

PRÁCTICA 3

VALORACIÓN DE LA DIABETES: DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA Y HEMOGLOBINAS GLUCOSILADAS

1. Introducción general

El mantenimiento de la glucemia, (concentración de glucosa en suero o plasma) dentro de niveles fisiológicos en los organismos superiores es fundamental para el funcionamiento de todos los órganos, al ser la glucosa un metabolito energético principal para la mayoría de las células, prioritario para las neuronas e imprescindible para los hematíes.

La coordinación de los procesos metabólicos implicados en este cometido está regulada mediante la relación entre las hormonas insulina y glucagón.

En personas sanas, tras ingerir glucosa por vía oral o parenteral esta glucosa pasa a la sangre aumentando su concentración basal. Este aumento activa el mecanismo regulador hormonal que por acción, fundamentalmente, de la insulina, hormona pancreática de tipo polipeptídico, inducirá un aumento de la utilización de glucosa, aceleración de la glucogenogénesis y disminución de la glucogenólisis, o inducirá la síntesis y almacenamiento de triglicéridos en el tejido adiposo.

En la entrada inducida por insulina de la **glucosa** en el interior de las células participa el transportador GLUT4 inducible por insulina.

En el caso de que la producción de insulina esté disminuida, la glucosa no puede ser utilizada por las células, ya que no entra fácilmente en la célula, lo cual ocasiona niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia); así ocurre en las personas que sufren diabetes del tipo denominado "dependiente de insulina" o "tipo 1".

El diagnóstico de la diabetes dependiente de insulina se basa en antecedentes, síntomas clínicos y comprobación de una hiperglucemia significativa. Los valores de referencia en humanos son de 60-110 mg/dl de glucosa en plasma en individuos sanos. Las determinaciones de glucemia basal permiten el diagnóstico de la diabetes, pero constituyen valores puntuales y aislados en el tiempo que no reflejan los niveles medios de glucemia ni la duración de la misma. Por lo tanto, es necesario disponer de pruebas que indiquen el grado del control metabólico de la enfermedad a corto y medio plazo. Estas pruebas están basadas en el fenómeno de unión de la glucosa a diversas proteínas como albúmina, colágeno, hemoglobina, etc. Esta glucosilación tiene lugar por una reacción no enzimática. La intensidad de la glucosilación depende de varios factores, siendo los más importantes los niveles medios de glucemia, la duración de la hiperglucemia, la vida media de las proteínas y la concentración de éstas. Como consecuencia, la medida de la glucosilación proteica constituye un buen marcador bioquímico del grado de compensación del enfermo diabético.

El objetivo de esta práctica es la valoración de la diabetes mediante la determinación de los niveles de glucosa en plasma y de hemoglobinas glucosiladas. Como modelo se emplearán ratas diabéticas, en comparación con ratas control. La diabetes en la rata se provoca mediante una única inyección intraperitoneal de estreptozotocina (45 mg/Kg de peso). La estreptozotocina actúa provocando la destrucción de los islotes β del páncreas, por lo que ocasiona una diabetes de tipo 1 o dependiente de insulina.

Con el fin de no prolongar con tiempos muertos la jornada de prácticas se recomienda comenzar con la preparación y empaquetamiento de la columna cromatográfica para la separación de Hemoglobinas, ver Parte B, 2.

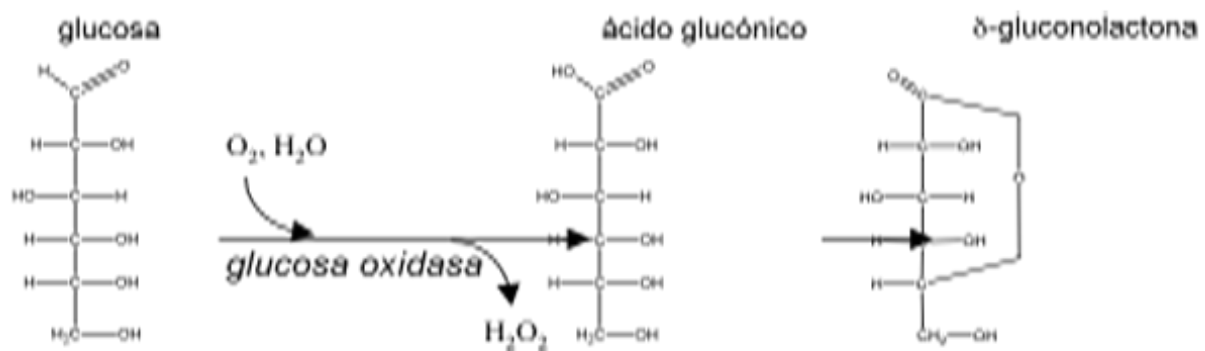
Parte A

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA

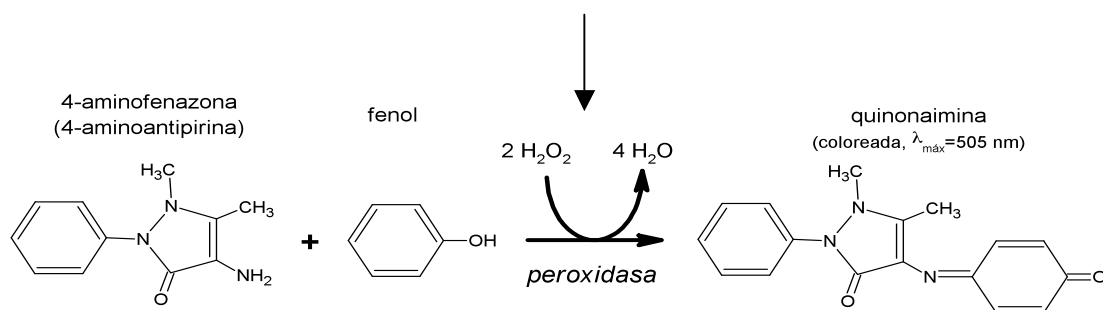
Descripción de la práctica

En esta práctica se utilizará el método de la glucosa oxidasa y peroxidasa (GOD-POD) para medir los niveles de glucosa sanguínea de ratas diabéticas y controles. En el método GOD-POD, en un primer paso la *glucosa oxidasa* cataliza la oxidación de la D-glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la *peroxidasa* para oxidar a la 4-aminofenazona y al fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa presente inicialmente.

El esquema de la reacción es el siguiente:



2 X



Materiales

- 6 tubos de ensayo.
- Pipetas automáticas.
- Espectrofotómetro.
- Disolución patrón de glucosa 0,4 mg/ml.
- Disolución de coloración que contiene:
 - Glucosa oxidasa.
 - Peroxidasa.
 - 4-Aminofenazona.
 - Fenol.
 - Tampón Tris pH 7,4.
- Plasma de ratas normales y/o diabéticas.

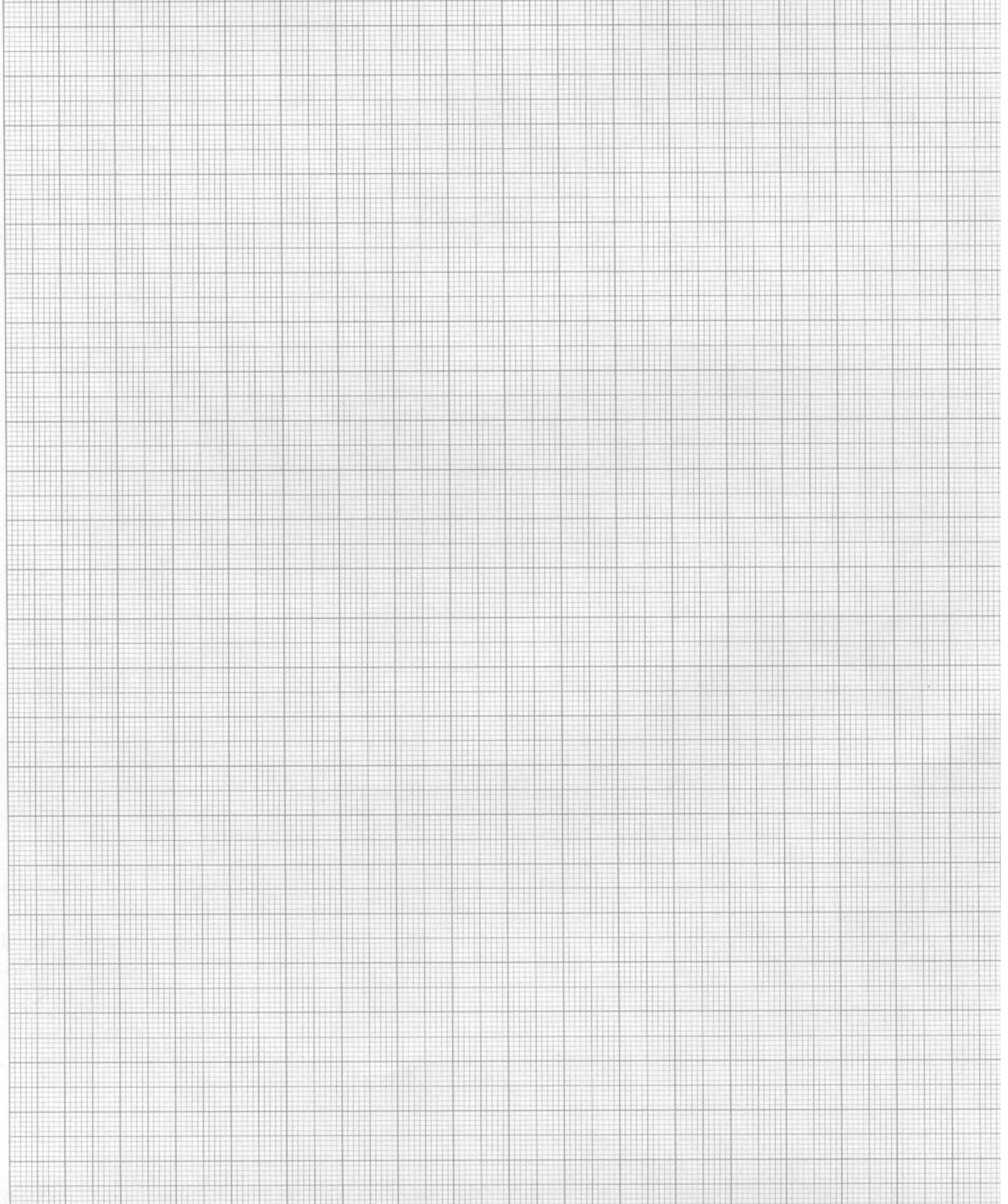
Procedimiento experimental

1. Preparar la recta patrón con la disolución patrón de glucosa y el correspondiente volumen de agua hasta un total de 200 μl , como se indica en la tabla.
2. En otro tubo mezclar 10 μl de plasma + 190 μl de agua (ver tubo n^o 6 en la tabla inferior).

Tubo n ^o	Patrón Glucosa (0,4 mg/ml)	Agua destilada	Solución GOD-POD	Absorbancia 505 nm	μg de Glucosa
1	0 μl (Blanco)	200 μl	1,8 ml		
2	25 μl	175 μl	1,8 ml		
3	50 μl	150 μl	1,8 ml		
4	100 μl	100 μl	1,8 ml		
5	150 μl	50 μl	1,8 ml		

Tubo n ^o	Plasma	Agua	Solución GOD-POD	Absorb. 505 nm	μg de Glucosa	Conc.Glucosa $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ plasma	Conc.Glucosa mg/dl plasma
6	10 μl	190 μl	1,8 ml				

3. Añadir **1,8 ml** de disolución de coloración de glucosa oxidasa-peroxidasa (**reactivo GOD-POD**) a los 6 tubos.
4. Mezclar el contenido de los tubos e incubarlos **10 minutos** en el baño a **37°C**.
5. Secar bien los tubos. Leer las **absorbancias** de los patrones y de la muestra a **505 nm** utilizando como blanco el tubo n^o 1.
6. Construir la **recta de calibrado** representando en el papel milimetrado las **absorbancias a 505 nm** (eje Y) frente a los μg de glucosa (eje X).
7. Extrapolando en la recta de calibrado, calcular los μg de glucosa en el tubo problema. Calcular los μg de glucosa/ μl de plasma.
8. Calcular la concentración de glucosa del plasma problema. Expresarla en **mg/dl**. Comparar los resultados de glucemia obtenidos con los de los otros compañeros. Identificar los valores de glucemia normales y los de diabéticos.



Representación: A_{505nm} (ordenadas) frente a mg de glucosa (abcisas).

Parte B

DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINAS GLUCOSILADAS

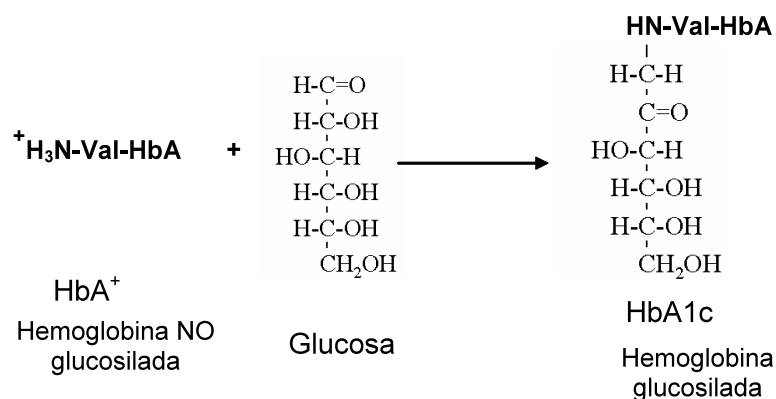
Descripción de la práctica

El control de la diabetes no se valora solamente por el control glucémico, sino que hay otra serie de parámetros, como la Hemoglobina Glucosilada (Hb A1c), que indican el grado de control que, a largo plazo, ha mantenido el paciente diabético.

La hemoglobina (Hb) de los seres humanos adultos está constituida principalmente por: Hb A (97% del total), Hb A₂ (2,5%) y Hb F (0,5%). La Hb A está constituida por 4 cadenas polipeptídicas: 2 globinas α y 2 globinas β. La hemoglobina glucosilada es una fracción de la hemoglobina A normal del adulto, que tiene la propiedad de unir, de forma irreversible, cantidades de glucosa proporcionales a la concentración glucémica. Al conjunto de todas ellas se les denomina hemoglobina A1 o “hemoglobina glucosilada”. Dentro de la hemoglobina A1 se pueden separar varias fracciones, HbA1a, HbA1b y Hb A1c, siendo la de mayor interés y la que se encuentra en un porcentaje más elevado la Hb A1c, que es la que se encuentra unida a la glucosa de manera más específica.

La Hb A1c es el resultado de la glucosilación de la hemoglobina normal (Hb A), como consecuencia de la reacción no enzimática entre la glucosa presente en el plasma y los grupos amino de la hemoglobina, como se muestra en la figura. La unión de glucosa a la valina N-terminal de las cadenas β de la HbA da lugar a la Hb A1c, que es la más abundante de las HbA1 (aproximadamente el 80%).

La cantidad de hemoglobina glucosilada es proporcional a la concentración de glucosa en sangre, por lo que en la diabetes hay mayor proporción de Hb A1c de lo normal. Los valores de referencia en humanos oscilan de 5,5-8,5 % en individuos sanos y del 12-20 % en diabéticos no controlados. Entre los factores que condicionan la intensidad de la glucosilación podemos destacar: la concentración de glucosa sanguínea, el tiempo que se mantiene esa cantidad de glucosa y la vida media de la proteína. En el caso de la hemoglobina, y teniendo en cuenta que la vida media del glóbulo rojo es aproximadamente de 120 días, su determinación nos servirá para evaluar el control de las cifras medias de glucosa en sangre que ha mantenido un diabético durante los 2 a 3 meses precedentes. Cuanto menor sea el nivel de hemoglobina glucosilada, mejor es el control del diabético, y mejor se podrán prevenir las posibles complicaciones a largo plazo de la diabetes. Además los valores de hemoglobina glucosilada no están influidos por las fluctuaciones diarias de glucosa sanguínea ni tampoco por el ejercicio ni por la ingesta reciente de alimentos.



2. Preparación y empaquetamiento de las columnas de Cromatografía (esta parte es lo primero que se realiza en el laboratorio, para aprovechar el tiempo)

- Dar vuelta a las columnas y mantenerlas con el tapón hacia abajo durante 10 minutos.
- Colocar la columna sobre un tubo largo de vidrio.
- Retirar los tapones superior e inferior de la columna. Bajar el disco superior hasta el nivel de la resina, evitando comprimirla, con ayuda del extremo plano de una pipeta. Dejar go-tear justo hasta que se vea desaparecer el líquido en la parte superior de la columna (alcanza la superficie de la resina) desechando el eluido.
- No dejar que se seque la columna.

3. Fraccionamiento de las hemoglobinas

- Aplicar cuidadosamente sobre la columna 50 μ L del hemolizado y dejar que el líquido sea absorbido completamente (desaparece por la parte superior).
- Añadir a la columna 200 ml de la **solución de lavado** para arrastrar los posibles restos del hemolizado y dejar que penetren en la columna (desaparece, por la parte superior).
- Desechar el eluido.
- Se necesitan 2 tubos de vidrio para recoger la hemoglobina glucosilada (HbA1c) y la normal (HbA). Rotular convenientemente los tubos para no confundirlos como tubo 1 y tubo 2.

3.1. Separación de la hemoglobina glucosilada **HbA1c**.

- Colocar bajo la columna el tubo de vidrio rotulado como tubo 1 para recoger la fracción de HbA1c.
- Añadir a la columna 2 ml de **solución de lavado (tampón fosfato)** y dejar que todo el líquido salga de la columna. Una vez que desaparezca el líquido por la parte superior, retirar el tubo 1.

3.2. Elución de la hemoglobina no glucosilada **HbA**

- Colocar bajo la columna el tubo de vidrio rotulado como tubo 2 para recoger la fracción de HbA.
- Añadir a la columna 2 mL de la **solución de elución (NaCl)** y recoger todo el líquido eluido de la columna, hasta que desaparezca por la parte superior.

4. Determinación cuantitativa de las hemoglobinas (absorbancia a 415 nm, pico de absorción de la hemoglobina)

- Preparar tres tubos de ensayo limpios.
- En un **tubo** de ensayo añadir 3 ml de agua destilada (**blanco**).
- Pasar el contenido del **TUBO 1** a un tubo de ensayo.
 - Medir su absorbancia a 415 nm frente al agua destilada. (fracción de hemoglobinas glucosiladas, HbA1c).
- La absorbancia del **TUBO 2** es muy alta, por lo que hay que diluir,
 - Dilución de la muestra:
 - Pasar 1 ml del eluido a un tubo de ensayo; añadir 2 ml de agua destilada (dilución 1:3).
 - Agitar.
 - Medir la absorbancia frente a agua destilada (Tubo blanco) a 415 nm. Ésta es la fracción de hemoglobinas no glucosiladas, HbA)
 - multiplicar el valor de absorbancia obtenida por tres.

5. Resultados

Cálculo del porcentaje de hemoglobina glucosilada frente a hemoglobina total:

$$A_{415} \text{ HbA1c} = \quad A_{415} \text{ HbA} = \quad A_{415} \text{ Hb total (HbA+ HbA1)} =$$

$$\frac{A_{415} \text{ HbA1c}}{A_{415} \text{ Hb total}} \times 100 = \% \text{ HbA1c}$$

Comparar los resultados de hemoglobinas glucosiladas con los de los otros compañeros. Identificar los valores de hemoglobinas glucosiladas de muestras normales y de diabéticos.

6. Completar

Se ha realizado un cromatografía de utilizando una resina con grupos con carga

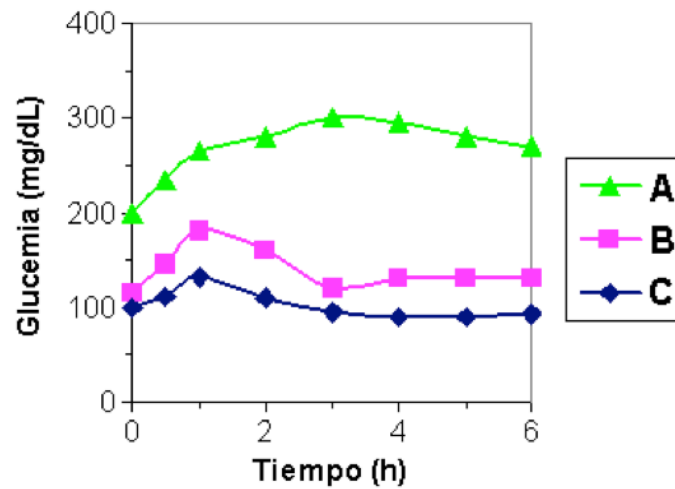
En el tubo 1 se ha recogido la hemoglobina (Hb.....), que al tener carga no ha quedado retenida en la columna. Esta carga se debe a la unión de la al grupo N-terminal de la

En el tubo 2 se ha recogido la hemoglobina (Hb), que al tener carga quedó retenida en la columna.

Con la solución de elución (.....) hemos desplazado a la hemoglobina de la resina.

La absorbancia a 415 nm es debida a

Ensayo de tolerancia a la glucosa



Se realiza un ensayo de tolerancia a la glucosa (o curva de glucemia) a 3 personas diferentes, midiendo la glucemia en diferentes momentos tras la toma oral de 100 g de glucosa disuelta en agua.

Asigna las curvas obtenidas (A, B y C) a las siguientes situaciones:

- Paciente sano.
- Diabetes leve.
- Diabetes grave.