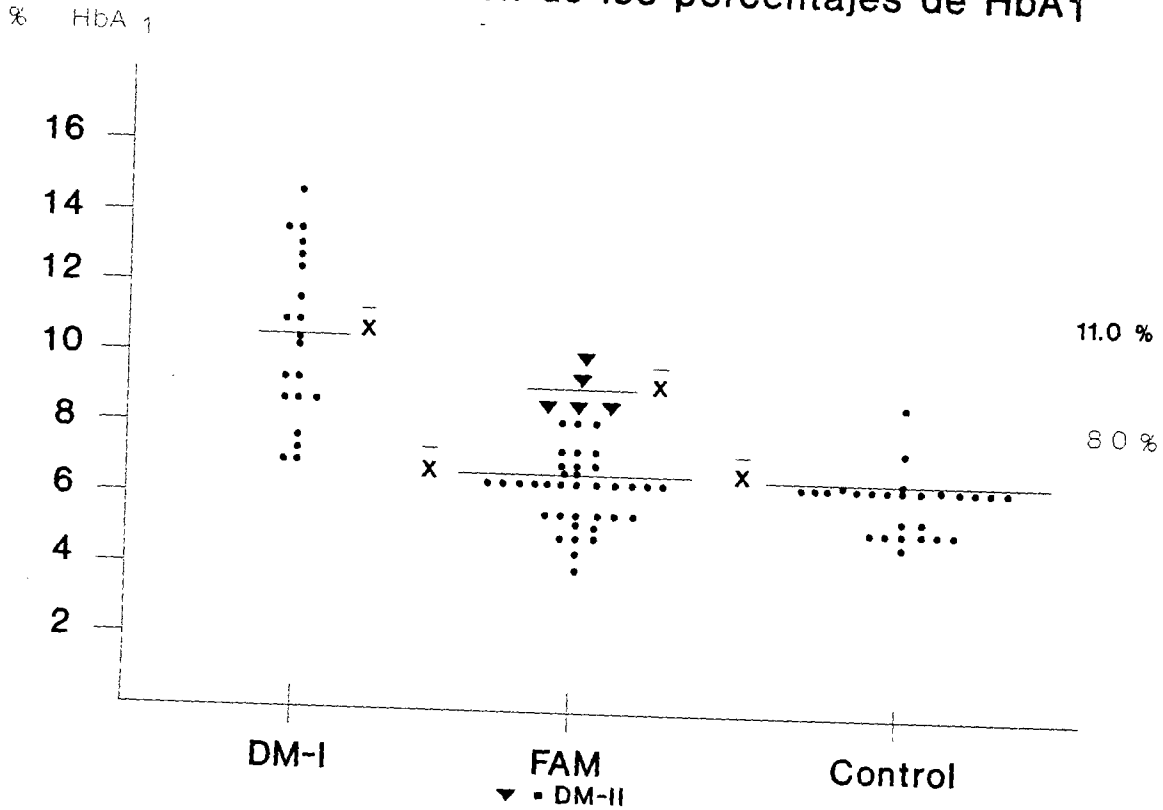


Figura 3
Representación de los valores de nm HMF

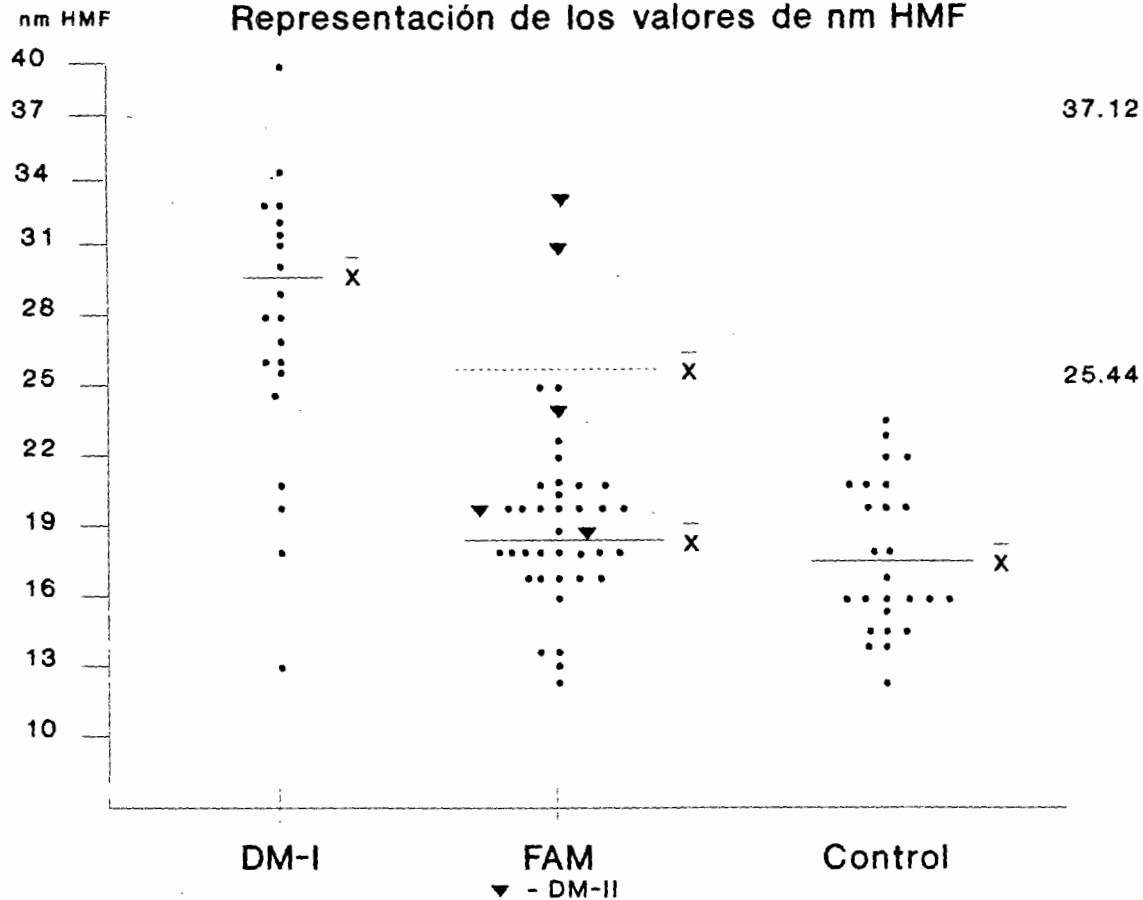


TABLA VI. Valores de HbA_{1c}, nmHMF, EqFruc y Glucosa en los grupos DM-I, FAM y Control.

		HbA _{1c} %	nmHMF	EqFruc	Glucosa (mg/dl)
DM-I	\bar{X}	10.6	29.4	75.1	153.0
	s	2.3	5.6	13.9	88.0
	n	20	20	20	20
DM-II	\bar{X}	9.1	25.6	60.2	79.6
	s	0.7	6.5	15.3	48.3
	n	5	5	5	5
FAM NORMALES	\bar{X}	6.3	18.8	48.4	88.4
	s	1.0	3.0	7.2	22.6
	n	35	35	35	35
CONTROL	\bar{X}	6.2	17.9	46.3	83.9
	s	0.8	3.2	8.5	15.1
	n	26	26	26	26
P ₁		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
P ₂		<0.001	<0.001	<0.01	NS
P ₃		NS	NS	NS	NS
P ₄		NS	NS	NS	NS
P ₅		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
P ₆		<0.001	<0.001	<0.01	NS

P₁= DM-I vs Control

P₂= FAM DM-II vs Control

P₃= FAM Normales vs Control

P₄= DM-I vs FAM DM-II

P₅= DM-I vs FAM Normales

P₆= FAM DM-II vs FAM Normales

TABLA VII. Análisis de Correlación de HbA_{1c} versus nmHMF y Glucosa

	TOTAL n=86	DM-I n=20	FAM NORMALES n=35	CONTROL n=26
HbA _{1c} vs nmHMF	r= 0.80 p<0.001	r= 0.80 p<0.02	r=0.26 p= NS	r= 0.53 p<0.01
HbA _{1c} vs Glucosa	r= 0.62 p<0.001	r= 0.56 p<0.02	r= 0.38 p<0.05	r=0.03 p= NS

TABLA VIII. Distribución de Individuos de los grupos DM-I, FAM y Control de acuerdo al porcentaje de HbA_{1c}

SUBGRUPO GRUPO	< 8% A	> 8% B	> 11% C
20 DM-I	4 (20%)	7 (35%)	9 (45%)
FAM 5 DM-II 35 NORMALES	32 (90.7%)	5 (100%) 3 (9.3%)	
26 CONTROL	25 (96%)	1 (4%)	
TOTAL = 86	61 (70.9%)	16 (18.6%)	9 (10.4%)

TABLA IX. Distribución de Individuos de los grupos DM-I, FAM y Control de acuerdo a nmHMF.

SUBGRUPO GRUPO	< 25.44 nmHMF A	> 25.44 nmHMF B	> 37.12 nmHMF C
20 DM-I	3 (15%)	16 (80%)	1 (5%)
40 FAM 5 DM-II 35 NORMALES	3 (60%) 35 (100%)	2 (40%)	
26 CONTROL	26 (100%)		
TOTAL = 86	67 (77.90%)	18 (20.93%)	1 (1.1%)

TABLA X. Valores de HbA_{1c}, nmHMF, EqFruc y Glucosa en el grupo DM-I de acuerdo al grado de control reflejado por el porcentaje de HbA_{1c}.

SUBGRUPO	< 8.0 A	> 8.0% B	> 11.0 C	
HbA _{1c} %	\bar{X} 7.7 s 0.3 n 4	9.5 0.7 7	12.8 1.1 9	P ₁ <0.01 P ₂ <0.001 P ₃ <0.001
nmHMF	\bar{X} 22.3 s 4.9 n 4	27.6 1.8 7	33.8 3.6 9	P ₁ <0.05 P ₂ <0.001 P ₃ <0.01
EqFruc	\bar{X} 57.3 s 12.6 n 4	70.8 4.5 7	86.3 8.3 9	P ₁ <0.05 P ₂ <0.001 P ₃ <0.001
Glucosa mg/dl	\bar{X} 94.5 s 78.6 n 4	126.0 88.7 7	200.7 72.3 9	P ₁ NS P ₂ <0.05 P ₃ NS

P₁ = % HbA_{1c}, subgrupo A vs B

P₂ = % HbA_{1c}, subgrupo B vs subgrupo C

P₃ = % HbA_{1c}, subgrupo A vs subgrupo C

TABLA XI. Valores de HbA_{1c}, nmHMF, EqFruc y Glucosa en el grupo DM-I de acuerdo al grado de control reflejado por nmHMF.

SUBGRUPO	<25.44 nmHMF A	>25.44 nmHMF B	>37.12 nmHMF C	
HbA _{1c} %	\bar{X} 7.6	11.0	12.5	$P_1 < 0.01$
	s 0.3	2.1	1.2	P_2 NS
	n 3	15	2	P_3 NS
nmHMF	\bar{X} 20.0	29.9	39.8	$P_1 < 0.001$
	s 1.6	2.8	1.8	$P_2 < 0.01$
	n 3	15	2	$P_3 < 0.01$
EqFruc	\bar{X} 51.2	76.8	98.1	$P_1 < 0.001$
	s 4.2	7.1	10.3	$P_2 < 0.01$
	n 3	15	2	$P_3 < 0.01$
Glucosa mg/dl	\bar{X} 99.0	161.5	173.0	P_1 NS
	s 95.7	84.1	137.2	P_2 NS
	n 3	15	2	P_3 NS

P_1 = nmHMF subgrupo A vs B

P_2 = nmHMF subgrupo B vs subgrupo C

P_3 = nmHMF subgrupo A vs subgrupo C

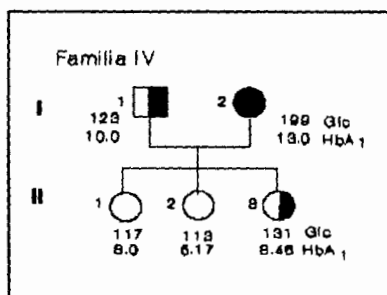
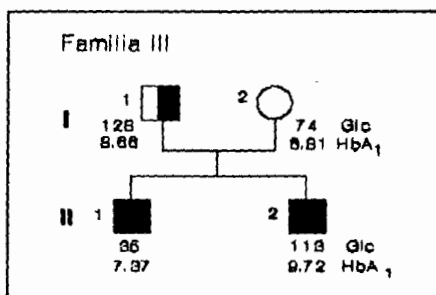
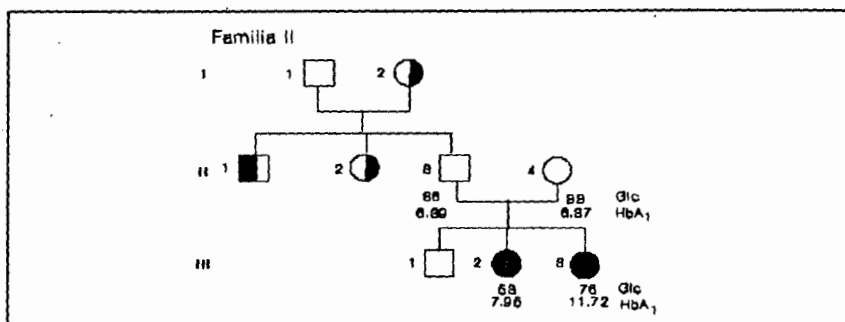
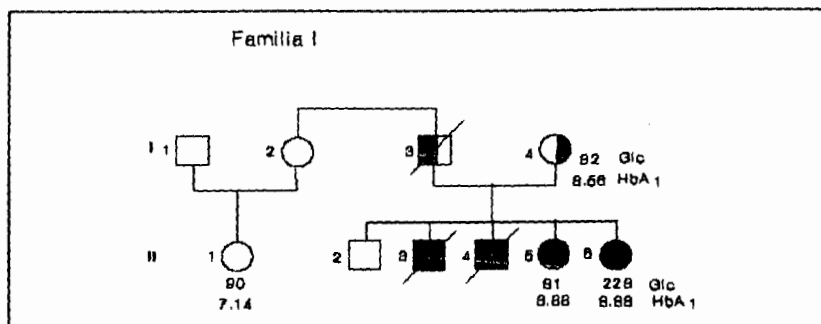


Figura 1a. Arboles genealogicos de las familias con DM-I estudiadas. Los circulos y cuadros oscuros representan pacientes con DM-I, los incompletos a los DM-II.

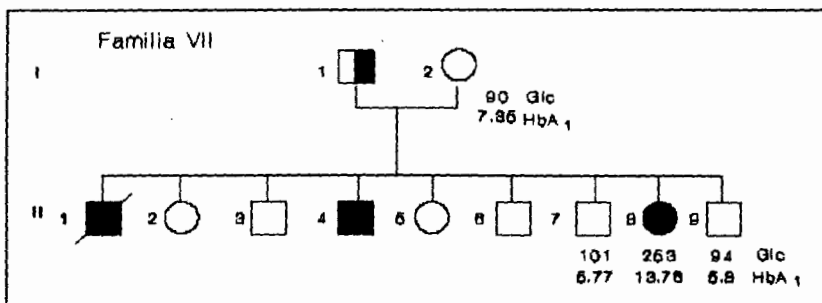
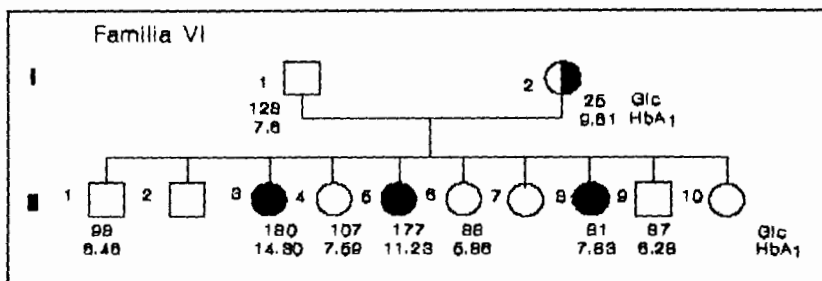
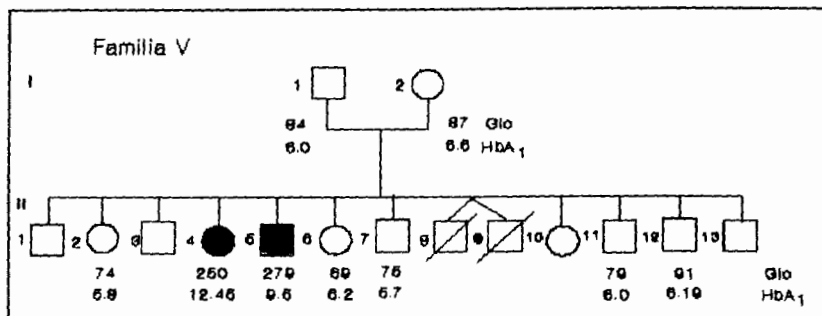


Figura 1b. Arboles genealogicos de las familias con DM-I estudiadas. Los circulos y cuadros oscuros representan pacientes con DM-I, los incompletos a los DM-II.

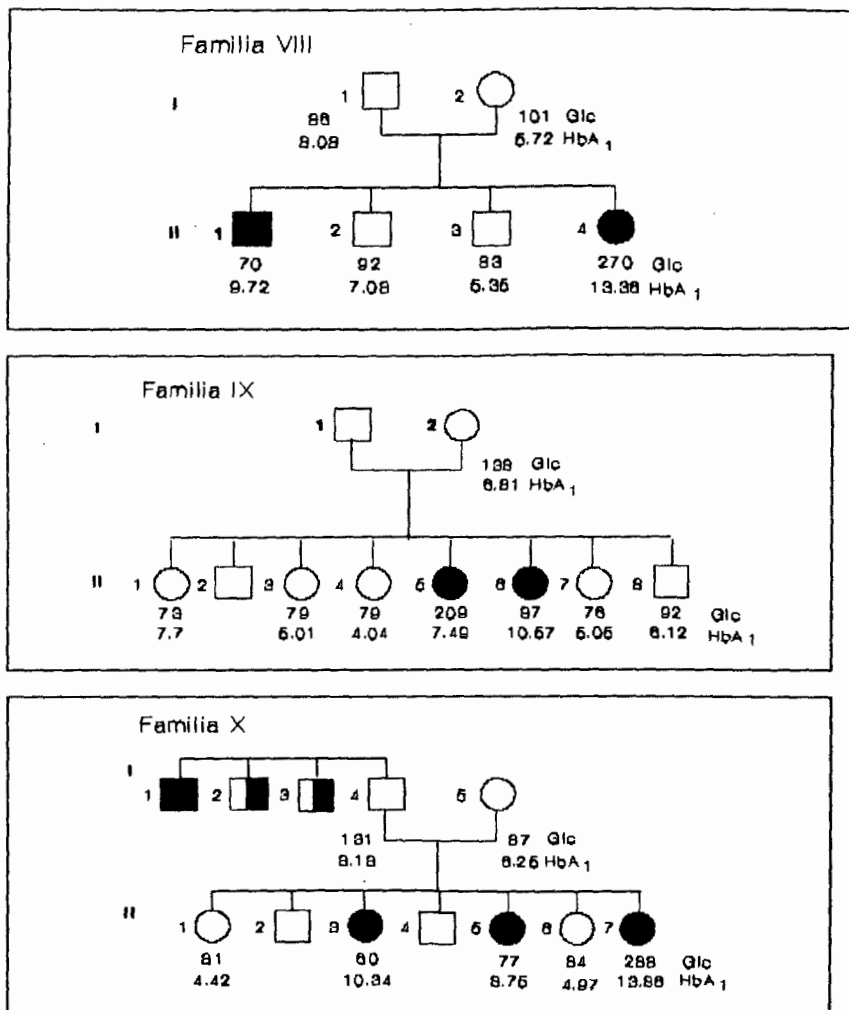


Figura 1c. Arboles genealogicos de las familias con DM-I estudiadas. Los circulos y cuadros oscuros representan pacientes con DM-I, los incompletos a los DM-II.

DISCUSSION

DISCUSION

El estudio de la HbA_{1c} es relevante para evaluar el control metabólico de pacientes con DM y además se ha utilizado en estudios epidemiológicos para identificación temprana de pacientes con DM.

Los resultados del presente trabajo confirman la correlación entre el método cromatográfico y el colorimétrico reportado por Parker et al. (1981), en individuos sanos ($r=0.98$, $p<0.001$). Sin embargo, el presente estudio en familias con DM-I nos permitió, por una parte, conocer la capacidad del método colorimétrico para identificar pacientes en mal control, y, por la otra identificar en estas familias con una clara carga genética si aquellos familiares no diabéticos con una susceptibilidad mayor a desarrollar DM presentaban niveles más elevados de HbA_{1c} y/o un cv mayor que en las familias control.

Al comparar las Tablas VIII y IX, observamos que el método cromatográfico es capaz de identificar 9 individuos con DM-I en mal control (subgrupo C) y 16 en control intermedio (subgrupo B), 7 con DM-I, 5 con DM-II, 3 FAM Normales y 1 del grupo control, mientras que por el método colorimétrico (Tabla V), solo se identifica 1 individuo con DM-I en el subgrupo C y 18 en el subgrupo B (16 con DM-I y 2 con DM-II), lo cual pone de manifiesto que a este método le falta sensibilidad para identificar individuos en mal control.

Por otra parte, al analizar los 3 individuos del grupo FAM Normales con valores $> 8\%$ por el método cromatográfico (8.0, 8.08 y 8.18 %), II-1 familia IV, I-1 familia VIII y I-4 familia X, respectivamente, el primero

(II-1, Familia IV, Fig. 1a), se trata desde hace años con medicina alternativa para "prevenir" la diabetes por ser hija de madre con DM-I, esta persona junto con el tercero (I-4 familia X) fueron diagnosticados posteriormente como DM-II por el servicio de Endocrinología del Hospital de Especialidades. En el grupo control se identificó un individuo con HbA_{1c} > 8% (8.7%), el cual es un candidato a presentar diabetes, fué evaluado y presentó curva de tolerancia a la glucosa anormal. Los 4 casos pasan inadvertidos al ser analizados por el método colorimétrico, lo que indica que si bien entre ambos métodos hay una correlación positiva y significativa, el colorimétrico tiene menor sensibilidad.

Los resultados del cvi son prometedores ya que al analizar 6 de las 10 familias con DM-I (Familias V-X, Figs. 3a, 3b y 3c), observamos en 5 de ellas un cvi de 19.34% lo que sugiere que tienen un menor control en la regulación de sus niveles de glucosa y por lo tanto, mayor variabilidad en los niveles de HbA_{1c}; asimismo, la familia con cvi menor (4.94%), probablemente representa una forma genética distinta con una mejor capacidad para regular los niveles de glucosa. En el caso de las Familias Control, que presentan cvi mayor del 10 % (10.96 y 17.19%), al analizar el árbol de la primera familia se encontró al padre con hipoglucemia (45 mg/dl), lo cual presentó una prueba de tolerancia a la glucosa anormal, en el segundo caso, el padre mostró HbA_{1c} de 8.7% y fué estudiado posteriormente presentando curva de tolerancia a la glucosa anormal. Estos datos sugieren que cuando existe algún grado de susceptibilidad genéticamente determinada se observa un mayor cvi en los

niveles de HbA_{1c} capaz de distinguir los individuos con DM-I o DM-II de los controles y aún de sus familiares.

Finalmente, cabe señalar que el procedimiento cromatográfico para medir HbA_{1c} es muy fácil de realizar y su costo en reactivos por muestra es de N\$24.00, mientras que el colorimétrico, aún cuando es muy económico (N\$0.50 por muestra) y proporciona resultados satisfactorios, es bastante laborioso y difícil de estandarizar, haciéndolo poco accesible a laboratorios de primero y segundo nivel.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El método colorimétrico para cuantificar la HbA₁ mostró una buena correlación con el método cromatográfico, sin embargo le falta sensibilidad para identificar los niveles que ubican a un paciente en mal control metabólico.

2. Se identificaron por el método cromatográfico 4 individuos con niveles elevados de HbA₁, 3 del grupo FAM Normales, (uno ya identificado como DM-II), y uno del grupo control.

3. El análisis del cvi de los niveles de HbA₁, mostró una mayor variabilidad en los familiares normales de los pacientes con DM-I que en las familias control, por lo que pudiera ser utilizado para investigar susceptibilidad a DM.

4. El método colorimétrico para medir los niveles de HbA₁, es más económico que el cromatográfico (N\$0.50 vs N\$24.00), sin embargo es muy laborioso y difícil de estandarizar por lo que no lo recomendamos para ser utilizado en clínicas de 1º y 2º nivel.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Foster DW: Diabetes Mellitus. Scriver CR., Beaudet AL., Sly WS., Valle D, (eds). En: The Metabolic Basis of Inherited Disease. 6th edition. U S A: McGRAW-HILL, 1989. 375-396
- 2.- Mc Kusick VA: Autosomal Recessive Phenotypes. Catalogo of Autosomal Dominant, Autosomal Recessive, and X-Linked Phenotypes. 10 th edition. Baltimore: The Johns Hopkins University press, 1992. 1330-1333
- 3.- Riley WJ., Maclaren NK., Krischer J., Spillar RP., Silverstein JH., Schoitz DA., Schwartz S., Malone J., Shan S., Vadheim C., and Rotter JI: A Prospective Study of the Development of Diabetes in Relatives of Patients with Insulin-Dependent Diabetes. N Engl J Med 1990., 323 : (17) 1167-1172
- 4.- Genuth S: Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. En: Clinical Diabetes Reviews. American Diabetes Association, Clinical Education Program. 1987., 1:7-14
- 5.- Krall LP., Beaser RS: Joslin Diabetes Manual. Lea and Febiger 12th Edition. Philadelphia, London 1989
- 6.- Vranic Mladen: A Key to Understandinn the Pathogenesis of Diabetes (Indirect Effects of Insulin). Diabetes 1992., 41: 1188-1206
- 7.- Maclaren N., Shatz D., Drash A., and Grave G: Initial Pathogenic Events in IDDM. Diabetes 1989., 38: 534-538
- 8.- Raffel LJ., Rotter JI: The Genetics of Diabetes. Clinical Diabetes Reviews. American Diabetes Association (Ed). Clinical Education Program. 1987., 1: 17-21
- 9.- DeFronzo RA., Pathogenesis of type 2 (Non-Insulin Dependent) Diabetes Mellitus: a Balanced Overview. Diabetologia 1992., 35: 389-397
- 10.- Eisenborth GS: Type I Diabetes Mellitus. N Engl J Med 1986., 314: (21) 1360-1368
- 11.- Cavan D., Bain S., Barnett A. The Genetics of type I (insulin dependent) Diabetes Mellitus. J Med Genet 1992., 441-446
- 12.- Thorsby E., Renningen KS: Particular HLA-DQ Moléculas Play a Dominant Role in Determining Susceptibility or Resitance to Type 1 (Insulin-Dependent) Diabetes Mellitus. Diabetologia 1993., 36: 371-377

- 13.- Nepom GT: A Unified Hypothesis for the Complex Genetics of HLA Associations with IDDM. *Diabetes* 1990., 39: 1153-1157
- 14.- Atkinson MA., Maclaren NK: Origen de la Diabetes. *Investigación y Ciencia* 1990., 168: 38-46
- 15.- Tarn AC., Dean BM., Schwarz G., Thomas JM., Ingram D., Bottazzo GF., Gale E AM: Predicting Insulin-Dependent Diabetes. *Lancet* 1988., 845-850
- 16.- Sarvetnick N., Shizuru JA: Genetic Control of Diabetes Mellitus. *Diabetologia* 1992 35[Suppl 2]: S1-S7
- 17.- Bellanti JA., *Inmunología*. 3a edición. México D.F: Interamericana, 1986
- 18.- Guizar V JI: *Genética Clínica*. 1a edición. México, D.F: El Manual Moderno S.A. de C.V, 1988
- 19.- Ziegler AG., Ziegler R., Vardi P., Jackson AR., Soeldner JS., Eisenbarth GS: Life-Table Analysis of Progression to Diabetes of Anti-Insulin Autoantibody-Positive Relatives of Individuals With Type I Diabetes. *Diabetes* 1989., 38: 1320-1325
- 20.- Christie MR., Tun Richard YM., Lo Simon SS., Cassidy D., Brown TJ., Hollands J., Shattock M., Bottazzo GF., Leslie R DG: Antibodies to GAD and Tryptic Fragments of Islet 64K Antigen as Distinct Markers for Development of IDDM. *Diabetes* 1992., 41: 782-787
- 21.- Palmer JP., McCulloch DK: Prediction and Prevention of IDDM-1991. *Diabetes* 1991 40: 943-947
- 22.- Atkinson MA., Maclaren NK., Maclaren NK., Sharp DW., Lacy PE., Riley WJ: 64 000 Mr Autoantibodies as Predictors of Insulin-Dependent Diabetes. *Lancet* 1990., 335: 1357-1360
- 23.- Atkinson MA., Maclaren NK: Islet Cell Autoantigens of IDDM. *Diabetes Rev* 1993., 1: 190-203
- 24.- Bosi E., Bonifacio Ezio., Bottazzo GF: Autoantigens in IDDM. *Diabetes Reviews* 1993., 1: 204-214
- 25.- Murray RK., Mayes PA., Granner DK., Rodwell VW: *Bioquímica de Harper*. 11a edición. México D.F: El Manual Moderno, S.A de C.V, 1988

- 26.- Kennedy L., Baynes JW: Nonenzymatic Glycosylation and the Chronic Complications of Diabetes: an overview. *Diabetologia* 1984., 26: 93-98
- 27.- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of Intensive Treatment of Diabetes on The Development and Progression of Long-Term complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 1993., 329: 977-986
- 28.- Bunn HF: Nonenzymatic Glycosylation of Protein: Relevance to Diabetes. *Am J Med* 1981., 70: 325-33
- 29.- Rand LI: Retinopathy: What to Look For. En *Clinical Diabetes Reviews*. American Diabetes Association, Clinical Education Program. 1987., 1 124-127
- 30.- Rosenstock J., Raskin P: Early Diabetic Nephropathy: Assessment and Potential Therapeutic Interventions. *Clinical Diabetes Reviews*. American Diabetes Association Clinical Education Program. 1987., 1 128-147
- 31.- Clements RS: Diabetic Neuropathy: Diagnosis and Treatment. *Clinical Diabetes Reviews* vol 1. American Diabetes Association Clinical Education Program. 1987., 156-160
- 32.- Dunn FL: Lipids and Diabetes: Guidelines for Treatment. *Clinical Diabetes Rev* vol 1. American Diabetes Association Clinical Education Program. 1987., 167-172
- 33.- Bunn HF., Forget GB (Eds). Hemoglobins A_{1c}, F, and A_{1c} and other human hemoglobin components. En *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*. Chap 4, 75-82, Press of W.B Saunders Company, 1986.
- 34.- Aparicio-Palomino, A., Carrasco-Carrasco P: Hemoglobinas Glicosiladas y Control del Diabético ambulatorio. *Análisis Clínicos (Esp)* 1983., 32: 177-185
- 35.- Da Silvera-Martinez, R., Rivera-Hidalgo, P: La Glucosilación de las Proteínas en la Diabetes Mellitus, Mecanismos e implicaciones clínicas: *Bol CMNO (Guad)* 1991., 1: 74-79
- 36.- Nathan DM: Glycosylated Hemoglobin: What It Is and How to Use It: *Clinical Diabetes Reviews*. American Diabetes Association, Clinical Education Program. 1987., 1 78-82

- 37.- Beisswenger PJ., Healy JC., Shultz EK. Glycosylated serum proteins and glycosylated hemoglobin in the assessment of glycemic control in Insulin-Dependent and Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Metabolism* 1993., 42:989-992
- 38.- Muruganandam A., Romsa GJ., Thibert TJ., Cheung RM., Draisey TF., Mutus B. Glycated calmodulin from platelets as an index of glycemic control. *Clin Chem* 1993., 39: 815-819
- 39.- American Diabetes Association. Physician's Guided to Insulin Dependent Diabetes Type I. Clinical Education Program. The American Diabetes Association Inc. 1988.
- 40.- Makita Z., Vlassara H., Rayfield E., Cartwright K., Friedman E., Rodby R., Cerami A., Bucala R: Hemoglobin-AGE: A Circulating Marker of Advanced Glycosylation. *Science* 1992 258: 651-653
- 41.- Simon D., Senan C., Garnier P., Saint-Paul M., Papoz L. Epidemiological Features of Glycated Haemoglobin A_{1c}- Distribution in a Healthy Population. *Diabetologia* 1989., 32: 864-869
- 42.- Yudkin J., Forrest R., Jackson C., Ryle A., Dav Gould B: Unexplained Variability of Glycated Haemoglobin in Non-Diabetic Subjets not Related to Glycaemia. *Diabetologia* 1990., 3: 208-215
- 43.- Goldstein DE., Little RR., Wiedmeyer HM., England JD., McKenzie E. Glycated Hemoglobin: Methodologies and Clinical Applications. *Clin Chem* 1986., 32: B64-B70
- 44.- Gilberto Angel M: Interpretación Clínica del Laboratorio. 3a Edición Médica Panamericana. Bogota, Colombia, 1990
- 45.- Parker KM., England JD., DaCosta J: Improved colorimetric Assay for Glycosylated Hemoglobin. *Clin Chem* 1981., 27: 669-672

C.

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a
Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el
(la) Pasante **CASAS CASTAÑEDA MARICELA**

código número: 085372408 **HEMOGLOBINA GLUCOSI
LADA EN FAMILIAS CON DIABETES MELLITUS TIPO I POR UN METODO CRO
MATOGRAFICO Y UNO COLORIMETRICO**

consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión
de la misma y la realización de los exámenes profesionales
respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya
lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jalisco de 199

EL DIRECTOR DE TESIS

Bertila Gómez

SINODALES

1. *Guilina Castaña Petrova*
Nombre completo

[Firma]
Firma

2. *Carlos Alvarado Magaña*
Nombre completo

[Firma]
Firma

3. *Ma. Enriqueta Franco G.*
Nombre completo

[Firma]
Firma



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias Biológicas

Expediente.....

Número

9317000n

C. MARICELA CASAS CASTAÑEDA
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis **"HEMOGLOBINA GLUCOSILADA EN FAMILIAS CON DIABETES MELLITUS TIPO I. POR UN METODO CROMATOGRAFICO Y UNO COLORIMETRICO"** para obtener la Licenciatura en Biología.

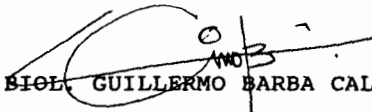
Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptada como Directora de dicha Tesis la M. en C. Bertha Ibarra Cortés.

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
 Las Agujas, Zapopan, Jal. 25 de Agosto de 1994
EL DIRECTOR
DE LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

Fernando Alfaro Bustamante

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO


BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO



c.c.p.- M.C. Bertha Ibarra Cortés, Directora de tesis.-pte.
 c.c.p.- El expediente del alumno.

FAB>GBC>Cglr.