

LAS HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS COMO PARÁMETROS DEL STATUS METABÓLICO DEL PACIENTE DIABÉTICO (Consideraciones generales)

DR. LUIS F. ROJAS S.*
DR. GERMAN F. SAENZ R.*
DR. MARIO CHAVES V.*
DR. JOSE M. ESQUIVEL CH.*

RESUMEN

El presente trabajo trata de las hemoglobinas glicosiladas. Su propósito es presentar en forma resumida, los aspectos principales de estos derivados de la hemoglobina. Los autores discuten entonces, aspectos, tales como el mecanismo de la reacción de glicosilación, la naturaleza de los diferentes derivados y su nomenclatura y la identidad de los ligandos hallados en la sangre de personas normales. También se presenta una corta discusión relacionada con la influencia que tiene la glicosilación de la hemoglobina sobre sus propiedades biológicas y el posible papel que desempeña la glicosilación de otras proteínas corporales en el desarrollo de las secuelas diabéticas. Finalmente los autores comentan sobre la importancia de la cuantificación de las hemoglobinas glicosiladas, como método alternativo de rutina en el estudio del paciente diabético.

SUMMARY

This paper deals with glycosylated hemoglobins. Its purpose is to present, briefly, the main aspects in connection with these hemoglobin derivatives. Thus, the authors discuss those aspects such as the mechanism of the glycosylation reaction, the nature of the different derivatives along with their nomenclature and the identity of the different ligands so far encountered in the blood of normal subjects. The authors also present a short discussion related to the influence of the glycosylation of the hemoglobin molecule upon its biological functions and the possible role that the glycosylation of other body proteins has in the development of the diabetic sequelae. Finally they make some remarks about the importance of the quantification of the glycosylated hemoglobins as a routine and alternative analysis in the study of the diabetic patient.

INTRODUCCION

La regulación metabólica del paciente diabético es un problema de gran importancia no sólo para el médico diabético, sino para el mismo paciente. Muchas de las facetas de este problema han sido investigadas, pues de un adecuado control metabólico depende en última instancia, que se pueda impedir o por lo menos retrasar, la aparición de las complicaciones que a menudo acompañan a la diabetes mellitus. Sin embargo, el problema no ha sido del todo resuelto y, en opinión de algunos investigadores, aún no se dispone de un método simple y rápido que permita establecer si un paciente diabético está bien regulado o si una medida terapéutica ha producido beneficios en lo que respecta a su

regulación metabólica (12). Para esto se ha recurrido a determinaciones de glucosa urinaria en muestras aisladas o de 24 horas, de la glicemia en ayunas o después de una comida (post-prandial), a pruebas de tolerancia a la glucosa, etc., pero todas estas determinaciones no son fieles reflejos del estado metabólico del paciente y además pueden ser alteradas por diversas circunstancias.

Recientemente algunos investigadores han sugerido que la medición de la concentración de la hemoglobina glicosilada puede ser un mejor indicador del estado metabólico del paciente diabético.

ASPECTOS BIOQUIMICOS

a. ¿Qué son las hemoglobinas glicosiladas?

La hemoglobina humana es una proteína heterogénea. En los adultos y en los niños de unos seis meses de edad, el 90% aproximadamente de su hemoglobina lo constituye la

* Centro de Investigación de Hemoglobinas Anormales y Transtornos Afines (CIHATA), Universidad de Costa Rica, Hospital San Juan de Dios.

HbA, un tetrámero formado por dos cadenas alfa y dos beta ($\alpha_2^A \beta_2^A$) cada una con un grupo prostético hem. La HbA₂ ($\alpha_2^A \delta_2^A$) y la HbF (hemoglobina fetal, $\alpha_2^A \gamma_2^F$) representan aproximadamente el 2,5% y el 0,5% respectivamente, del total de la hemoglobina (5). Cada clase de cadena polipeptídica de esas hemoglobinas es sintetizada de acuerdo con la información codificada en genes diferentes.

Las hemoglobinas glicosiladas son, en cambio, derivados formados por una reacción de glicosilación que sufre la molécula de hemoglobina, con la glucosa o alguno de sus metabolitos. Esta reacción es un buen ejemplo de una modificación "post-traducciona" de una proteína, lo que quiere decir que la reacción ocurre después de que las cadenas de la hemoglobina han sido sintetizadas, pues no existen genes que determinen la biosíntesis de esos derivados.

b. ¿Cómo se forman las hemoglobinas glicosiladas?

La glicosilación de la hemoglobina se lleva a cabo por la formación inicial de una base de Schiff, por una reacción nucleofílica que se lleva a cabo entre la glucosa o sus derivados fosforilados y los grupos amino de las cadenas peptídicas de la hemoglobina. La aldimina resultante sufre luego un arreglo interno llamado "arreglo de Amadori" y se convierte en una cetoamina, que es un derivado más estable (Fig. 1).

La reacción de glicosilación es lenta, pues no es catalizada por enzimas, es prácticamente irreversible y depende únicamente de las concentraciones intraeritrocíticas de las dos sustancias reaccionantes: la hemoglobina y la glucosa. La entrada de la glucosa al eritrocito se efectúa sin la participación de la insulina, de modo que la concentración de este monosacárido en el ambiente intraeritrocítico es un reflejo de su concentración en el líquido extracelular. Esto explica por qué la reacción de glicosilación es más rápida en la sangre con elevada concentración de glucosa, condición que ocurre en el paciente diabético no compensado.

c. ¿Cuántas clases de hemoglobinas glicosiladas hay?

Las primeras fracciones o componentes menores de la hemoglobina fueron observados por primera vez por Kunkel en 1955 (16). En 1958, Allen y Schroeder (1) aislaron varias componentes menores que correspondían a la fracción que Kunkel había denominado: HbA₃. Estos componentes menores fueron llamados HbA_{1a}, HbA_{1b} y HbA_{1c}.

Holmquist y Schroeder (14), en 1966, demostraron que la sustancia de bajo peso molecular unida a la hemoglobina en la HbA_{1c}, era reducida por el borohidruro de sodio y que su unión se llevaba a cabo por los grupos amino libres de las cadenas polipeptídicas que forman la hemoglobina. Bookchin y Gallop (3), en 1968, ampliaron este estudio y propusieron que el sitio de unión eran los grupos amino libres de los residuos de valina de las cadenas beta y además que el ligando en ese punto era una hexosa.

En 1975, Bunn et al. (6), aislaron por hidrólisis ácida, la hexosa presente en la HbA_{1c} y encontraron glucosa y manosa en una proporción de 3:1. El hallazgo de manosa

fue sorprendente pues es un monosacárido ausente en el glóbulo rojo. Esto se debe probablemente a la racemización del segundo carbono de la molécula, por el tratamiento hidrolítico ácido.

En 1978, Bunn et al. (4), reportaron que esos componentes menores eran cuatro, que fueron designados HbA_{1a1}, HbA_{1a2}, HbA_{1b} y HbA_{1c}, cuyas concentraciones eran normalmente 0,2%; 0,2%; 0,5% y 3,5% respectivamente, del total de la hemoglobina de la persona. A estas fracciones se les designa colectivamente HbA₁.

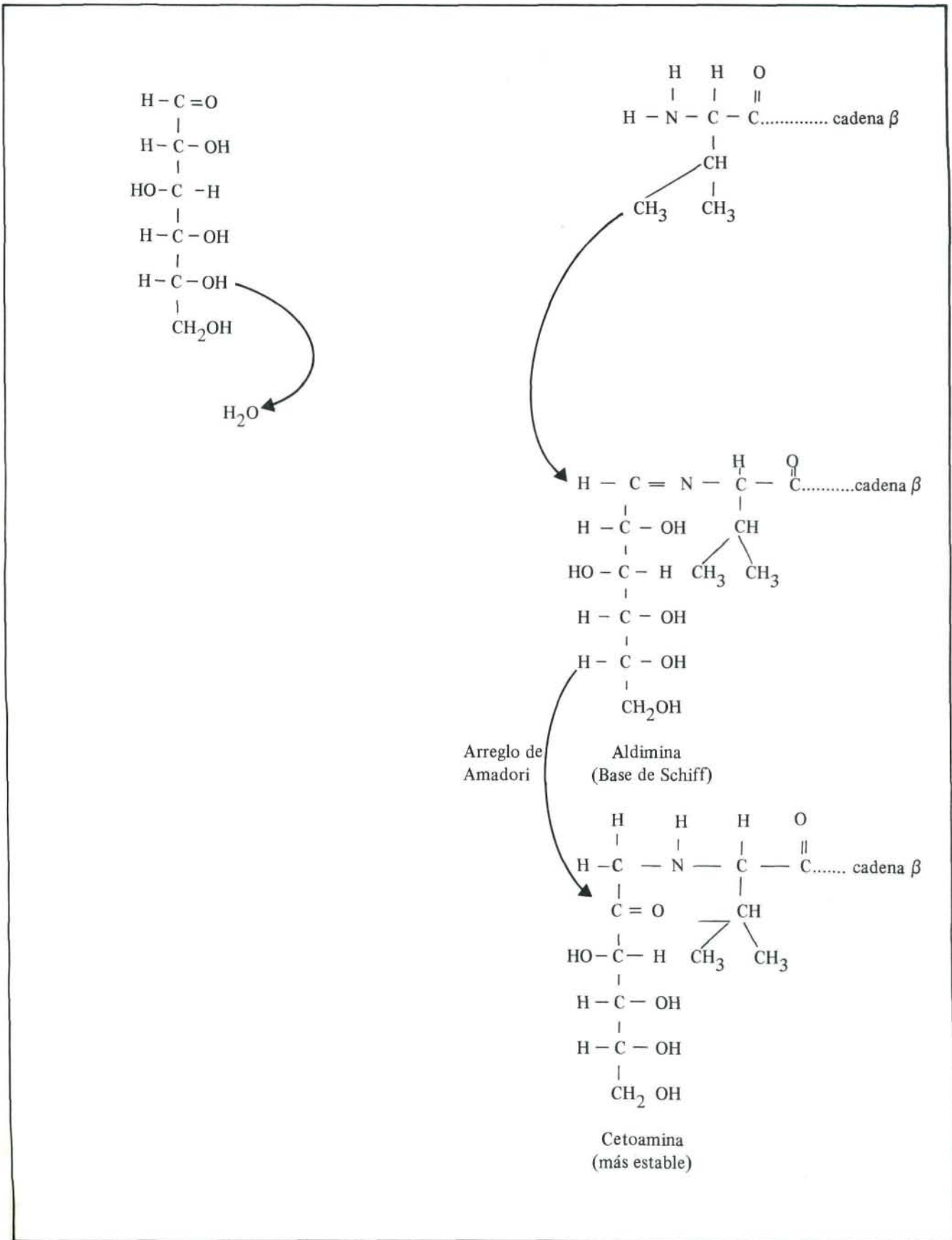
El análisis estructural de la HbA_{1c}, demostró que esta molécula se forma por la condensación de la glucosa con la hemoglobina. Sin embargo, Haney y Bunn¹³, en 1976, encontraron que la hemoglobina reacciona con la glucosa -6- fosfato veinte veces más rápidamente que con la glucosa y, además, que la hemoglobina también reacciona con la fructosa -1,6- difosfato, con la ribosa -5- fosfato, con la ribulosa -5- fosfato y con el ácido glucurónico, pero no con la glucosa -1- fosfato o con la glucosa -1,6- difosfato.

Como los fosfatos de azúcar se encuentran normalmente en el eritrocito, resultaba interesante determinar si los otros componentes menores de la hemoglobina (la HbA_{1a1}, la HbA_{1a2} y la HbA_{1b}) eran derivados fosforilados. Se encontró entonces que la HbA_{1a1} tenía dos grupos fosfato por cadena β , la HbA_{1a2} uno y la HbA_{1b} ninguno⁴. De acuerdo con esto, se ha propuesto que las HbA_{1a1} y A_{1a2} son derivados que contienen fructosa -1,6- difosfato y glucosa -6- fosfato respectivamente, mientras que la composición de la HbA_{1b} es todavía desconocida. En todo caso, probablemente todos los componentes menores de la hemoglobina, pueden ser derivados de metabolitos fosforilados de azúcares normalmente presentes en el eritrocito y recientemente se ha propuesto que el componente azucarado presente en la HbA_{1c} es la 1-amino, 1-desoxifruktosa¹⁰. En la sangre de niños recién nacidos o del cordón umbilical, se han encontrado derivados glicosilados de la hemoglobina fetal y en pacientes con hemoglobinopatías se han encontrado también derivados glicosilados de las hemoglobinas anormales.

d. Influencia de la glicosilación sobre la función biológica de la hemoglobina.

La reacción de la glicosilación de la molécula de hemoglobina ocurre principalmente en los grupos amino terminales de las cadenas beta, sitio donde normalmente se unen otras moléculas orgánicas fosforiladas. Entre estas últimas quizás la más importante es el ácido 2,3 -difosfoglicérico (2,3-DPG), un regulador de la función transportadora de oxígeno que lleva a cabo la hemoglobina. Por su carácter aniónico, el 2,3-DPG se une a los grupos amino terminales de las cadenas beta de la hemoglobina, cargados positivamente, por medio de un enlace salino. Esto reduce la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno y facilita su paso a los tejidos. Si esos grupos amino están bloqueados por sustancias como las hexosas o sus derivados fosforilados, la

Figura 1. Reacción de la glicosilación no enzimática de las cadenas β de la hemoglobina.



combinación de la hemoglobina con el 2,3-DPG se hace difícil y, en consecuencia, se altera la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. Se ha determinado que, con relación a la HbA₀ (HbA no glicosilada), la HbA_{1a1} y la HbA_{1a2} tiene baja afinidad por el oxígeno, mientras que la de la HbA_{1b} es elevada y la de la HbA_{1c} es solo moderadamente alta¹⁷. Estas variaciones se reflejan en los hallazgos efectuados en pacientes diabéticos no tratados, en algunos de los cuales se han reportado valores de P₅₀ tan bajos como 19 mmHg (normal 25,5 – 26,5 mmHg)⁸. Aún en presencia de altas concentraciones de fosfatos orgánicos, todas las glicohemoglobinas están 50% saturadas a valores de pO₂ a los cuales, la HbA₀ ha entregado casi todo su oxígeno.

El aumento de la afinidad por el oxígeno de algunos de estos derivados, disminuye la cantidad del gas disponible para los tejidos, lo que es importante para el paciente diabético porque ante una excesiva concentración intraeritrocitaria de HbA_{1c}, su organismo tendría que reaccionar, aumentando la concentración de 2,3 –DPG. Esto sin embargo, podría no ser necesario porque la concentración de HbA_{1c} nunca llega a alcanzar valores tan grandes como para producir daño tisular por deficiente oxigenación. De ser así, la incapacidad metabólica del organismo se haría sentir, no sólo en el área de los carbohidratos. Al afectarse el metabolismo de los lípidos, se desarrolla cetoacidosis con su consiguiente descenso del pH, y esto, unido a la impostergable administración de insulina, impide la formación de cantidades óptimas de 2,3 –DPG. Es probable entonces que la respuesta compensatoria inmediata al descenso en la disponibilidad de oxígeno, ocurra en la microcirculación, en la cual se produce vasodilatación, particularmente en el lado venoso, lo cual se asocia a un aumento en el escape plasmático transcapilar. Este sería uno de los fenómenos que participan en el desarrollo de las anomalías microvasculares típicas de la diabetes⁸.

- e. La reacción de la glicosilación también ocurre con otras proteínas corporales.

El descubrimiento de los derivados glicosilados de la hemoglobina, ha hecho pensar en la posibilidad de que otras proteínas corporales también experimenten un proceso de glicosilación no enzimática, sobre todo en circunstancias en las que el paciente presenta hiperglicemia sostenida. En 1980, Dolhofer y Wieland⁹, reportaron el hallazgo de concentraciones elevadas de albúmina glicosilada en pacientes diabéticos. En vista de que el aislamiento de la albúmina glicosilada es difícil, Kennedy y Merimee¹⁵, han propuesto la cuantificación de las proteínas séricas totales glicosiladas, como un método útil para evaluar el grado de regulación del paciente diabético, con algunas ventajas sobre las hemoglobinas glicosiladas. La glicosilación del fibrinógeno, también ha sido reportada y se cree que podría estar involucrada en algunos trastornos de la coagulación típicos de la diabetes²¹. En el caso de las proteínas tisulares, la reacción de glicosilación es particularmente importante en los

tejidos insulino-independientes. Así en los estados hiperglicémicos, las células de estos tejidos reciben una alta concentración de glucosa, la cual reacciona con las proteínas, de manera no-enzimática, como lo hace con la hemoglobina en el ambiente intraeritrocítico. La glicosilación de estas proteínas probablemente altera sus funciones biológicas en un grado que depende de la velocidad de síntesis de esas proteínas, de su vida media y de la reversibilidad de la reacción de glicosilación. En todo caso, esto podría conducir al daño tisular que acompaña a la diabetes mellitus.

Cerami et al.⁷, han estudiado los cambios que experimenta el cristalino del ojo por el mecanismo de glicosilación. En estos estudios han demostrado por ejemplo, que la incubación de la glucosa –6– fosfato con una solución de proteínas aisladas del cristalino, conduce lentamente a la incorporación de la glucosa en los residuos de lisina de esas proteínas. Los cristalinicos modificados por esta reacción exhiben una mayor susceptibilidad a la oxidación de los grupos sulfhidrilos, lo que produce agregados de elevado peso molecular unidos por puentes de disulfuro. Con el tiempo, la solución de estas proteínas glicosiladas desarrolla, en presencia de oxígeno, una opacidad semejante a la de las cataratas diabéticas. Esta reacción puede ocurrir in vivo, sobre todo en el cristalino del adulto, en el cual ocurre gran acumulación de azúcares. En el paciente diabético, la hiperglicemia podría poner a disposición del cristalino –tejido no dependiente de insulina–, grandes cantidades de glucosa, conduciendo a un envejecimiento prematuro debido a la glicosilación de las proteínas del cristalino.

La glicosilación de las proteínas de la membrana de ciertas células puede también jugar un papel importante en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. Se ha encontrado por ejemplo, que la reacción de agregación de los eritrocitos aumenta en los pacientes diabéticos, mientras que su deformabilidad se encuentra disminuida. Estos cambios podrían ser producidos por glicosilación de las proteínas de la membrana eritrocítica, y aunque no se ha demostrado todavía, existe sin embargo, correlación entre la magnitud de estos cambios y la intensidad de la anomalía metabólica, incluyendo la concentración de glicohemoglobinas y la hiperglicemia^{2, 18}.

La glicosilación no enzimática de las proteínas del glomérulo renal aumenta en los animales diabéticos y aunque no se dispone de pruebas que lo confirmen, este mecanismo podría estar involucrado en el desarrollo de la nefropatía diabética. Por otro lado, las alteraciones hematológicas observadas en la diabetes, como el aumento de la afinidad por el oxígeno de los eritrocitos, que conduce a hipoxia tisular y el nivel aumentado de las proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, el aumento de la agregabilidad de las plaquetas y de los eritrocitos, la disminuida deformabilidad de estos últimos y la pobre acción fibrinolítica, que conducen a hiperviscosidad de la sangre, pueden ser la causa de las retinopatías observadas en la diabetes mellitus. Algunas de estas alteraciones, si no todas, son consecuencia de la glicosilación no enzimática de proteínas corporales.

IMPORTANCIA DE LA CUANTIFICACION DE LAS HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS

Por años, las fracciones menores de la hemoglobina no pasaron de ser una curiosidad biológica, hasta que Rahrbar²⁰, en 1968, las encontró elevadas en un paciente con una diabetes severa. Posteriormente, muchos reportes han comprobado que en la sangre de estos pacientes, la concentración de estos derivados hemoglobínicos es más elevada que en las personas normales no diabéticas.

Las hemoglobinas glicosiladas constituyen una memoria molecular que permite registrar retrospectivamente, el estado de la regulación del metabolismo de la glucosa. Se ha demostrado correlación entre la glicemia y la concentración de hemoglobinas glicosiladas, pero mientras la primera varía de acuerdo con distintas circunstancias como el ayuno o la ingestión de alimentos, las hemoglobinas glicosiladas, por tratarse de un producto que se forma mediante una reacción no enzimática y lenta, pueden ser cuantificados en cualquier momento del día, pues no se necesita que el paciente esté en ayunas; la determinación tampoco es influenciada por el ejercicio ni por la secreción de hormonas hiperglicemiantes en el momento de llevarse a cabo la determinación. Esto es muy importante para el médico diabetólogo,

pues si un paciente que esté bajo tratamiento se presenta con un valor aumentado de hemoglobinas glicosiladas y normoglicemia, eso significa que por un cierto tiempo, antes de la prueba (unas tres semanas), la concentración de la glucosa en la sangre era alta y que sólo siguió las indicaciones del tratamiento antes de asistir a la consulta con el especialista.

Las consideraciones anteriores sugieren que la determinación de las hemoglobinas glicosiladas puede ser utilizada como una prueba adicional en el estudio del paciente diabético, sobre todo en lo que respecta a su seguimiento, con la aparente ventaja de que una sola determinación efectuada cada mes o cada dos meses, puede brindar valiosa información en lo que respecta a la regulación del metabolismo de la glucosa. De ahí que muchos investigadores hayan manifestado el criterio de que la concentración de hemoglobinas glicosiladas constituyen en forma global, un dato más informativo que la glicemia o la glucosuria^{11, 12, 19, 22}.

Su uso como procedimiento de rutina en el laboratorio clínico deberá esperar sin embargo, a que se tenga información adicional sobre sus bondades lo cual a su vez, sólo será posible cuando se cuente con métodos más baratos que los utilizados actualmente, para llevar a cabo la cuantificación de estos interesantes derivados de la hemoglobina.

BIBLIOGRAFIA

1. Allen, D.W., Schroeder, W.A. and Balog, J.: Observations on the Chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: A study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J. Am. Chem. Soc.* 80: 1628, 1958.
2. Baba, Y., Kai M., Kamada, T., Setoyama, S. and Otusuji, S.: Higher levels of erythrocyte membrane microviscosity in diabetes. *Diabetes* 28: 1138, 1979.
3. Bookchin, R.M. and Gallop, P.M.: Structure of hemoglobin A_{1c}: nature of the N-terminal beta chain blocking group. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32:86, 1968.
4. Bunn, F. H., Gabbay, K.H. and Gallop, P.M.: The glycosylation of hemoglobin: Relevance to diabetes mellitus. *Science* 200: 21, 1978.
5. Bunn, H. F., Haney D.N., Kamin, S., Gabbay, K.H. and Gallop, P.M.: The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}: Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J. Clin. Invest.* 57: 1652, 1976.
6. Bunn, H.F., Haney, D.N., Gabbay, K. H. and Gallop, P. M.: Further identification of the nature and linkage of carbohydrate in hemoglobin A_{1c}. *Science* 67:103, 1975.
7. Cerami, A., Stevens, V.J. and Monnier, V. M.: Role of nonenzymatic glycosylation in the development of the sequel of diabetes mellitus. *Metabolism* 28:4, 431, 1979.
8. Ditzel, J., Nielsen, N. V. and Kiaergaard, J.J.: Hemoglobin A_{1c} and red cell oxygen release capacity in relation to early retinal changes in newly discovered overt and chemical diabetes. *Metabolism*, 28: 440, 1979.
9. Dolhofer, R. and Wieland, O.E.: Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus. *Diabetes* 29:417, 1980.

-
10. Fadel, H. E., Reynolds, A., Stallings, M., and Abraham, E. C.: Minor glycosylated hemoglobins in cord blood of infants of normal and diabetic mothers. *Am. J. Obst. Gynecol* 139: 397, 1981.
 11. Gabbay K. H., Hasty, K., Breslow, J. L. Ellison, R. C., Bunn, H. F. and Gallop, P.M.: Glycosylated hemoglobins and long term blood glucose control in diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 44: 859-864, 1977.
 12. Gonen, B., Rochman, H., Horwitz, D.L. Rubenstein, A. H., and Tanega, S.P.: Hemoglobin A_{1c}: and indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lacent* 2: 734-736, 1977.
 13. Haney, D.N. and Bunn, H. F. : Glycosylation of hemoglobin in vitro: Affinity labeling of hemoglobin by glucose -6-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3534, 1976.
 14. Holmquist, W.R. and Schroeder, W.A.: A new N-terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin A_{1c}. *Biochemistry* 5: 2489, 1966.
 15. Kennedy, A. L. and Merimee, I. J.: Glycosylated serum protein and hemoglobin A_{1c} levels to measure control of Glycemia. *Ann. Int. Med.* 95: 56, 1981.
 16. Kunkel, H. C. and Wallenius, G. : New hemoglobins in normal adult blood. *Science* 122: 288, 1955.
 17. McDonald, M. J., Bleichman, M., Noble, R. W. and Bunn, H. F.: Functional properties of the glycosylated components of human adult hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 254: 3, 702, 1979.
 18. Miller, J. A., Gravallese, E., Bunn, H. F.: Nonenzymatic glycosylation of erythrocyte membrane proteins: Relevance to diabetes. *J. Clin. Invest.* 65: 4, 896, 1980.
 19. Paterson, C.M., Jones, R.L., Koenig, R. L., et al.: Reversible hematological sequelae of diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.* 86: 425 - 429, 1977.
 20. Rahbar, S.: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetes. *Clin. Chem. Acta.* 22: 296, 1968.
 21. RuizArguelles, G. J.: Hemostasia y glucosilación proteica. Tesis de grado. Inst. Nal. Nut., México, 1982.
 22. Trivelli, L. A., Ranney, H. M. and Lai, H. T.: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N. Engl J. Med.* 284: 353 - 357, 1971.