



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE CARDIOLOGIA "LUIS MENDEZ"
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

LA DETERMINACION DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA
PARA EL CONTROL DEL PACIENTE DIABETICO

112421

Laboratorio
clinico

FALLA DE DISEÑO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL POSTGRADO DE:
ESPECIALISTA EN PATOLOGIA CLINICA
PRESENTA

RUTH DA SILVERA MARTINEZ

Director de esta Tesis
DR. PABLO RIVERA HIDALGO



México, D. F.

Asesor
Rivera Hidalgo
Pablo
Febrero de 1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPITULO I	
	INTRODUCCION..... 1
CAPITULO II	
	OBJETIVO DE ESTUDIO..... 9
CAPITULO III	
	LA MOLECULA DE HEMOGLOBINA.....10
CAPITULO IV	
	LA MOLECULA DE GLUCOSA.....11
CAPITULO V	
	FORMACION DE LA HEMOGLOBINA A _{1c} Y LAS FRACCIONES RESULTANTES.....14
CAPITULO VI	
	GLICOSILACION DE OTRAS PROTEINAS.....22
CAPITULO VII	
	UNA MIRADA ATRAS EN EL TIEMPO.....30
CAPITULO VIII	
	UTILIDAD CLINICA.....31
CAPITULO IX	
	LA MEDICION DE LA Hb A _{1c}35
	* METODOS BASADOS EN LA DIFERENCIA DE CARGAS.....35
	LA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.....35
	ELECTROFORESIS.....41
	PUNTO ISOELECTRICO.....42
	* METODOS BASADOS EN LA REACTIVIDAD QUIMICA.....43
	METODO COLORIMETRICO.....43
	*METODOS BASADOS EN LAS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES.....46
	CROMATOGRAFIA POR AFINIDAD.....46
	*OTRAS TECNICAS.....49
	RIA, FUROSEMINA, FITICO.....49

CAPITULO X	
	SELECCION DE LA TECNICA.....50
CAPITULO XI	
	FUENTES DE CONFUSION.....51
	A.- FACTORES DE LA TECNICA.....51
	B.- LAS FRACCIONES LABILES.....51
	C.- ANEMIAS HEMOLITICAS.....52
	D.- HEMOGLOBINOPATIAS.....52
	E.- UREMIA.....53
	F.- EL CONSUMO DE ALCOHOL.....53
	G.- ASPIRINA.....53
	H.- INTERFERENCIA POR OTRAS SUSTANCIAS....53
	I.- LA UNION DE SUSTANCIAS NO AZUCARES....54
	J.- MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA..54
	K.- ANTICOAGULANTE.....54
CAPITULO XII	
	ESTANDARIZACION PARA LA DETERMINACION DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA.....55
CAPITULO XIII	
	INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.....59
CAPITULO XIV	
	DISCREPANCIAS EN LA EVALUACION ENTRE LA IMPRESION CLINICA Y LOS RESULTADOS DEL LABORATORIO.....60
CAPITULO XV	
	EL USO DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA PARA EL DIAGNOSTICO DE LA DIABETES.....61
	A.- DIAGNOSTICO.....61
	B.- DIABETES TIPO I.....62
	C.- DIABETES TIPO II.....62
	D.- DIABETES GESTACIONAL.....63
	E.- OTROS.....64
CAPITULO XVI	
	EL FURUTO.....65

CAPITULO XVII

CONCLUSIONES.....66

BIBLIOGRAFIA.....67

Los antígenos HLA II se encuentran en los linfocitos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, y en las células beta del páncreas. Estos dirigen el tránsito en el interior y exterior de los capilares. (25)

En los pacientes diabéticos las células endoteliales del páncreas se encuentran más grandes que en la población general. Por lo que, hay aumento del número de antígenos HLA II, manifestandose como una expresión aberrante de éstos y como las células beta también tienen antígenos HLA II se forman anticuerpos contra ellas, siendo atacadas por ellos, por el complemento y las células kill. Los linfocitos T se transforman en B para formar mas anticuerpos. (25)

El sistema inmune actúa rápido, pero las células T supresoras controlan a las T citotóxicas, por esto las células beta presentan un período largo de latencia antes de morir. Y ocasionan hiperexpresión de los antígenos HLA tipo I. (25)

Si a un diabético se le trata con un transplante de células beta de su gemelo idéntico, las células citotóxicas al ver células beta iguales a las del paciente las mata en 6 semanas. (25)

En un futuro debemos estudiar la actividad de las células endoteliales, la relación entre los macrófagos, las células cooperadoras, los anticuerpos y las células T citotóxicas; los factores supresores; la expresión aberrante de los antígenos HLA I y II por la célula beta. ¿ Es un acto suicida o un acecinato? (25)

La Diabetes Mellitus se clasifica en:

TIPO I.- DIABETES INSULINO DEPENDIENTE CETONICA.- Se asocia a antígenos HLA en el cromosoma 6 y a anticuerpos anti-células beta del páncreas. (4,25,40)

TIPO II.- DIABETES NO INSULINO DEPENDIENTE, NO CETONICA.- No es secundaria a otra enfermedad o condición. Se subdivide en: obesos y no obesos. Se caracteriza por su tratamiento con hipoglicemiantes orales.

TIPO III.- DIABETES ASOCIADA A CONDICIONES O SINDROMES.

TIPO IV.- DIABETES GESTACIONAL.

TIPO V.- INTOLERANCIA INAPROPIADA A LA GLUCOSA, QUIMICA, SUBCLINICA, ASINTOMATICA, LATENTE O BORDENLINE. (40)

La Diabetes Mellitus se estima a nivel mundial en 30 a 50 millones y se encuentra entre los 3 primeros lugares como causa de muerte.(5) En los países con alto nivel de vida se presenta con una frecuencia de 2 a 3%, (5) en los pue-repechas en el 5% (41) y de 8 a 10% en las personas con algún transtorno en la tolerancia a la glucosa. (12)

La Diabetes Mellitus a nivel nacional es de 2 a 14.5% (50) con una intolerancia a la glucosa de 10.03% (47) a 12.6% (60); de 90 (5) a 98% (47) es de tipo II. Pues influyen factores ambientales y genéticos inmuno-químicos que explican lo encontrado en el país. (5)

Más del 75% se encuentra en descompensación metabólica y expuestos a las repercusiones crónicas de la hiperglicemia. (17,32,47,58) con afección autonómica y periférica, (cardiopatía, hipertensión arterial, arteriosclerosis, cataratas, nefropatía e infecciones).(7,8,12,31) Por lo que, se ha

encontrado correlación lineal entre la nefropatía diabética y el tiempo de evolución de ésta, (20) así como retraso en el desarrollo pondo-estatural del niño con mal control metabólico de su glucosa. (32)

Por estudios del comportamiento de la glicemia en la relajación inducida por retroalimentación biológica. Se tomó la glucosa en sangre sin que los pacientes modificaran sus actividades cotidianas y llevaron un registro de la valoración subjetiva del nivel de stress antes y después de la relajación en casa. Se concluyó que el stress cotidiano no modifica significativamente el control de la Diabetes Mellitus. (42)

Entre los factores de riesgo para la Diabetes Mellitus se encuentra la obesidad que es más frecuente en mujeres cuando es mayor de 30% y en los hombres cuando es de 15 a 30%. (60) Otros factores de riesgo son la herencia y las infecciones virales. (31) En la Diabetes Gestacional entre los indicadores de riesgo, el mayor porcentaje de peso para la talla pre-gestacional y la edad mayor de 31 años, son los indicadores con mayor grado de asociación con altos valores de glucosa. (58)

La Diabetes Mellitus Insulino Dependiente predomina entre los 10 y 14 años de edad (32) con un promedio de 12.5 años. clínicamente el 91% presenta poliuria-polidipsia, el 60% cetoacidosis, el 37% polifagia, el 25% infecciones virales y enterales, y el 7% remisión en "luna de miel". (50)

La alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono es una incógnita todavía con respecto a las repercusiones materno-fetal. Se ha relacionado con complicaciones durante el embarazo como la toxemia, hidradmio, amenaza de parto prematuro, infecciones de vías urinarias y las cesareas. Los

productos son macrosómicos, con cuadros de hipoglicemia, hipercalemia, ictericia, policitemia y malformaciones mayores como cardíacas, meningocele, regresión caudal, encefalocele, amemcefalia, Turner y Potter. Por lo que, se insiste en la importancia de lograr un control estricto de las alteraciones metabólicas de los hidratos de carbono, previo y durante el embarazo. Esto con la finalidad de disminuir la mortalidad perinatal. (19)

El tratamiento de la Diabetes Mellitus debe dirigirse a llevar un control metabólico que pueda vigilarse como la hemoglobina glicosilada, para reducir o retardar la aparición de las complicaciones crónicas. (57)

Los puntos a seguir en el tratamiento son:

- * Uncontrol metabólico;
- * Antineuríticos;
- * Inhibidores de la aldosa y reductasa;
- * Galglicosidos; y
- * Estimuladores eléctricos. (24)

La actitud del diabético frente a su enfermedad es tan importante como el control de la diabetes por el médico. La cooperación activa del paciente por medio del autocontrol refuerza su sentido de responsabilidad, siguiéndose al mismo tiempo por un programa educativo y tranquilizador. (7,8) Porque por un lado el paciente reconoce inmediatamente un error dietético (7,13) y por otro lado se da cuenta oportunamente de un deterioro grave en su estado metabólico. (7)

El registro de los resultados del autocontrol (16) de las mediciones de la glucosa en orina (9,12) o sangre (10, 11,12,16,35) realizado por el paciente ofrece al médico tratante una rápida orientación sobre la compensación metabólica durante las semanas anteriores. Constituyendo además un punto

de partida para la discusión entre el paciente y el médico sobre el comportamiento y las medidas a tomar ante determinada situación metabólica. (7,8,11,13,16)

La dieta es la base del tratamiento de la Diabetes (7,13). La modificación de la dieta, la pérdida de peso y el ejercicio deben de seguirse promoviendo en el tratamiento de todo paciente diabético, en forma independiente de su edad, tiempo de evolución o terapéutica utilizada. (59)

Un recurso para bajar de peso es la dextrofenfloramina, que es un serotoninérgico sin actividad catecolamínica ni antidopaminérgica. Inhibe selectivamente el consumo de carbohidratos y la polifagia compensadora de la hipoglicemia y post-estress. Clínicamente es evidente el efecto del fármaco en la reducción ponderal. (28)

La dieta recomendada debe ser hipocalórica con reducción de carbohidratos. (31) Existen algunas plantas hipoglicemiantes como el matarique que reduce la glicemia un 25.7% el diguayacán un 24.5%, el nopal el 20.9%, el guarumbo 20.7%, las lágrimas de San Pedro un 19.4%, la tronadora 19.3 %, la agrimonia el 18.7%, el níspero un 15.8%, la catarinilla el 14.4%, (la tolbutamida 14.3%) la vaina de frijol el 13.2 %. (51)

El campamento de verano "Campo Amigo" de niñas y niños diabéticos, se lleva a cabo con la finalidad de aprender sobre su enfermedad, aceptandola como parte integral de su vida. Se cuenta con programas de enseñanza/aprendizaje, deporte, nutrición, autocontrol, etc. Se observó que el 86% de los niños tuvieron buenas calificaciones, pero solo el 34% con buen control metabólico. Para estabilizar la glucosa sanguínea en los pacientes diabéticos se concluyó que se debe modificar el tipo y las técnicas de educación, tomando en cuenta la acti-

tud y la habilidad psicomotriz individual.(17)

La Administración oral de zinc mostró en los diabético concentraciones altas de zinc y somatomedina C. Los niños con Diabetes Mellius Insulino Dependiente mostraron incremento significativo en la velocidad de crecimiento, lo que sugiere que el zinc juega un papel importante sobre las concentraciones séricas de la somatomedina en los pacientes con Diabetes Mellitus Tipo I en mal control metabólico. (3)

El tratamiento de la polineuropatía diabética sensitiva-motora con un inhibidor de la aldosa reductasa(Tolrestat) da respuestas estables, responde clínicamente a las cuatro semanas con respecto al dolor, pero no mejora la parestesia. La conducción motora mejora en 18 a 24 semanas y la sensitiva no. Los síntomas autonómicos no mejoran significativamente, pero si las pruebas. (27)

La estimulación eléctrica transcutánea es una forma diferente de tratamiento sintomático de la neuropatía diabética sensorial, en los casos en que el tratamiento farmacológico con tricíclicos, carbamacepina y analgésicos ha fallado. Además de lograr una recuperación de grado variable en la velocidad de conducción y periodo de latencia distal del nervio anterior. (49)

El cuidado de los pies es importantísimo(13,24,31) para no llegar al último extremo que es la cirugía. En el pie diabético las cirugías limitadas presentan mayor morbilidad por la mayor frecuencia de complicaciones post-operatorias y el 60% requiere de reamputación. La mortalidad es alta por la severidad de los factores de riesgo alto en el diabético.(24)

La determinación de la hemoglobina glicosilada es

un reto para el médico al utilizarla en el control del paciente diabético. Ya que la Diabetes es una de las pocas enfermedades que presentan fluctuaciones químicas tan rápidas como en sus valores de glucosa. (38)

La medición de la glucosa sanguínea refleja la concentración de la glucosa en el momento en que se efectúa la prueba, por lo que no es útil en el control a largo plazo del paciente diabético. Sin embargo la hemoglobina glicosilada nos da un promedio de los valores de glicemia durante 2 ó 3 meses antes del examen. (4,7,36,38,54,62)

CAPITULO II

OBJETIVO DE ESTUDIO:

- 1.- Analizar la formación, estructura, utilidad diagnóstica y la medición en el laboratorio de la hemoglobina glicosilada.

CAPITULO III

LA MOLECULA DE HEMOGLOBINA

La molécula de hemoglobina es la principal proteína transportadora de oxígeno en el cuerpo. (22,46) Esta circula en el eritrocito, el cual tiene una vida media de 120 días. Donde se encuentra a una concentración de 5mM y tiene un peso molecular de aproximadamente 61 000 daltons. La hemoglobina está constituida por 2 cadenas alfa y 2 no alfa, así como de un grupo heme. Las cadenas están compuestas de aminoácidos, 141 para las alfa y 146 para las beta. (46)

La heterogenicidad de la hemoglobina fue determinada por Allen en 1958, por cromatografía de columna. Observó 2 tipos de fracciones, unas genéticamente determinadas (HbA_0) y otras como resultado de alteraciones postraduccionales durante el devenir de las moléculas de hemoglobina. (1,43,46) ($Hb A_{1a,b,c,d,e}$) (62)

Las fracciones genéticamente determinadas son como la hemoglobina fetal, que predomina en el neonato. La cual retiene al oxígeno con más afinidad para facilitar su transporte de la madre al feto. (46) La hemoglobina fetal tiene 2 cadenas alfa y 2 gama. Estas se encuentran a una concentración menor del 1% en el adulto. (43,63) Cuando el humano alcanza el año de edad, el 90% de su hemoglobina es A_0 (adulto), la que consta de 2 cadenas alfa y 2 beta. La hemoglobina A_2 está formada por 2 cadenas alfa y 2 delta, se encuentra a una concentración de 2.5 a 3%. (43,63)

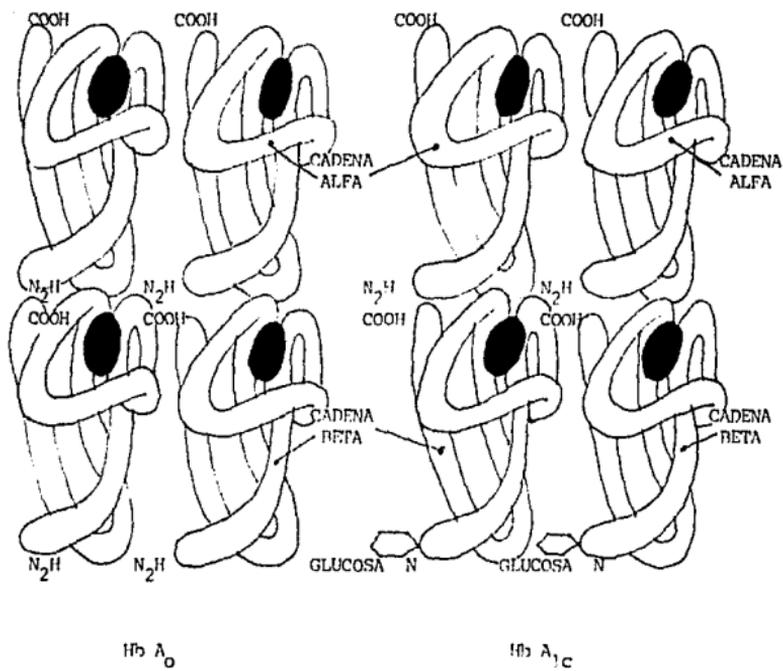


Figura 2.- Esquema de la hemoglobina A₀ y la hemoglobina A_{1c}. (8,46)

En la estructura molécul ar de la hemoglobina hay un número de sitios reactivos, por ejemplo el 25% del bióxido de carbono es transportado en el cuerpo por el grupo amino terminal de valina. Hay algunos grupos amino epsilon de lisina disponibles para reaccionar en las cadenas alfa y beta. (46)

Las Hb A_{1a,b,c} son las fracciones modificadas en el devenir de la molécula. Están formadas por la unión de un carbohidrato a la Hb A₀, cambiando su carga eléctrica, conteniendo menor número de cargas positivas a un pH neutro y migra más rápido que la Hb A₀, por lo que se les llaman "hemoglobinas rápidas". (1,22,36,62) Pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico, principalmente la Hb A_{1a} y la Hb A_{1b} (30,38,44,62) que representa el 1.5% del total de la hemoglobina. La Hb A_{1c} constituye el 5% de la hemoglobina glicosilada. (1,8,22) Los valores de la Hb A₁ y la Hb A_{1c} están relacionados estrechamente. Estos 2 parámetros tienen similar importancia diagnóstica. (38)

Las Hb A_{1a1} y la Hb A_{1a2} provienen de la fijación de fructuosa 1,6 difosfato. La Hb A_{1c} no se sintetiza en el ribosoma, sino se produce durante la vida del eritrocito por alteración de la Hb A₀. Por lo que, la secuencia de aminoácidos de la Hb A_{1c} es idéntica a la de la Hb A₀, pero el grupo alfa amino terminal de la cadena beta está bloqueado por un residuo de carbohidrato. (22) No se conocen con seguridad las alteraciones metabólicas de la Hb A_{1c}, aunque parece ser que se une al oxígeno con más afinidad y por lo tanto, lo libera menos a los tejidos y además la glucosilación impide la fijación del 2,3 DFG a la cadena beta de la hemoglobina. (26,43)

CAPITULO IV
LA MOLECULA DE GLUCOSA

La glucosa existe en forma de piranosa (inactiva) y en forma lineal (activa) como un radical aldehído, el que puede reaccionar con los grupos amino libres de las proteínas o con el grupo epsilon amino de la lisina. Normalmente circula a una concentración de aproximadamente 5mM (90mg/dl) en el eritrocito y en el plasma. (46)

El eritrocito no requiere de insulina para introducir glucosa y al elevarse los niveles de ésta, proporcionalmente se elevan dentro del eritrocito. (46)

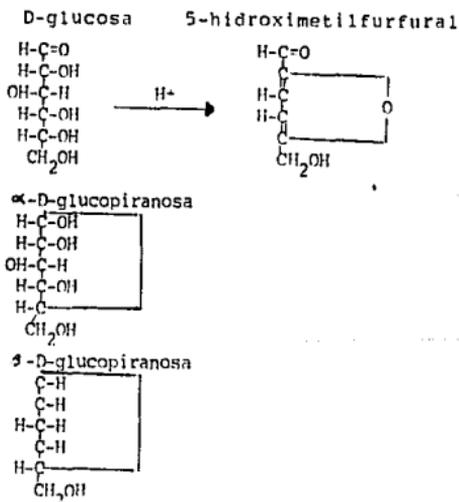


Figura 3.- La glucosa puede circular en diversas formas, la de aldehído libre es la forma más reactiva, pero su concentración en la circulación es relativamente pequeña (menos de 0.1%). (46)

CAPITULO V
FORMACION DE LA HEMOGLOBINA A_{1c}
Y LAS FRACCIONES RESULTANTES

El término de hemoglobina glicosilada se refiere a la serie de componentes menores de la hemoglobina que, se forman por unión de azúcar a la hemoglobina. Esta reacción no es enzimática. (1,8,15,22,26,36,43,48,54,62) sino que se trata de una reacción cinética de primer orden, dependiente de la concentración de glucosa dentro del eritrocito y a lo largo de su vida. Por lo que los niveles de hemoglobina glicosilada están incrementados en los eritrocitos viejos. La glicosilación es lenta, continua e irreversible. (1,8,26,43,45,54,62) La Hb A₁ se forma en el eritrocito por la reacción de la glucosa u otro azúcar con la Hb A₀. (8,22,36)

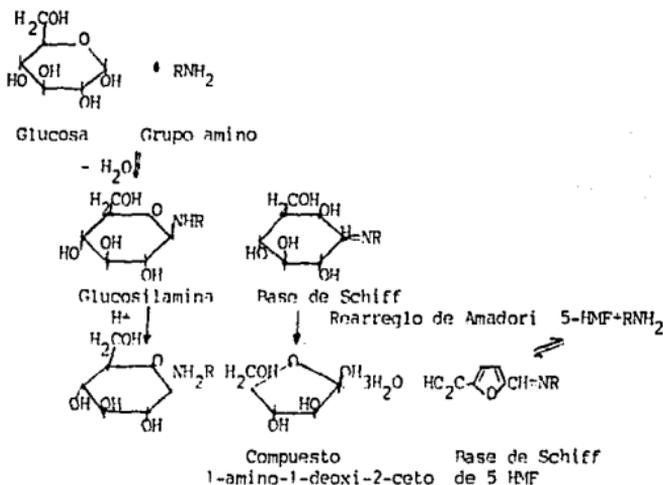


Figura 4.- Esquema simplificado de la secuencia de reacciones involucradas en la formación de la Hb A_{1c} y su subsiguiente rearreglo de Amadori. (22)

En la Diabetes el grupo aldehído (CHO) de la glucosa se une al grupo amino (NH_2) de valina, a una o a ambas cadenas betas de la Hb A_0 . (1,8,15,22,30,36,45) Dependiendo del método de medición, la Hb A_{1c} constituye aproximadamente de 3 al 6% en los no diabéticos y hasta más de 20% en el diabético no controlado. (1,7,22,30,36,45)

La glicosilación es una serie de modificaciones conocidas de postraducción que afectan a las proteínas. (45) Consta de 2 pasos, el primero es la formación de una aldimina inestable. El segundo es la transformación por medio del rearrreglo de Amadori en una cetoamina estable. (8,43)

El paso inicial es la unión de un grupo amino libre de la hemoglobina con el grupo aldehído de la molécula de glucosa para formar la aldimina. Solo el 0.0001% de la glucosa en solución está en forma abierta. La Base de Schiff o aldimina está en equilibrio con la disociación del azúcar para formar la cetoamina. (4,8) La cinética de esta reacción inestable es aproximadamente 60 veces mayor que la formación de la cetoamina estable. (38) Estas 2 formas pueden separarse por métodos finos como la isotacoféresis, detectándose a la aldimina como respuesta rápida por la elevación de los niveles de glicemia. (8)

Las pentosas son más reactivas que las hexosas y de éstas la D-galactosa y la D-manosa son más reactivas que la D-glucosa. La actividad de las aminas con el grupo carboxilo depende básicamente del grupo amino y de los factores externos. (38) Los grupos alfa amino tales como el residuo terminal de valina son más activos que los grupos epsilon amino de la lisina. (38,46)

NOMENCLATURA DE LAS HEMOGLOBINAS (26)

- HbA** Principal forma de la hemoglobina, en su forma nativa consta de un tetrámero no modificado de 2 cadenas alfa y 2 beta.
- Hb A₀** Componente principal de la Hb A₁, identificado por sus propiedades cromatográficas y electroforéticas.
- Hb A₁** Componente con modificaciones postraduccionales, es más negativa que la hemoglobina A, se determina por cromatografía y electroforésis.
- HbA_{1a}, HbA_{1a2}, HbA_{1b}, HbA_{1c}** Distintos componentes de la Hb A₁ identificados por cromatografía.
- Hb A_{1c}** Molécula de la HbA₀ modificada por la unión de glucosa al residuo terminal de valina de las cadenas beta, a través de una unión cetoamina.
- pre-Hb A_{1c}** Una forma lábil de la hemoglobina glicosilada que contiene glucosa unida por una unión aldimina al residuo de valina de las cadenas beta.
- Hemoglobinas "rápidas"** La fracción total de las Hb A₁, las cuales al tener una carga más negativa, emigran más rápidamente hacia el ánodo en la electroforésis y en la cromatografía de intercambio iónico que la Hb A₀.
- Hemoglobinas glicosiladas** Hemoglobinas modificadas por tener glucosa unida a las cadenas alfa y beta de los residuos terminales de valina y a los grupos epsilon amino de los residuos de lisina.

Los sitios específicos y las condiciones de la glicosilación de la hemoglobina, han sido caracterizados por varios investigadores. Los aminoácidos de la hemoglobina han sido establecidos y al parecer no son diferentes las estructuras primarias de las cadenas alfa y beta de la Hb Λ_0 y la de la Hb A_{1c} . La cetoamina o el aldehído que se une al grupo N-terminal del aminoácido forma una base de Schiff, ésta tiene un peso molecular de aproximadamente 200. (8)

Los aldehídos cíclicos, esteroides y moléculas que contienen fosfato y aminoácidos, fueron excluidos como posibles sitios de unión. Subsecuentemente Bookchin y Gallop establecieron que los grupos N-terminal de valina en la Hb A_{1c} están modificados. (8)

Usando la cromatografía para purificar la Hb A_{1c} , Bunn y Col. aislaron glucosa del aldehído por hidrólisis ácida. En un nuevo trabajo del grupo de Bunn, identificaron otras fracciones menores de la hemoglobina, la Hb A_{1a1} y la Hb A_{1a2} que son modificadas por fosfatos. Las Hb A_{1c} en su mayor parte es modificada por glucosa. La Hb A_{1b} es un producto de desecho de la Hb A_{1c} (38)

El cambio del punto isoelectrico de la molécula de hemoglobina es causado por la modificación del grupo N-terminal de valina. Esto permite la medición cuantitativa de la hemoglobina glicosilada de la que no está glicosilada, por varias técnicas. Los métodos basados en el cambio de cargas para separar las proteínas fueron usados para medir la Hb A_{1c} . La parte separada fue por modificación del grupo N-terminal de valina, este no fue el único sitio de glicosilación de la molécula de hemoglobina. (38)

La disminución relativa del pK del grupo N-terminal de valina, (el pK de este grupo es de 6.65 (22)) la hace susceptible a la formación de la base de Schiff, a un pH fisiológico, siendo estable a un pH de 4.0, (22) en un sitio como el sitio epsilon amino de lisina, son capaces de formar una aldimina con la glucosa. (38)

Por los métodos usuales como la cromatografía de intercambio iónico, el método colorimétrico con ácido tiobarbitúrico y la cromatografía por afinidad al borato. Bunn y Col. demostraron que un número de grupos epsilon-amino de lisina fueron glicosilados también como la cadena alfa o beta del grupo N-terminal de valina. Aunque hay muchos mas en lisina que en valina. Generalmente hay menor susceptibilidad a la glicosilación de lisina. (38)

Valina es glicosilada en un 4 a 5% al final de los 120 días de vida del eritrocito en el no diabético. El 1% del total de lisina está glicosilada. La hemoglobina con glicosilación solo del residuo de lisina, con pKa de 10, se separa con el método de cromatografía de intercambio iónico usual o la electroforesis y sin embargo no es medible al usar estos métodos. (38)

La exposición de las proteínas a la glucosa en el espacio vascular, extracelular y el intracelular, origina la glicosilación de varias proteínas. aunque no se entiende completamente esto, parece que la permeabilidad de varios tejidos a la glucosa, es el mayor parámetro de la glicosilación. (14,38)

Bunn y Col. han estudiado los eritrocitos de varias especies incluyendo al hombre, al chango, al cerdo, perros y conejos. Estudiaron la unión de la glucosa sanguínea en la vida del eritrocito en cada especie. (38,62)

La magnitud de la glicosilación depende de la permeabilidad del eritrocito a la glucosa. El eritrocito del cerdo en momentos es impermeable a la glucosa y su hemoglobina no se glicosila. En contraste con el eritrocito humano que es realmente permeable a la glucosa, con una glicemia intracelular similar a la concentración plasmática. (38)

Durante los 120 días de vida del eritrocito humano es expuesto a la concentración de la glucosa del ambiente. En los no diabéticos el promedio de glucosa plasmática es de aproximadamente de 90mg/dl. El diabético tipo I tratado con 2 inyecciones por día o menos, usualmente mantienen un promedio de glucosa plasmática de 230 mg/dl, aproximadamente 2 1/2 veces el promedio del no diabético. (2,38) Tan pronto como el eritrocito sale de su origen, la médula ósea, se glicosila lentamente, primero reversible y después irreversiblemente. El proceso es continuo durante toda la vida del eritrocito. (38)

Experimentos in vivo e in vitro, así como modelos matemáticos, describieron los pasos de la glicosilación, las características que determinan la velocidad y la extensión de la glicosilación. Estas son las siguientes:

- * La concentración de glucosa en el ambiente;
- * El tiempo de vida del eritrocito;
- * La concentración del 2,3 DPG;
- * El pH intracelular;
- * La competición por los sitios de glicosilación (acetilación); y
- * El 1% de la hemoglobina no susceptible a la glicosilación. (38)

Al exponerse la Hb A₀ a la glucosa ocurre la formación reversible de la aldimina, seguida de la formación irreversible de la cetoamina. Por el tiempo de vida del eritrocito y el número de sitios glicosilados se incrementa pro-

porcionalmente en la Hb A_{1c} en relación a la concentración de la glucosa. (38)

La relación entre el promedio de la glucosa plasmática y la concentración de la Hb A_{1c}, fueron estudiados por Suendsen y Col. y Nathan, ambos estudios se establecieron en el curso de 5 a 8 semanas y compararon el promedio de la medición de la concentración de la Hb A_{1c} al final del periodo. La investigación de Suendsen demostró una línea curva acorde con los datos. Estudios posteriores demostraron una línea relacionada entre el promedio de la glucosa plasmática de 85 a 350 y la Hb A_{1c}. Los resultados de los 2 estudios fueron similares. (38)

CAPITULO VI

GLICOSILACION DE OTRAS PROTEINAS

La glicosilación puede progresar a una serie de reacciones no enzimáticas, (1) algunas de éstas no han sido bien caracterizadas. (4,46)

La hemoglobina no es la única proteína capaz de glicosilarse. Por ejemplo, la glicosilación no enzimática y la reacción en cadena se han implicado en un número de problemas asociados con la hiperqlicemia y la diabetes mellitus. (4,15, 26,38)

Concentraciones altas de glucosa permiten el incremento de la glicosilación, también en otras proteínas. Particularmente se afectan las proteínas de larga vida, en células que no dependen de la insulina para la incorporación de glucosa. Como las células glomerulares, los eritrocitos, las células de la retina y las neuronas. La glicosilación derivada de las proteínas de la membrana del eritrocito, el lente del cristalino, la albumina, la colágena y la mielina de los nervios. (15,26,38)

La glicosilación no enzimática se ha demostrado primero en el cristalino, ya que sus proteínas persisten por toda la vida. Se han encontrado 2 tipos de uniones, unas que pigmentan a las proteínas por aumento de la vulnerabilidad de estas proteínas a la oxidación y finalmente a la opacidad de la lente ocular. Puede ser por la glicosilación o por puentes disulfuro entre los grupos sulfidrilo(SH) y los grupos del aminoácido cisteína. (15,46)

El residuo fructuosa-lisina del inicial rearreglo de Amadori de la glicosilación protéica se incrementa formando uniones cruzadas en las proteínas de larga vida, por degradación oxidativa del carboxil-metil-lisina inerte. El daño por

la unión y oxidación se han implicado en la patogénesis de la catarata diabética. Las uniones son la base de la fluorescencia de las proteínas del lente envejecido. En el lente normal los residuos fructuosa-lisina permanecen constantemente con la edad, mientras que los carboxil-metil-lisina se incrementan linealmente. (36)

La conversión de fructuosa-lisina a carboxi-metil-lisina puede ser inaparente en el cristalino del diabético; pero debido a la hipoxia se favorece la formación de agregados insolubles de los productos fluorescentes y por lo tanto, aceleran la formación de cataratas. (36) En general la hipoxia baja el rendimiento de los individuos sanos. (21)

Las proteínas plasmáticas también son glicosiladas por lo que son una alternativa de la hemoglobina glicosilada en las mediciones para el control de la glicemia. Las circunstancias del almacenamiento y la vida de la albumina (2 semanas) nos indican que es mejor la albumina glicosilada que la hemoglobina glicosilada para el control a corto plazo. (4,46)

La glucosa se consideraba biológicamente inerte, pero al aumentar su concentración puede alterar permanentemente a las proteínas, contribuyendo al envejecimiento asociado a la declinación de las funciones de las células y los tejidos. (15)

El acelerado "envejecimiento" de la colágena a sido documentado en personas diabéticas y éste se ha relacionado con la acelerada glicosilación de la colágena. (1,15) La que parece ser un proceso normal de envejecimiento y se acentúa en el individuo con hiperglicemia. La colágena que se glicosila es menos soluble y menos susceptible a la digestión proteolítica que la colágena no glicosilada. Esto sugiere que la forma-

ción de la reacción cruzada puede ocurrir como resultado de las excesivas reacciones no enzimáticas del residuo de lisina e hidroxilisina en el colágeno. (15,46)

El envejecimiento inicia cuando al aumentar los niveles de glucosa, ésta se abre rompiendo su anillo, activándose, y así el grupo aldehído (CHO) de la glucosa se une al grupo amino (NH_2) de la proteína, formando la base de Schiff. La que es inestable y por un proceso desconocido llamado Rearreglo de Amadori, él que por deshidratación con los años se transforma en producto final de la glicosilación avanzada (AGE). Este es de color amarillo-café y fluorescente. Los AGEs se unen al grupo amino de otra proteína originando uniones cruzadas permanentes derivadas de la glucosa. (15,33)

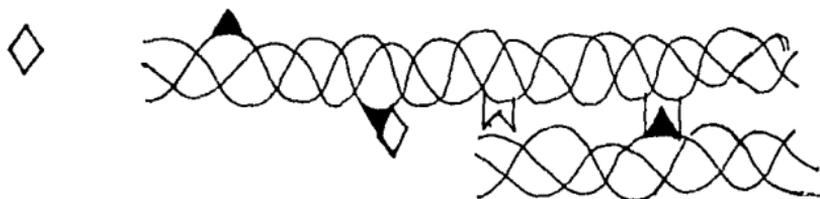
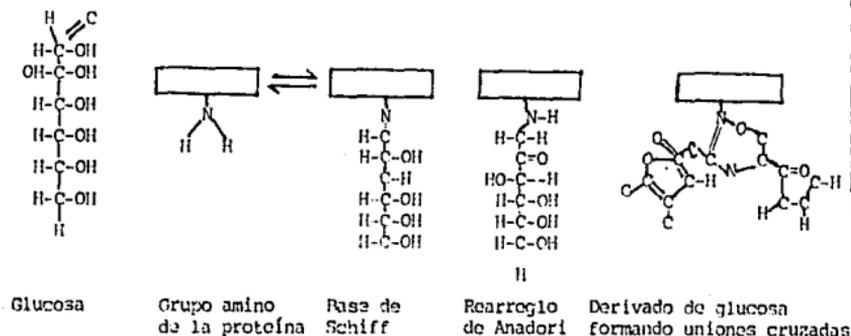


Figura 5.- Formación de las uniones cruzadas derivadas de la glucosa(15).

Los productos de la glicosilación avanzada tienen actividad quimiotáctica para los macrófagos y los atraen al sitio de la proteína glicosilada donde ellos la han modificado y ayudan a mantener la hemostasia tisular. (33)

En los ancianos las células y tejidos se transforman para declinar y morir. La célula se vuelve menos eficiente y menos capaz de reparar los daños materiales y se endurecen los tejidos. Por ejemplo, el pulmón y el miocardio se expanden menos, los vasos sanguíneos se hacen rígidos, los ligamentos y tendones se endurecen. Los ancianos son más propensos a desarrollar cataratas, aterosclerosis y cáncer entre otras enfermedades. (15)

Un receptor para los AGEs en las células endoteliales para las proteínas con AGEs, se asocia con un aumento en la actividad por-coagulante, con la cual actúan sinérgicamente los macrófagos, mediante la acción trombótica del TNF. Esto sugiere que en la diabetes la acumulación excesiva en el tejido subendotelial puede contribuir a la coagulopatía diabética y posteriormente formar la enfermedad oclusiva vascular. (63)

Otro cambio funcional intrigante de la glicosilación no enzimática es que las lipoproteínas de baja densidad (LDL), al incubarlas con la glucosa inducen uniones covalentes entre la glucosa y los grupos epsilon-amino de los residuos de lisina de las hapolipoproteínas humanas. Las LDL son glicosiladas más lentamente y en un grado similar hay mayor síntesis de colesterol. Sin embargo, la glicosilación no altera la función de las lipoproteínas en la propensión de los diabéticos a la aterosclerosis. (23,34,35)

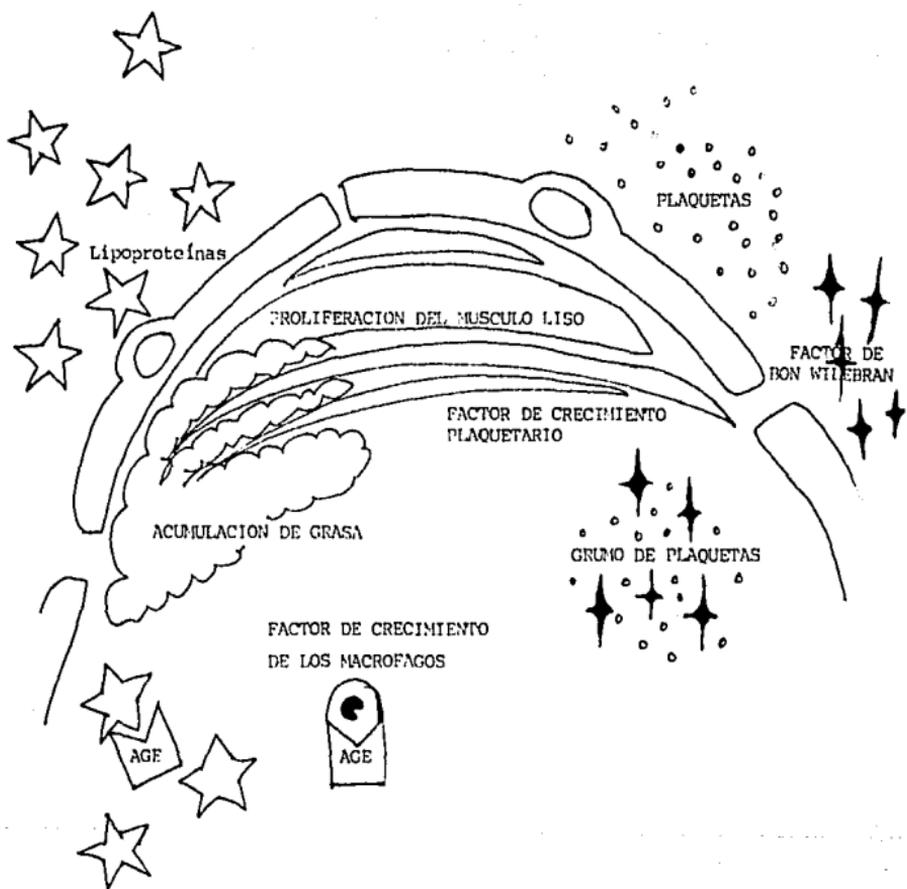


Figura 6.- Contribución de los productos finales de la glicosilación avanzada en la arteriosclerosis. (15)

La glicosilación no enzimática también ocurre en algunas membranas protéicas con efectos potencialmente patológicos. La glicosilación de la membrana basal glomerular afecta la cantidad y la calidad protéica. (55)

La membrana eritrocitaria está más glicosilada en los hematíes obtenidos de diabéticos que los de los controles normales. Los eritrocitos del diabético tienen una vida más corta y son menos deformables que los de los individuos normales, este fenómeno se asocia con la disminución de la irrigación asociada a la diabetes. (46,56) La disminución de la deformidad de los eritrocitos también se asocia a la oxidación del grupo thiol expuesto en la membrana. (56)

Se han mostrado reacciones similares en los nervios. El aumento de la glicosilación de la mielina de los nervios implica un incremento de la susceptibilidad de estas proteínas a la digestión proteolítica y de la habilidad para reparar las áreas desmielinizadas. (15,46)

Al separar la colágena de la duramadre de individuos ancianos y de diabéticos, se encontró un pigmento café-amarillo que fluoresce y tiene propiedades espectrofotométricas similares a la de los productos finales de la glicosilación avanzada. (15)

La glicosilación no enzimática de las proteínas estructurales de los órganos y tejidos se incrementan en los ancianos. La extensa unión de los carbohidratos a las proteínas, probablemente contribuyan al endurecimiento y a la disminución de la elasticidad característica de los tejidos envejecidos. La unión no enzimática de glucosa a los ácidos nucleicos puede gradualmente dañar al DNA. (15)

El envejecimiento toma lugar a nivel celular como en los tejidos. El DNA contiene grupos amino y es de larga vida, pudiendo acumular los productos finales del metabolismo de la glicosilación avanzada. Estos pueden contribuir a incrementar la alteración cromosómica relacionada con el envejecimiento, como la declinación de la reparación, la replicación y la transcripción del DNA. Tales cambios genéticos se cree que dañan la habilidad del cuerpo para reparar las proteínas especializadas en la función y sobrevivencia normal de la célula. La glicosilación no enzimática puede también causar mutaciones que afecten la actividad del sistema inmune o permitiendo algunos tipos de cánceres. (15)

Los genes colectan productos finales de la glicosilación y la mutación resultante surge cuando se trata de reparar el DNA alterado por los productos finales de la glicosilación avanzada. Esta conclusión se basa en que la célula bacteriana deficiente de una enzima reparadora del DNA tiene mutación en el DNA. (15)

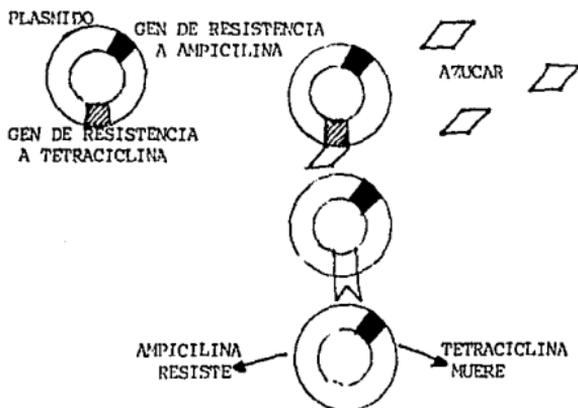


Figura 7.- Mutación del DNA de una bacteria por incubación en glucosa.(15)

La aminoquanidina es útil para prevenir las uniones cruzadas entre las proteínas. Es una hidralacina que reacciona con el rearrreglo de Amadori aparentemente unido al grupo carbonil impidiendo que éste se transforme en un producto de la glicosilación avanzada, tanto en los diabéticos como en el envejecimiento de los no diabéticos. (15)

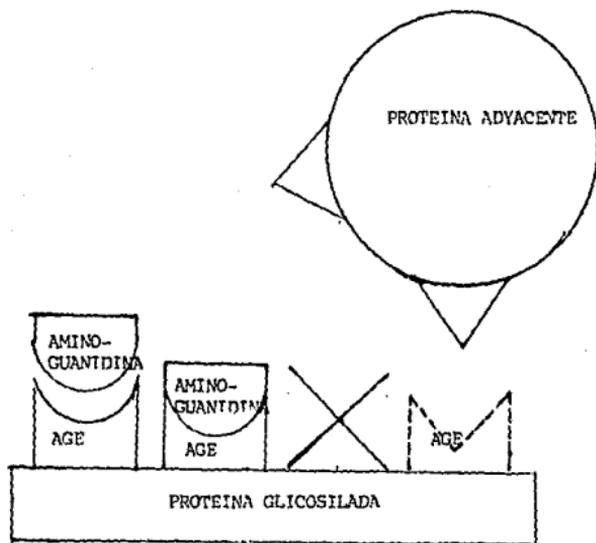


Figura 8.- La aminoquanidina, una droga experimental que interfiere con el rearrreglo de Amadori bloqueando su transformación que origina las uniones cruzadas entre las proteínas. (15)

Con 200mg/Kg de peso/día de aspirina disminuye la glicosilación un 26%, al disminuir la oxidación del grupo tiol expuesto por la membrana del eritrocito a un 18%. (56) La aminoquanidina disminuye la glicosilación un 100%. (15,56)

CAPITULO VII

UNA MIRADA ATRAS EN EL TIEMPO

La única característica de la Hb A_{1c} es que da una vista retrospectiva de los niveles de glicemia. Se han realizado numerosos estudios de la Hb A_{1c} para darnos una alternativa aparte de la glucosa en sangre y así llevar el control del "índice diabético", basado en el dato de la Hb A_{1c} que nos da el valor de la glucosa sanguínea de 6 a 8 semanas. (38)

Los factores que modifican la relación entre la glucosa plasmática y la Hb A_{1c} son la sobrevida y las características del eritrocito, como la hemólisis, la pérdida de sangre, que conduce a una acelerada producción de eritrocitos por la médula ósea, disminuyendo los valores de la hemoglobina glicosilada. (38)

La acetilación compite con la glucosa por los sitios de unión, pero depende de la técnica usada. La hemoglobina acetilada migra con la hemoglobina glicosilada y causa un incremento al medir la glicosilación. (38)

Otros factores son el pH intracelular y la concentración del 2,3 DPG, que presentan una concentración menor de la glicosilación. (38)

CAPITULO VIII UTILIDAD CLINICA

En 1971 Trevellin y otros (15) encontraron que la Hb A_{1c} está más elevada en pacientes diabéticos que en las personas normales y se relacionó la Hb A_{1c} con otros parámetros como el estado clínico, la glicemia basal y la glucosuria de 24 horas, los triglicéridos, el colesterol, las lipoproteínas, la tolerancia oral a la glucosa, la viscosidad sanguínea y otros parámetros de control y diagnóstico de la diabetes. Existiendo correlación con todos, principalmente con la glucosuria de 24 horas de las últimas 4 a 6 semanas, por lo que la Hb A_{1c} refleja el equilibrio glucosilado de los últimos meses. (26)

La necesidad de determinar un índice de tiempo prolongado para el control de la glucosa en la diabetes crónica ha emergido para establecer el grado de control metabólico y el descubrimiento de las complicaciones. (7,22,36) La glicemia en el diabético varía extraordinariamente de hora a hora y día a día. Los valores semicuantitativos en orina y sangre han sido reemplazados por el solo monitoreo de la glucosa sanguínea, que requiere extraordinaria cooperación del paciente y no establece el grado de control metabólico. (38)

Es muy importante para el control del diabético ambulatorio y más del individuo indisciplinado, la realización quincenal o mensual de una determinación de la glicemia y la glucosuria en una fecha fija no tiene valor, pues con un día o 2 de régimen estricto, obtiene cifras normales, pues la glicemia cambia rápidamente, llevando al médico a la creencia de tener un buen control. Lo que se evita con la determinación de la hemoglobina glicosilada cada 2 meses, comprobando este valor al internar al paciente y normalizar la Hb A_{1c}, por el régimen del internamiento. (7,8,26,38)

La hemoglobina glicosilada permite juzgar el tratamiento de 3 a 5 semanas, (8,26) no requiere ayuno, ya que su valor no depende del momento del día en que se tome la muestra. Además sirve de criterio diagnóstico de la diabetes, pues hay estrecha relación entre la Hb A_{1c} y la prueba de tolerancia oral a la glucosa. Es útil sobre todo en las curvas planas o en los límites de normalidad. (26)

La desventaja de la Hb A_{1c} es que no sirve en casos de urgencia como en hiper o hipoglicemia. Nos da valores falsos en hemoglobinopatías como en la Hb F donde son altos y en la hemoglobinopatía S y C se presentan valores inferiores. Cuando la vida del eritrocito es corta, obtenemos cifras bajas de la hemoglobina glicosilada. (26) El estrés produce elevación de la Hb A_{1c}. (8,26)

La medición de la Hb A_{1c} es particularmente útil en diversas situaciones:

- 1).- Al seguir el grado de control metabólico en pacientes con Diabetes Tipo I y II. Las mediciones cada 3 meses juzgan la eficiencia del tratamiento y las complicaciones del paciente. (7,8,38)
- 2).- Para saber el grado de control metabólico en pacientes que no se han hecho exámenes previos. No hay otra forma de evaluarlos, la Hb A_{1c} es el método con mayor utilidad para evaluar a este grupo. (8,38)
- 3).- Al evaluar la hiperglicemia por estrés o hiperglicemia por enfermedad intercurrente como la sépsis, la hiperglicemia por hospitalización pero sin historia de diabetes crónica, en cualquiera de estos casos y con una hemoglobina glicosilada normal, se descarta la intolerancia a la glucosa y sugiere que la hiperglicemia está relacionada al estrés por la enfermedad. Sin embargo, si la hemoglobina glicosilada es mayor a lo normal, el paciente tendrá intolerancia a la glucosa. (8,38)

- 4).- La identificación de pacientes con riesgo a la hiperglicemia. Los pacientes tratados con insulina pueden presentar hipoglicemias, particularmente en la noche, cuando los síntomas pueden ser inaparentes. Un descenso de la Hb A_{1c} mayor al rango inferior puede alertar al médico a esta probabilidad y hacer un cambio oportuno del tratamiento. (39)
- 5).- Para aclarar contradicciones y confusiones en la prueba de tolerancia oral a la glucosa. En caso de glicemia normal y prueba de tolerancia a glucosa con una insignificante elevación posprandial. La hemoglobina glicosilada dará la pauta. (38)
- 6).- Las embarazadas con monitoreo de la glicemia, especialmente las que siguen un tratamiento con insulina. La hemoglobina glicosilada valida los resultados de los tests. (38)
- 7).- La evaluación de cualquier cambio de tratamiento. La glicemia es sujeta a muchas variaciones y refleja un punto en el tiempo, siendo difícil hacer un juicio terapéutico basado solo en esta información. La Hb A_{1c} es más significativa y cierta. (38)

La identificación de la diabetes por medio de la Hb A_{1c}: (40)

DIABETES TIPO I O INSULINO DEPENDIENTE.- La Hb A_{1c} es usada en conjunto con la glucosa sanguínea y urinaria. La Hb A_{1c} mide los valores de 4 semanas y se valida con el monitoreo en casa de la glicemia. Si se eleva la Hb A_{1c}, se debe ajustar la dieta y la insulina. (11,7,8)

DIABETES TIPO II O NO INSULINO DEPENDIENTE TRATADA CON HIPOGLICEMIANTE ORALES.- Cuando el paciente reporta una glucosa sanguínea y urinaria normal, y progresan sus complicaciones, se evidencia la descompensación con la Hb A_{1c}. (38) Para el diabético con un metabolismo estable

sería suficiente una determinación de su Hb A_{1c} a intervalos de 3 meses para vigilar la compensación. (7)

DIABETES Y EMBARAZO.- La Hb A_{1c} es la única técnica indicada para el control metabólico de la diabética que planea embarazarse. El tratamiento que tiene por objetivo el control para alcanzar el metabolismo normal de la glucosa, es equivalente a la normalización de la Hb A_{1c}. Con esta técnica puede complementarse el monitoreo de la glicemia, para tener mejor certeza en el tratamiento y en el pronóstico. Existe relación entre las malformaciones congénitas y la elevación de la Hb A_{1c} en el primer trimestre del embarazo. (38)

La interpretación de los valores de la Hb A_{1c} en el diagnóstico de la Diabetes Mellitus, es como sigue:

- 1.- LA Hb A_{1c} NORMAL Y LA GLUCOSA SANGUINEA Y POSTPRANDIAL MENORES DE 200 mg/dl.- Indican un control metabólico estable.
- 2.- LA Hb A_{1c} NORMAL Y LA GLUCOSA SANGUINEA ELEVADA.- Significa un deterioro metabólico hace pocos días. Con un tratamiento apropiado esta situación puede resolverse sin dificultad.
- 3.- LA Hb A_{1c} Y LA GLUCOSA SANGUINEA ELEVADAS.- Se encuentran en la diabetes manifiesta y en pobre control del paciente.
- 4.- LA Hb A_{1c} ELEVADA Y LA GLUCOSA SANGUINEA NORMAL.- El paciente con reciente diagnóstico de Diabetes o con pobre control metabólico por algunas semanas. No hay complicaciones con un buen régimen. (7,8,38)

La prueba de tolerancia a la glucosa presentan relación con la hemoglobina glicosilada, pero obviamente es el mejor indicador de la tolerancia a la glucosa. Por otro lado los valores de la hemoglobina glicosilada elevado y la prueba de tolerancia a la glucosa normal se encuentra en los indivi-

duos obesos. La prueba de tolerancia a la glucosa muestra el estado metabólico durante el tiempo del exámen y la Hb A_{1c} es un indicador del estado metabólico por un periodo de varias semanas. (8,38)

Estudios recientes indican que los métodos tradicionales de evaluación de la glucosa sanguínea para el control de la diabetes, tales como la historia clínica, la exploración física y la glucosa en sangre y orina, han sido los valores para el control de la glucosa sanguínea en los diabéticos. Pues la medición de la hemoglobina glicosilada es un índice promedio de la glucosa sanguínea de semanas o meses y no se utiliza ampliamente aunque este examen proporciona información importante que no se obtiene de otra manera en la práctica médica. (4,7,26,36,54)

Se ha mostrado la utilidad clínica de la medición de la hemoglobina glicosilada y se busca su aplicación. (1,6) El examen facilita el control del diabético que requiere exactitud y valoración objetiva de su glicemia por largo tiempo. Un cambio en el tratamiento para controlar la glucosa sanguínea se puede valorar el resultado con el de la glucosa sanguínea, pero el cambio en la glicemia puede detectarse mejor con la hemoglobina glicosilada. Por ejemplo, un cambio rápido en el valor de la glucosa plasmática de 3 000 mg/l a 1 200 mg/l se asocian con una disminución de la hemoglobina glicosilada, cerca del 1% en una semana y del 3% en más de un mes. Así el valor de la hemoglobina glicosilada puede ser obtenido en intervalos de 2 a 4 semanas en ciertas situaciones clínicas como en la diabética embarazada o en un cambio del tratamiento. (26,54)

CAPITULO IX LA MEDICION DE LA Hb A_{1c}

Se han desarrollado un gran número de técnicas para medir la hemoglobina glicosilada. Por facilidad se han agrupado por el mecanismo que usan al separar la hemoglobina glicosilada de la que no está glicosilada. (38)

* METODOS BASADOS EN LA DIFERENCIA DE CARGAS.

La glicosilación del grupo amino-terminal de valina ocasiona un cambio en el punto isoelectrico de la hemoglobina. Esta reacción es la razón usada por los métodos físicos o para la separación de las especies glicosiladas y las que no lo están. Estos son:

- * La cromatografía de intercambio iónico;
- * La electroforesis; y
- * El punto isoelectrico.

LA CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Históricamente la cromatografía de intercambio iónico fue el primer método usado para la separación y cuantificación de la hemoglobina glicosilada. Este es el método más ampliamente usado en los laboratorios clínicos de todo el mundo. (36,43) El fundamento del método es que varias especies de hemoglobinas glicosiladas, incluyendo la Hb A_{1c}, son menos positivas que la Hb A₀, a un pH neutro, (38,43) y se unen menos a la resina con carga eléctrica negativa, por lo que se desplazan con el amortiguador catiónico débil (50mM Na⁺). La fracción no glicosilada es desplazada cuando se usa una concentración alta de sales (300mM). (38,43) El hemolizado se aplica a la columna de resina y se colecta el eluido. La menor carga positiva de los componentes menores de la hemoglobina hacen que eluya primero la Hb A_{1a}, A_{1b} y A_{1c}, antes de la fracción mayor de la hemoglobina, la Hb A₀. (38,53) Su porcentaje

total de hemoglobina puede ser fácilmente determinado con un espectrofotometro. La elución más rápida de la hemoglobina bajo estas condiciones da la razón para llamarlas "hemoglobinas rápidas" para las fracciones correspondientes a las hemoglobinas A_{1a} , A_{1b} y A_{1c} . La cuantificación espectrofotométrica de las fracciones de la hemoglobina es a 415 nm. Algunos procedimientos solo separan los componentes menores de la hemoglobina, por este medio se cuantifica la Hb A_{1c} separando la Hb A_1 (Hb A_{1a+b+c}) de la Hb A_0 . (38,50)

De esta técnica existen numerosos equipos comerciales. La técnica consiste en hemolizar la sangre anticoagulada y se coloca en las columnas de resina de intercambio iónico, para eluir la Hb A_1 con el primer amortiguador y la Hb A_0 con un segundo amortiguador. (26,36)

Con el reconocimiento de la importancia clínica de la técnica de la hemoglobina glicosilada se han desarrollado modificaciones del método original de la macro-columna, permitiendo una separación más rápida y conveniente. El método de microcolumna proporcionado comercialmente desarrolló el uso de la resina Birex 70 y la elución con dos amortiguadores para separar la hemoglobina glicosilada de la Hb A_0 . El menor tamaño (1x 2.5 cm) de la columna nos proporciona resolución de las fracciones glicosiladas, las cuales fueron eluidas como Hb A_1 . La técnica requiere 60 minutos y es extremadamente sensible a cualquier cambio en el pH del amortiguador o de la temperatura. (26,53) Para la macrocolumna la temperatura óptima es de 20°C; al aumentar la temperatura se elevan los valores de los resultados. En la microcolumna los efectos de la temperatura corresponden al 1% de la Hb A_1 por cada °C, necesitando un riguroso control de la temperatura. (29,30,53)

El uso de la columna permite la realización de varias muestras a la vez. La reciente introducción de 2 amorti-

guadores de cationes débiles para eluir la HbA_{1a} y la HbA_{1b} de la HbA_{1c}, permite la separación real de la HbA_{1c} con el método de microcolumna. El total de la hemoglobina es determinado indirectamente al medir la absorvancia del hemolizado antes de aplicarlo a la columna. Este tipo de método ofrece importantes ventajas sobre otras técnicas que solo miden Hb A₁ (26)

La segunda modificación de la cromatografía de intercambio iónico fue el uso de la cromatografía líquida de alta precisión (HPLC). La mejor resolución y mayor velocidad del sistema de cromatografía líquida se realiza a una velocidad de 24 ml/hora y 50 psi, permitiendo la separación de las hemoglobinas A_{1a}, A_{1b}, A_{1c} y A₀. (26,38)

En general el método de HPLC es una excelente técnica con buena precisión y permite una rápida separación de la Hb A_{1c} de los otros componentes menores de la hemoglobina y de la Hb A₀. El hemolizado se aplica a las columnas de vidrio que miden 0.8x3cm, llenas con resina de intercambio iónico. Usando un sistema de 2 amortiguadores, similar a los demás métodos de columna. La separación requiere aproximadamente 40 minutos. (26,38)

El primer amortiguador con un pH alto y menor concentración de iones sodio que el segundo, se aplica a la columna bajo una presión moderada y a una velocidad de flujo rápida. Después de la elución de las diversas fracciones menores de la hemoglobina, se aplica el segundo amortiguador para eluir la Hb A₀. La absorbancia del eluido es monitoreada constantemente, permitiendo la cuantificación de cada componente menor de la hemoglobina. Este método puede ser automatizado. (26)

Aunque el costo de un sistema HPLC cualquiera tiene un costo de aproximadamente \$20 000, pero el costo para

realizar el estudio de cada muestra es prácticamente de cero. Sin embargo, con este método no se pueden realizar varias muestras a la vez, solo de una en una, estudiándose 40 a 50 análisis por día. El control de calidad incluye el cuidado del pH del amortiguador y la temperatura, como en el método de microcolumna. (38)

El método de PHLC requiere meticolosas técnicas de laboratorio, para llevarla a cabo y mantener óptimos resultados. El equipo es caro, pero los laboratorios que analizan muchas muestras a la semana, el costo por estudio es comparable con el del método de microcolumna. (26)

Otra modificación del método de intercambio iónico es el uso de un método de separación en grupo, similar al de microcolumna, le da al laboratorio la ventaja de realizar varios estudios a la vez. Como el método de microcolumna, el método por grupos no separa las fracciones menores de la hemoglobina glicosilada. (38)

Todos los métodos de intercambio iónico tiene limitaciones y similares interferencias. Las hemoglobinas glicosiladas lábiles (pre-Hb A_{1c}) se remueve primero en la técnica. La hemoglobina fetal migra con la hemoglobina glicosilada y las hemoglobinas S y C no, por ésto su presencia ocasiona valores falsos altos o bajos. (1,29,38,62)

El suero con quilomicrones, la administración de altas dosis de aspirina y la uremia interfieren con el método de cromatografía de intercambio iónico al medir la hemoglobina glicosilada. El lavado de la muestra es la parte de la preparación para remover las fracciones lábiles y así eliminar el problema con la glucosa libre. La carbamilación y la acetilación son factores que raramente dan falsas elevaciones de los resultados de la medición de la hemoglobina glicosila-

da en un grado significativo. (29,38) Las hiperlipidemias ocasionan falsas elevaciones. (1,30)

Una gran dificultad es la sensibilidad de la resina a los cambios de temperatura, por lo que se recomienda realizar las determinaciones a $22 \pm 5^{\circ}\text{C}$, ya que los valores obtenidos a esta temperatura reflejan mejor el porcentaje real de la concentración de la hemoglobina glicosilada en la muestra de sangre. (1,29) La técnica es afectada por el pH, la fuerza iónica y la temperatura de los aniones del amortiguador para eluir, la temperatura a la que se realiza la técnica, el peso de las columnas y las condiciones de almacenamiento de las muestras. (53)

ELECTROFORESIS.

La densidad de la carga positiva de las hemoglobinas glicosiladas facilitan su separación por la técnica de electroforesis. La hemoglobina glicosilada puede medirse únicamente utilizando la electroforesis. En general cuando un hemolizado se aplica en un soporte bajo un potencial eléctrico, los componentes separados de la hemoglobina cruzan el soporte de acuerdo a su diferencia de cargas. Un gel de agar de citrato disponible comercialmente se utiliza en este método. Es una alternativa útil del método de intercambio iónico. El gel presenta grupos sulfato y piruvato, con carga negativa que interacciona con los distintos componentes de la hemoglobina. La técnica se realiza con un amortiguador de citrato. Cuando una corriente eléctrica se aplica, la HbA_0 migra más despacio que sus componentes menores. Todas las fracciones glicosiladas migran en una sola banda (HbA_1) en la técnica de electroforesis y las hemoglobinas glicosiladas lábiles deben de ser removidas antes de realizar la técnica. (26,38)

La técnica requiere equipo especializado y costoso pero se compensa porque se pueden procesar varias muestras a la vez. Una desventaja es que el método solo mide la HbA_1 . La hemoglobina fetal y los intermediarios lábiles interfieren los resultados, las hemoglobinas S y C no. (26)

La hemoglobina fetal migra junto con las fracciones glicosiladas. (62) Las hemoglobinas S y C migran en una espiiga separada en el gel de agar. Con una variedad del potencial de voltaje, 24 muestras pueden realizarse en una hora. La técnica de electroforesis no se afecta por los cambios del pH o la temperatura del amortiguador, ya que es estable de 4 ± 0.1 °C. Tampoco se altera por la concentración de triglicéridos. (26) Presenta relación con los resultados de la cromatografía de intercambio iónico. Se le ha proporcionado comercialmente a los laboratorios clínicos. (38)

PUNTO ISOELECTRICO

El gel de poliglicano es un tipo especial de electroforésis que separa las hemoglobinas de acuerdo a su punto isoeléctrico. (7,8,26) El hemolizado es sujeto a una corriente eléctrica en el gel, que ha sido especialmente preparado para tener un gradiente de pH, el que se establece por periodos establecidos. La mezcla de poliamino y ácido policarboxilo, presentan diferentes puntos isoeléctricos para cada componente de la hemoglobina. Las hemoglobinopatías no afectan los resultados. La pre-hemoglobina A_{1c} si interfiere. Sin embargo hay reportes que indican que las pre-hemoglobinas A_{1c} pueden ser separadas de la Hb A_0 con un tomografo laser de alta sensibilidad. El equipo necesario es caro. El método se ha hecho más popular en Europa y Estados Unidos. Los resultados se relacionan bien con otros métodos de cuantificación de la hemoglobina glicosilada. La precisión de la técnica es comparable con la de otros métodos. (26)

Aunque el método original de puntos isoeléctricos no separan las fracciones menores glicosiladas, el gradiente del pH de la superficie, permite la separación de la Hb A_{1a} , la Hb A_{1b} de la Hb A_{1c} , en el gel de agar de policrilamina. Las hemoglobinas S, C y F no interfieren con la técnica de puntos isoeléctricos y las hemoglobinas cuantificadas pueden separarse de la hemoglobina glicosilada, más importante las hemoglobinas glicosiladas lábiles, que migran separado de las fracciones estables. Oviamente el control del pH y la concentración son críticos en este método. Los resultados se cuantifican con microdensitómetro. El número de estudios se limita por el número de líneas en el gel. (38)

* METODOS BASADOS EN LA REACTIVIDAD QUIMICA.

METODO COLORIMETRICO.

El método colorimétrico es el más ampliamente usado, con la técnica del hidroximetilfurfural/ácido tiobarbitúrico. En éste el color medido se forma de la reacción entre el 5-hidroximetilfurfural y el ácido tiobarbitúrico. (44,46 55)

El azúcar que se une a la hemoglobina es convertida en 5-hidroximetilfurfural durante el tratamiento con calor al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico. (26,55) Este método determina los grupos glicosilados en los residuos de valina y lisina. (26)

El método es poco afectado por muestras refrigeradas y las condiciones de almacenamiento, no se afecta por las hemoglobinopatías o la adicción a la hemoglobina de otros azúcares que no son glucosa. Otra ventaja importante de este método es que la fructosa pura puede ser incluida como estándar. Sin embargo, la glucosa libre interfiere, por lo que, se debe remover antes de realizar la técnica. Una cuidadosa estimación de las condiciones requeridas para la técnica. (26)

Un problema adicional ha sido que la unidad reportada de la hemoglobina glicosilada es diferente en cada laboratorio. Por ejemplo, como nanogramos de hidroximetilfurfural/mg de hemoglobina o equivalentes de fructosa/mg de hemoglobina. Esto es extremadamente difícil para comparar, pues los resultados que reportan 2 laboratorios serán diferentes entre sí. Esta técnica puede autorizarse y ofrece una alternativa muy útil. En el presente no se proporcionan equipos comerciales del método colorimétrico. (26)

Mientras la cromatografía de intercambio iónico, la electroforésis y el punto isoelectrico miden la hemoglobina glicosilada a través de la diferencia de cargas, el método colorimétrico mide directamente la glucosa unida a la hemoglobina. La glucosa se hidroliza para formar la cetoamina bajo la acción de un ácido débil, produciendo 5-hidróxi-metil-furfural. Los colores producidos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, para producir un color adicional que puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 443 nm. Teóricamente la técnica colorimétrica difiere de las demás técnicas anteriores porque mide toda la glucosa unida a valina y lisina en la hemoglobina glicosilada. Comparando con el método de intercambio iónico que detecta solo la glicosilación en el residuo N-terminal de valina. La técnica colorimétrica mide el total de ella hemoglobina glicosilada, tiene un r mayor de 0.9. (38)

El método colorimétrico consta de una técnica fácil, se puede procesar varias muestras al mismo tiempo, con buena exactitud y sensibilidad. Son los principales reactores que nos conducen a elegir esta técnica de laboratorio. La importancia de remover las hemoglobinas glicosiladas lábiles, y la estabilidad del almacenamiento de las muestras para tomarla en cuenta al seleccionar el método. (9,38)

Es importante mencionar que la Hb A₁ es comparable con el valor de la Hb A_{1c}. La Hb A₁ tiene un valor mayor que el de la Hb A_{1c}, pues la Hb A_{1c} solo mide una fracción de la hemoglobina glicosilada (usualmente de 1.5 a 3.5%). Cualquiera de las mediciones es útil. Los resultados de la Hb A₁ y la Hb A_{1c} se pueden comparar en técnicas capaces de medirlas. El coeficiente de correlación usualmente excede el rango de 0.99 (38,55)

Desafortunadamente un problema mayor con la técnica colorimétrica es que el ácido hidroliza a la concentración

de 1 M al ácido oxálico, solo hidroliza una pequeña y variable fracción del residuo de glucosa. La formación del color producido por el 5-hidroxi-metil-furfural y el ácido tiobarbitúrico depende del tiempo. La presencia de glucosa libre en la muestra a analizar elevará falsamente el resultado. Hay una pequeña cantidad de color no específico desarrollado en la técnica. (38,44,55)

La realización de la técnica inicia hidrolizando la muestra bajo presión (124 Kpa, 124°C) en una autoclave por 1 hora. La hemoglobina se precipita con el ácido tiobarbitúrico y el filtrado se separa por centrifugación. El sobrenadante reacciona con el 5-hidroxi-metil-furfural y el ácido tiobarbitúrico, se lee a 443 nm. Con esta modificación el grado de hidrólisis es variable, por eso la muestra control que es de fructuosa, también se hidroliza por el 5-hidróxi-metil-furfural, así como cada muestra. La estandarización de la concentración de la hemoglobina en cada muestra también es importante. Una curva estandar desarrollada con cantidades conocidas de 5-hidróxi-metil-furfural permite la conversión de la lectura espectrofotométrica de un mM de 5-HMF/mg del valor de la hemoglobina. (38,44,55)

La ventaja de la técnica colorimétrica es que no se afecta por la presencia de variantes de la hemoglobina, las fracciones glicosiladas lábiles o la uremia. Sin embargo, la glucosa libre puede afectar adversamente los resultados, por lo que la muestra debe lavarse antes. (39,53)

Varias muestras pueden realizarse en 4 o 5 horas, que es el tiempo necesario para realizar la técnica. Al comparar los resultados del método colorimétrico con la técnica de intercambio iónico son altamente reproducibles. (55)

* METODOS BASADOS EN LAS DIFERENCIAS ESTRUCTURALES.

CROMATOGRAFIA POR AFINIDAD.

Esta técnica utiliza la inmovilidad del m-fenilborato-cis-diol. En este caso, la hemoglobina glicosilada se une a la columna y la no glicosilada se eluye primero. (46)

La cromatografía por afinidad es una técnica para separar moléculas grandes, basado en su estructura química. La fase estacionaria, la cual es empacada en una columna con matriz insoluble e inerte, así como agarosa o celulosa, con una apropiada unión. La fase móvil contiene la sustancia preparada, que pasa a través de la columna y se separa por sus diferentes interacciones con las uniones. Para cuantificar la hemoglobina glicosilada usualmente la matriz es agarosa y las uniones son el ácido m-amino-fenil-borónico. (26)

La hemoglobina glicosilada contiene grupos cisdiol en la porción de la glucosa, la cual forma 5 anillos complejos con el ácido borónico. El hemolizado es preparado directamente del paquete eritrocitario de la sangre fresca, aplicado a una columna y lavado con 2 amortiguadores. El primero eluye la fracción no glicosilada, la cual no tiene grupos cis-diol y no se une al ácido borónico. La fracción rica en hemoglobina glicosilada se eluye con el segundo amortiguador, la cual usualmente contiene sorbitol, un azúcar alcoholizado que desplazará la hemoglobina glicosilada de la columna. Los equipos contienen columnas preparadas y el amortiguador apropiado (26)

La técnica mostró disminución de los efectos de manejo y almacenamiento. Los intercambios de la base de Schiff lábil no interfirió, no así las hemoglobinopatías y la adición de azúcares a la glucosa diferentes de glucosa. Los resultados correlacionan bien con el método colorimétrico de áci-

do barbitúrico y el método de intercambio iónico. La técnica es muy sensible al menor cambio en las propiedades del gel, así como en las concentraciones de las uniones. La cromatografía generalmente muestra valores más altos que otros métodos, tanto para muestras de diabéticos como para la de los no diabéticos, pues mide la hemoglobina glicosilada basada en la diferencia de cargas. (38)

Un nuevo método de medición de los residuos glicosilados es el método de cromatografía por afinidad al ácido fenil borónico. Este ácido se conoce especialmente por su enlace cis-diol. La unión de los grupos cis-diol del fenilborato separan la resina, proporcionando una matriz, la cual une los grupos cis-diol de la glucosa que se une al residuo de lisina o valina de la hemoglobina glicosilada. La Hb A₀ que no se relaciona por unión al borato se cuantifica espectofotométricamente. La hemoglobina glicosilada se eluye con la sucrosa al 0.2 M y medio. La superficie de la resina, la afinidad al borato y el límite de la habilidad para reciclarse y reusarse, le da el margen al uso de este método. (38)

TECNICAS PARA MEDIR LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA (38)

	INTERCAMBIO IONICO MICROCOLUMNA	ELECTROFORESIS CIAP	ELECTROFORESIS CAMARA DE ELECTROFORE- SIS, MICRODENSITOMETRO HORO	COLORIMETRICO ESPECTROFOTOMETRO AUTOCALVE	AFINIDAD ESPECTROFOTOMETRO
REQUERIMIENTO DEL LABORATORIO	CONTROL DE TEMPERATURA Y EL AMORTIGUADOR DEL PH	CONTROL DE TEMPERA- TURA Y DEL AMORTI - GADOR DEL PH	-----	ESTANDARIZAR LA CON- CENTRACION DE LA HEMOGLOBINA Y DEL ESTANDAR DE FRUCTOSA	-----
TIEMPO DE LA TECNICA	1 HORA	40 MINUTOS	1 HORA	4 HORAS	1 HORA
RESOLUCION	Hb A ₁	Hb A _{1c}	Hb A ₁	Hb A ₁	Hb A ₁
REPRODUCIBILIDAD					
COEFICIENTE DE VARIACION	6 a 8 %	MEJOS DEL 3 %	6 a 8 %	6 a 10 %	MEJOS DEL 3 %
NECESITA REMOVER:					
+ FRACCION LABIL	+	+	+	-	-
+ GLUCOSA LIBRE	-	-	-	+	+
ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DESPUES DE HEMOLIZADA	5 a 7 DIAS 3 MESES	5 a 7 DIAS 6 MESES	7 DIAS 1 MES	10 a 14 DIAS MAS DE 6 MESES	? ?
SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN	Hb S, F, c, ASPIRINA UREMIA	Hb S, F, C, ASPIRINA UREMIA	Hb F ASPIRINA	-----	-----
VENTAJAS	BARATO NUMEROSAS MUESTRAS AL MISMO TIEMPO FOCO EQUIPO	MAJOR REPRODUCI- LIDAD	SIMPLE RAPIDO NUMEROSAS MUESTRAS A LA VEZ	NO NECESITA REMOVER FRACCION LABIL	MAS ESPECIFICO
DESVENTAJAS	DIFICIL CONTROL DEL PH Y LA TEMPERATURA VARIA PASO A PASO INEXACTO	CARO 36 MUESTRAS POR DIA	24 MUESTRAS POR HORA	DIFICIL REALIZACION NUMEROSOS PASOS	ES CARO EL GEL DE AFINIDAD EL GEL VARIA PASO A PASO

*** OTRAS TECNICAS.**

RIA, FUROSEMINA, ADICO FITICO.

Una variedad de otras técnicas han sido propuestas aunque ninguna de éstas tiene actividad para usarse ampliamente, como el método de intercambio iónico, la electroforesis o el colorimétrico. El RIA no es disponible fácilmente, La técnica de fructosamina tiene más ventajas por su capacidad de unir cetoamina y glucosa. La medición de la hemoglobina por esta técnica es por la reducción del nitro-azul de tetrasolium bajo condiciones alcalinas. La técnica de medición de la furoseina mide la hemoglobina glicosilada por la producción de furosina por hidrólisis de la lisina glicosilada. La técnica del ácido fítico esta basado en la reacción del ácido fítico con el grupo N-terminal de valina de la hemoglobina no glicosilada y por la inhabilidad de las cadenas alfa y beta de las hemoglobinas glicosiladas de unirse a éste. (38)

Las diferentes características de separación de las técnicas anteriores, todas se relacionan extraordinariamente. La cromatografía de intercambio iónico mide la glicosilación en el grupo terminal de valina, el método colorimétrico y el de afinidad al ácido bórico miden el total de aminoácidos glicosilados (valina y lisina). Estudios comparativos de estas técnicas reveló que el mejor método es el más adaptado a cada laboratorio clínico. (38)

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

CAPITULO X

SELECCION DE LA TECNICA.

Con el gran número de método de ensayos de la hemoglobina glicosilada es muy difícil de seleccionar la técnica apropiada para uno. hay considerables debates concernientes a cada método. Cada técnica tiene ventajas y desventajas para el laboratorio clínico. Ninguno podría considerarse " el mejor". Todos los métodos proporcionan información clínica comarable, si son realizados adecuadamente. Para cada laboratorio la selección del método depende de diversos factores incluyendo el costo, el número de muestras a realizar, el almacenamiento de las muestras y las características de la población. (26)

CAPITULO XI FUENTES DE CONFUSION.

Cada técnica tiene problemas particulares asociados con su uso y éste tiende a depender de la naturaleza del modo particular del análisis. (46)

A.- FACTORES DE LA TECNICA.- Las condiciones de la técnica pueden afectar los resultados, incluyendo la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el medio de las columnas. La aplicación de estos importantes factores, suman la variabilidad en los resultados de la técnica. (29,30,36)

B.- LAS FRACCIONES LABILES.- Después de la introducción de la técnica de microcolumna para medir la hemoglobina glicosilada, varios estudios sugirieron que la formación de la hemoglobina glicosilada es rápida e irreversible, originando importantes dudas respecto a la validez de la medición de la hemoglobina glicosilada como indicador a largo plazo para el control de la glucosa. (26,39,54)

Nosotros ahora sabemos que la formación de la hemoglobina glicosilada es un proceso de dos pasos, con la formación inicial de un intermediario, la base de Schiff, resultando de la unión de la glucosa y la hemoglobina. Este componente lábil es llamado pre- A_{1C} , cuando la glucosa se une al grupo NH_2 -terminal de valina de la cadena beta, entonces se une irreversiblemente, cambiando la forma de la hemoglobina a la forma glicosilada (cetoamina) o se disocia en glucosa y Hb A. (26,39,54)

Desafortunadamente, el intermediario el cual actualmente es responsable de la concentración de la glucosa, en la cromatografía de la hemoglobina da incrementos falsos en el examen de la Hb A_{1C} . Así que es necesario remover los intermediarios, incubando la muestra en solución salina y li-

sando la muestra en un amortiguador con pH bajo. Afortunadamente las presentaciones comerciales de microcolumna de intercambio iónico incluyen también un reactivo lisador en el equipo de reactivos. (26,34,54)

El método colorimétrico con ácido tiobarbitúrico y los medios físicos de separación de la hemoglobina glicosilada tendrán valores altos falsos, a menos que la muestra sea manejada adecuadamente. La presencia de glucosa libre con la hemoglobina da valores altos falsos. La base de Schiff aumenta un 20% el valor de la Hb A_{1c}, por cromatografía, si la sangre no es dializada o tratada con un amortiguador o previamente incubados los eritrocitos en solución salina a 37°C por una hora. (39,46,54)

Todos estos procedimientos son para eliminar la fracción lábil y así los resultados del análisis sean de la medición de la fracción estable. La fracción lábil varía dependiendo de la concentración de glucosa del ambiente, la cual lleva la sangre. Estas diferencias se presentan cuando se miden las fracciones rápidas. (A_{1a,b,c}). (39,46,54)

C.- ANEMIAS HEMOLITICAS, FLEBOTOMIAS, Y EMPARAZO.- Todas estas situaciones tienden a disminuir los resultados de la hemoglobina glicosilada para expresar los valores en proporción a la disminución del tiempo de supervivencia del eritrocito, que es más corto. (26,36)

D.- HEMOGLOBINOPATIAS.- Diversas variantes de la hemoglobina asociadas con falsos incrementos o disminuciones de los valores de la hemoglobina glicosilada, dependiendo de las características de la carga de la partícula variante. La hemoglobina fetal por cromatografía corre junto con las hemoglobinas rápidas, incrementando aparentemente la concentración de la Hb A_{1c} o la Hb A_{1c}. (26,36,62)

Otras hemoglobinopatías como la Hb C y S, disminuyen falsamente los resultados del examen. En la mayoría de la población de pacientes diabéticos. Estas hemoglobinopatías variantes son relativamente raras, pero en situaciones clínicas éstas son frecuentes. Los métodos que se basan en la diferencia de cargas pueden preferirse, como la cromatografía de intercambio iónico. La HPLC no se afecta por la presencia de las hemoglobinas F, C y S. (26,29)

Las hemoglobinopatías variantes también afectan la separación física en técnicas particulares. Por ejemplo, la separación de la hemoglobina en el haz de celulosa de la hemoglobina normal en la técnica de HPLC para la Hb A_{1a,b,c} (26)

E.- UREMIA.- La hemoglobina A₁ se reporta más elevada en insuficiencia renal. Esto parece ocurrir a pesar del factor de la corta sobrevivencia de los eritrocitos en el paciente con uremia. Como es un producto final de la urea, la cual puede reaccionar con los grupos amino en forma irreversible y cambiar las propiedades cromatográficas. Otras moléculas pequeñas unidas a la hemoglobina pueden ser involucradas también (26,46)

F.- EL CONSUMO DE ALCOHOL.- El acetaldehído puede mostrar cambios en la cromatografía, es el producto final del alcohol falso aumento de los niveles de la hemoglobina rápida, cuando se mide por métodos físicos. (26,46)

G.- ASPIRINA.- La aspirina también puede transferir un grupo acetyl a la hemoglobina, aunque la transfiere a un grupo anhídrido mixto. Esto cambia las propiedades físicas de la hemoglobina. (26,29,46)

H.- INTERFERENCIA POR OTRAS SUSTANCIAS.- Cuando los hemolizados son preparados directamente de la sangre fresca,

la concentración normal de triglicéridos o bilirrubinas aumentan falsamente los resultados para la Hb A₁ y Hb A_{1c}. (26)

I.- LA UNIÓN DE SUSTANCIAS NO AZÚCARES.- Varias sustancias distintas a los azúcares se pueden unir a la hemoglobina, alterando su carga característica. Estas uniones en la cromatografía de las hemoglobinas menores aumentan falsamente los resultados del examen. Por ejemplo, los individuos con adicción a opáceos, en caso de venenos y otros. Estas circunstancias no afectan la cromatografía de intercambio iónico. Las fracciones de la Hb A_{1a+b} son más afectadas que la Hb A_{1c}, así que las técnicas que cuantifican la Hb A_{1c} especialmente muestran una mínima alteración por estas interferencias, raramente mayores del 1%. (26)

J.- MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE LA MUESTRA.- El efecto del almacenamiento de la sangre en el resultado, como la temperatura mayor de 4°C incrementa las fracciones A_{1a+b}, siendo dependiente del tiempo y la temperatura. La hemoglobina es insignificadamente afectada. Ya que los métodos que determinan la Hb A₁ mostrarán aumentos falsos de los valores si las muestras no son enfriadas antes de realizar la técnica. (26,36)

Las muestras de sangre total son estables a 4 ° C por una semana o varios meses a - 70°C. El personal clínico y del laboratorio deben coordinarse efectivamente para tener una muestra apropiada enfriando o almacenando los productos para minimizar cualquier error analítico producido por un manejo inapropiado de la muestra. (26,36)

K.- ANTICOAGULANTE.- La muestra se debe recolectar en EDTA, pues la heparina o el fluoruro de sodio alterarán los resultados. (36)

CAPITULO XII

ESTANDARS PARA LA DETERMINACION DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA.

Los resultados del análisis de la hemoglobina glicosilada son excelentes a largo plazo. Son esenciales si el examen se usa con sus mayores ventajas, porque el cambio del 1% en la hemoglobina glicosilada representa un cambio de 30 mg/l en la glicemia. Pequeños errores en la medición de la hemoglobina glicosilada, son muy grandes en la estimación de la concentración promedio de la glucosa del plasma. (26)

Aunque la mayoría de las técnicas proporcionan una precisión aceptable si se realizan bajo alto control de las condiciones del laboratorio. Es difícil de determinar que técnicas son aceptables por su precisión, pero se pueden dar pautas. Un reporte publicado recientemente por el Instituto Nacional de Salud de Expertos en Diabetes respecto a la hemoglobina glicosilada, sugiere que intra e inter ensayo un CV del 5% es alcanzable y puede ser realizado en cada laboratorio con esta medición. (26)

El intervalo de referencia de la hemoglobina glicosilada es menor de 2 a 2.5%, dependiendo del método realizado. Por ejemplo, el intervalo de referencia para la Hb A_{1c} en el sistema HPLC es de $5 \pm 1\%$ ($x+250$). El intervalo de referencia limita el uso de la hemoglobina glicosilada, pues es necesario para discriminar entre sujetos diabéticos y no diabéticos. (26)

No hay método de referencia o estandar de la hemoglobina glicosilada. Los laboratorios han usado una gran variedad de procedimientos y materiales de control de calidad para esto. De estos materiales los más frecuentes son los hemolizados liofilizados que se reconstituyen localmente en el laboratorio y se usan por varios días o semanas. La estabili-

dad de estos materiales no ha sido bien definida. Los estándares de la hemoglobina glicosilada llamados "calibradores" se utilizan en las distintas técnicas para construir la curva estandar y permitir algunas correcciones como la temperatura en la cromatografía de intercambio iónico. (26)

Diversos laboratorios llevan el monitoreo de la técnica con controles preparados localmente, usualmente son hemolizados de sangre total o de paquetes eritrocitarios preparados de muestras de personas normales y de diabéticos. Los laboratorios que usan el método de cromatografía de intercambio iónico, controlan más el almacenamiento a -70°C y el manejo de las muestras para prevenir el incremento gradual de las fracciones de la Hb A_{1a} y A_{1b} . Las condiciones del almacenamiento hacen que los controles permanescan estables por varios meses. Los laboratorios deberían incluir controles preparados en cada técnica y además un control comercial o estandar. Los materiales de control de calidad fabricados comercialmente facilitan que los laboratorios locales mantengan un alto grado de precisión a largo plazo. (26)

Uno de los mayores problemas con la interpretación clínica de la medición de la hemoglobina glicosilada es que no se tienen estándares, por lo que no se pueden correlacionar los resultados entre laboratorios distintos. Los métodos de Cromatografía Líquida de Alta Precisión, la Microcolumna, la Cromatografía por Afinidad al Borato y el análisis de Colorimetría son útiles para distinguir una población normal de una diabética. Sin embargo estudios cuantitativos de cada método es muy difícil de comparar. (26)

Todos los métodos se correlacionan, el problema es que no se han estandarizado como otras técnicas donde pueden desarrollarse utilizando una curva estandar de referencia expedida por el suministrador. (26)

La ventaja de la técnica colorimétrica es que las muestras de referencia o calibradores pueden ser incorporados en cada ensayo, como un estándar de fructuosa o de 5-hidróximetil-furfural. Sin embargo el método consume mucho tiempo y no es disponible ampliamente. (26)

La estandarización de los resultados de las técnicas tiene además el problema de eliminar las uniones lábiles, pero solo en el caso de las condiciones de almacenamiento cambian los resultados del laboratorio. La técnica colorimétrica proporciona datos más confiables en muestras almacenadas por mucho tiempo. El método de microcolumna tiende a ser extemadamente lábil cuando la sangre es almacenada, apesar de ser lavada o de la temperatura. La cromatografía de columna puede ser estable si se almacenan las muestras como sangre total. (46)

En la Cromatografía Líquida de Alta Presición se encuentra el problema de que los valores de la Hb A_{1a+b} tienden a elevarse y los valores de la Hb A_{1c} tienden a descender con el tiempo de almacenamiento. La muestra puede ser cuidadosamente almacenada a 4°C o a -70°C . Esto hace posible el intercambio de muestras entre diversas instituciones y llegar a los valores estandars. (46)

Es importante notar que los promedios y estandars pueden variar relativamente en muestras normales. El coeficiente de variación intra e inter ensayo para una técnica pueden ser menores del 5% y es óptimo cuando es menor de 2%. La desviación estandar se expresa del porcentaje de los promedios de las muestras de un día o de una serie de días. (46)

Un paso importante en el control de calidad es el establecer un intervalo de referencia para el no diabético en los laboratorios que determinan la hemoglobina glicosilada.

Debemos ser escrupulosos al detectar alteraciones de la hemoglobina glicosilada, si es una diabetes, una intolerancia a la glucosa, una hemoglobinopatía o una anemia. Como chequeo de control de calidad, cada laboratorio puede establecer periódicamente sus intervalos de referencia. Este valor puede cambiar mostrando pequeñas variaciones de año a año aunque la técnica sea realizada en la misma forma. (46)

CAPITULO XIII
INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS DEL EXAMEN.

Cuanquier método realizado para medir la hemoglobina glicosilada tiene algunas condiciones diferentes en cada laboratorio. No hay consenso entre ellos, un método de referencia o un simple estandard de hemoglobina glicosilada. Así cualquier número como el rango normal de un laboratorio, no puede ser comparado fácilmente con los datos de referencia de otro laboratorio, aunque tengan la misma técnica. Por ejemplo, un valor de 9% de hemoglobina glicosilada en un laboratorio puede indicar una concentración de la glucosa dentro del rango normal y para otro no. (46)

CAPITULO XIV
DISCREPANCIA EN LA EVALUACION ENTRE LA IMPRESION
CLINICA Y LOS RESULTADOS DEL LABORATORIO.

Como cualquier otro producto del laboratorio, una gran discrepancia entre la impresión clínica y los resultados del laboratorio usualmente inducen a la investigación. En ocasiones los resultados de la hemoglobina glicosilada sugieren un pobre control de la diabetes, cuando la impresión clínica y el promedio de la concentración de la glucosa sanguínea se han controlado. En esta situación, así como en la inversa, el resultado del examen usualmente refleja el grado de alteración del control de la glicemia pero no siempre. (26)

La probabilidad de que un laboratorio se equivoque podría considerarse como el primer paso, por lo que el examen puede repetirse. Además se debe de considerar la posibilidad de una anemia hemolítica, etc., que afecte falsamente los resultados del examen. (26)

Como discutimos antes, los factores que influyen en los resultados varían de técnica a técnica. Generalmente los valores falsamente elevados de la hemoglobina glicosilada se presentan cuando hay hemoglobina fetal. Los valores falsos bajos se asocian a hemoglobinopatías como la anemia de células falciformes o las anemias hemolíticas de cualquier causa. Las hemoglobinopatías pueden ser identificadas por electroforesis de rutina de la hemoglobina. (26)

CAPITULO XV
EL USO DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA PARA EL
DIAGNOSTICO DE LA DIABETES.

Hay una área potencial importante de la aplicación de la hemoglobina glicosilada en el diagnóstico de la diabetes. Comúnmente recomendamos exámenes diagnósticos como la glucosa plasmática, la prueba de tolerancia oral a la glucosa que son inconvenientes, caras y muestran muchos resultados falsos positivos. El uso de la determinación de la hemoglobina glicosilada para el diagnóstico de la diabetes requiere de la recolección de una sola muestra de sangre, la que se puede tomar a cualquier hora del día, sin necesidad de un tiempo de ayuno previo. El comparar la hemoglobina glicosilada con la prueba de tolerancia a la glucosa, indica que un incremento en el valor de la hemoglobina glicosilada predice un valor anormal de la tolerancia a la glucosa. (26, 54)

Los resultados de la hemoglobina glicosilada no distinguen entre un diagnóstico de intolerancia a la glucosa y diabetes. Y además, el resultado es normal en un pequeño porcentaje de diabéticos o sea, los que tienen un buen control metabólico. Estudios a largo plazo se necesitan para incrementar los resultados de los individuos que presentan valores normales de la hemoglobina glicosilada, pero anormales de la prueba de tolerancia a la glucosa. Estos tienen incrementado el riesgo de las complicaciones de la diabetes. En el presente los datos son insuficientes para garantizar el uso de la hemoglobina glicosilada de rutina, sin mencionar su utilidad en el diagnóstico de la diabetes. (26,54)

A.- DIAGNOSTICO.-

La técnica de la hemoglobina glicosilada es útil en numerosas situaciones, incluyendo ciertas apreciaciones del diagnóstico, la determinación de una intervención aguda y es-

pecialmente en mantener programas de control inapropiado a la glucosa. (26)

B.- DIABETES TIPO I.-

El diagnóstico potencial de esta técnica obviamente resulta específica para hiperglicemias. La medición es de ayuda para establecer la duración del cuadro. La determinación de los valores de la hemoglobina glicosilada proporciona una base para valorar el tratamiento. Personas con hiperglicemia con o sin cetoacidosis asociada tendrán valores de Hb A_{1c} extremadamente altos, si las fracciones lábiles no son eliminadas. Así siguiendo la normalización de la glucosa sanguínea, aparece un brusco aumento en los niveles de la HbA_{1c}. Estos resultados altos de un súbito aumento en los niveles de la glicemia, con un paralelo aumento en la base de Schiff. (26)

El examen de la hemoglobina glicosilada cada 3 a 4 meses provee un útil promedio de control a largo plazo de la glucosa, para verificar el auto-monitoreo de la glicemia. (54)

C.- DIABETES TIPO II.-

La utilidad diagnóstica de la hemoglobina glicosilada en la Diabetes Tipo II es más pertinente. En el paciente con susceptibilidad a la diabetes y una elevación fortuita y rápida de la glucosa sanguínea, la medición de la hemoglobina glicosilada es de ayuda. Si la hemoglobina glicosilada se eleva por adición de glucosa, entonces se reconoce un problema inminente, (hiperglicemia aguda) o un problema que presente como reflejo una elevación de la hemoglobina glicosilada. Esta determinación también es útil en la Diabetes Tipo II como la glucosa rápida o la tolerancia a la glucosa. La utilidad potencial de la hemoglobina glicosilada como una herramienta diagnóstica, que espera el desarrollo del estándar. (26)

La hemoglobina glicosilada es una base útil al repetir los exámenes cada 6 meses para suplementar el monitoreo primario de la glucosa sanguínea. (54)

D.- DIABETES GESTACIONAL.-

Hay una circunstancia en la cual la utilidad de la hemoglobina glicosilada para el diagnóstico de la Diabetes Mellitus no es muy útil, esto ocurre en el caso de la Diabetes Gestacional. En esta circunstancia la hemoglobina glicosilada proporciona un diagnóstico que es muy tarde. El tiempo necesario para aumentar los valores de la hemoglobina glicosilada por la hiperglicemia que puede dañar al feto. (18,26)

La prevalencia de la Diabetes Gestacional es de 6% de las embarazadas, esto abogado más por la clínica que por los exámenes de tolerancia a la glucosa, estándar para el diagnóstico de la Diabetes Gestacional, presentada por el método de O'Sullivan en toda mujer embarazada. Se inicia con 50 g. de glucosa a las 26 o 30 semanas de gestación, si el nivel de glucosa es mayor de 150 mg/dl a una hora, entonces prueba la tolerancia a la glucosa. (18,26)

Aproximadamente el 20% de las mujeres embarazadas tendrán una cobertura positiva y cerca de 10 a 20% se diagnostica como Diabetes Gestacional, con un rango de 2 a 6%, como criterio de O'Sullivan. Para el diagnóstico de Diabetes Gestacional una mujer debe presentar hiperglicemia por 3 semanas consecutivas. (18,26)

Es importante recordar que durante el embarazo la hemoglobina glicosilada y la glucosa sanguínea son menores que en la no embarazada. La disminución ocurre aproximadamente en la semana 10 del embarazo y se refleja por la disminución de los valores de la hemoglobina glicosilada, la que en la Diabetes Gestacional iniciará programas de mejor control y

por lo tanto, la técnica puede ser usada como refuerzo para pacientes en programas designados a mejorar los niveles de glucosa sanguínea. (26)

La hemoglobina glicosilada corrobora el autocontrol de la glucosa sanguínea óptima para el bienestar fetal (60 a 120 mg/dl de glicemia) y prevenir las malformaciones congénitas. El examen cada 6 semanas se recomienda en la embarazada con Diabetes Tipo I. (54)

E.- OTROS.-

Además de la disminución de los niveles de la Hb A_{1c}, otras variables de interés para el paciente y su mejoría clínica, más fáciles de realizar son los niveles de los lípidos sanguíneos. Cuando los lípidos, la Hb A_{1c}, los triglicéridos y el colesterol se encuentran elevados, empiezan a decrecer en forma paralela los lípidos y la Hb A_{1c}, aunque los triglicéridos disminuyen en forma más rápida, el colesterol lo hace en forma paralela a la Hb A_{1c}. (26)

Algunas trigliceridemias asociadas han mostrado relación con la normalización de la glucosa sanguínea reflejada por la hemoglobina glicosilada. Por ejemplo, las plaquetas y la fase rápida de la coagulación anormal ocurren cuando la glucosa sanguínea se mantiene en un rango normal. (26)

Programas de control de la glicemia se asocian con la función nerviosa inapropiada, por medición de la conducción. En el caso de la conducta nerviosa, necesita aproximadamente 9 semanas de control de la glucosa antes de presentar mejoría demostrada por la conducción sensitiva y motora en un 50%. El espesor de la membrana basal de los capilares del cuádriceps disminuye en forma paralela. (26)

CAPITULO XVI

EL FUTURO.

Como se gaa experiencia con la medición de la hemoglobina glicosilada, su uso de rutina en el manejo del diabético ha incrementado. El examen no puede ser usado por sus grandes desventajas, entre ellas la falta de estandarización de la técnica. Un sistema basado en la estandarización podría permitir probar el análisis del control de calidad y el desarrollo objetivo para el control de la glucosa. (26,38)

CAPITULO XVII

CONCLUSION:

El uso provechoso de la hemoglobina glicosilada debe utilizarse como guía en los programas rectores para el control del paciente diabético.

Esta técnica le da la capacidad al médico de aproximarse al paciente con Diabetes Tipo I y II, pues la buena relación entre los niveles de glicemia y los valores de la Hb A_{1c} pueden usarse para guardar honestidad entre el clínico y el paciente.

La medición objetivo de los niveles de glucosa por largo tiempo, (autocontrol de la glucosa) provoca un foro para discutir las alternativas terapéuticas. Los programas de tratamiento deben tener como "meta" alcanzar los niveles normales de Hb A_{1c}, para lograr un control óptimo de la glicemia.

El control de la morbi-mortalidad de los pacientes diabéticos depende más que de una técnica de laboratorio que nos muestre el control metabólico de varias semanas antes para guardar honestidad entre el médico y el paciente de la actitud del diabético frente a su enfermedad. Para lo cual son importantes los programas educativos en que se busca concientizar al enfermo y tome una actitud positiva ante su problema haciéndole saber que si controla su metabolismo de los carbohidratos retardará o disminuirá los efectos secundarios de la hiperglicemia.

BIBLIOGRAFIA:

- 1.- Abraham E.C., Huff T.A., Coper N.D., Wilson J.B., "et al" Determination of the Glycosylated Hemoglobins (Hb A₁) with a New Microcolumn Procedure. Diabetes 1978;9:931-937
- 2.- Aleyssie H., Gardiner R.J., Blankstein L.A., Dempsey M.E. Agar Gel Electrophoretic Determination of Glycosylated Hemoglobin: Effect of Variant Hemoglobins, Hyperlipidemia and Temperature. Clin Chem 1981;3:472-475
- 3.- Arreola F., Flores S., Junco E., Mondragón L. "et al" Efecto de un Suplemento Oral de Zinc sobre la Concentración Sérica de la Somatomedina C, en Niños con diabetes mellitus Tipo I. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 4.- Bakan E., Bakan N. Glycosylation of nail in Diabetics: Possible marker of long-term hyperglycemia, Clinica Chimica Acta 1985;147:1-5
- 5.- Barrera V.J., Lozada L.I. La Diabetes Mellitus en México XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 6.- Boehringer Mannheim. Actualidades Médicas. Diabetes mellitus-Instrucción a los pacientes y autocontrol. Parte I : Instrucción a los pacientes. Lakeside 1987;15:1-6
- 7.- Boehringer Mannheim. Actualidades Médicas. Diabetes mellitus-Instrucción a los pacientes y autocontrol. Parte II : Analisis costo/beneficio. Lakeside 1987;16:1-6

- 8.- Boehringer Mannheim. Actualidades Diagnósticas. Reflotron El Sistema de Química Seca de Boehringer Mannheim. Lakeside. 1987;17:1-6
- 9.- Boehringer Mannheim. Diabetes. Autocontrol de glucosa. Orina. Lakeside.
- 10.- Boehringer Mannheim. Diabetes. Autocontrol de glucosa. sangre. Lakeside.
- 11.- Boehringer Mannheim. Autoclix. Lakeside.
- 12.- Boehringer Mannheim. Diagnóstico de la Diabetes. Aspectos Clínicos y Metrológicos. Lakeside 1987;1-33
- 13.- Boehringer Mannheim. Perspectives in literature. Hemoglobin A_{1c} in diabetes mellitus. Lakeside 1987; 1-27
- 14.- Cagliero E., Roth T. and Lorenzi M.A. Possible Role of Non-enzymatic Glycosylation in the Increased Expression of Basement Membrane Components Induced by High Glucose. Diabetes 1989;58:83 A
- 15.- Cerami A., Vissara H. and Brownlee M. Glucose and Aging. Scientific Medicine 1985;252:90-96
- 16.- Clinilog. Libreta para registro de resultados. Programa de Autocontrol. AMES.
- 17.- Cobos E., Romero J., Martínez I. y Santos E. Repercusión del Conocimiento de la Diabetes Mellitus en el Control de la Glucosa Durante el Campo Amigo. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989

- 18.- Contreras S.J. Diabetes Mellitus y Embarazo. Plan para el Control de las pacientes a Nivel de Consulta Externa. Rev. Med. IMSS 1987;25:387-391
- 19.- Cornejo B.J., Barranco J.A., Altamirano B.N., Aude R.O. "et al" Embarazo y Alteración en el metabolismo de los Hidratos de Carbono. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 20.- Cortéz M.A., Ibarra O.M.A., Castañeda D.M., Vera H. H., García B.C. "et al" Nefropatía en el Diabético Insulino-dependiente. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 21.- Demange J., Vettes B., Poirier J.L. y Auffret R. Deterioro del Rendimiento Humano Provocado por la Hipoxia. Farmitalia
- 22.- Flückiger R. and Winterhalter K.R. IN Vitro Sythesis of Hemoglobin A_{1c}. Febs Letters 1976;71:356-360
- 23.- Fong Y., Edelstein D. and Brownlie M. Inhibition of Matrix-induced Bone Differentiation by advanced Glycosylation Endproducts (AGES). Diabetes 1989;58:84
- 24.- García E., González B.J., Villaseñor J., Castrojón M. "et al" Tratamiento Quirúrgico del Pie Diabético. Análisis de 402 Casos. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 25.- Goldberg I. Los Receptores HLA en la Génesis de la Diabetes Mellitus Insulino Dependiente. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989

- 26.- Goldestein D.E., Little R.R., Wiedmeyer H., England J.D. and McKenzie E.M. Glycosylated Hemoglobin: methodologies and Clinical Applications. *clin Chem* 1986;32:64-70
- 27.- Guillén G., Miguel A., Soto de la Vega M. Tratamiento de la Polineuropatía Diabética Sensitivo-motora con un inhibidor de la aldosa reductasa (tolostat) estudio abierto. XXIX Reunión Anual de la Sociedad mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 28 - Gutierrez G.R., Gradillo S.J.M., Laviada M.H. " et al " Efecto de la Destrofenfloramina sobre el control de peso en pacientes obesos. Reporte preliminar. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 29.- Hammons G.T., Junger K., McDonal J.M. and Ladenson J. H. Evaluation of three Minicolum Procedures for Mesuring Hemoglobin A₁. *Clin chem* 1982;28:1775-1778
- 30.- Hayes E.J., Gleasson R.E., Soeldner J.S. "et al". Measurmet of Hemoglobin A₁ by Liquid chromatography and by Agar Gel Electrophoresis Compared. *Clin Chem* 1981;27: 476-479
- 31.- Instituto Nacional de Cancerología. Algo sobre Diabetes.
- 32.- Junco E., Barrón C., Almengor A., Mondragón L. " et al " Hemoglobina Glicosilada y su Correlación con el Desarrollo Pondo-Estatural en Niños con Diabetes Mellitus Tipo I XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989

- 33.- Kirstein M. and Vlassar H. Advanced Glycosylation Endproducts are Chemotactic for Normal Human Monocytes: Role in Diabetes and Aging. Diabetes 1989;58:56 A
- 34.- Klein R.L., Gisinger C. and López-Virella M.F. Interaction of Glycosylated and Non-Glycosylated Subfractions of Low Density Lipoprotein (LDL) with Human Monocytes-Derived Macrophages. diabetes 1989;58:70 A
- 35.- Koschinsky T., Orekhov A.N., Tertov V.V. Atherogenicity of Diabetic Serum and Glycosylated Low Density Lipoproteins (LDL). Diabetes 1989;58:82 A
- 36.- Laboratorios Helena. Manual Práctico para la Cuantificación e Interpretación de las Hemoglobinas Glicosiladas.
- 37.- Lyons T.J., Silvertri G., Dunn J.A., Dyer D.G. " et al " Glycosylation, Oxidation and Fluorescence in Diabetic and Senil Catarats. Diabetes 1989;58:26
- 38.- Nathan D.M. Glycosylated Hemoglobin: A Measure of Control Corin Glass Works. 1984
- 39.- Nathan D.M., Dunn B.S., Francis T.B. Two Commercial Methods Evaluated for Eliminating the Labile Fraction from the Assay for Glycosylated Hemoglobin. Clin Chem 1984;30: 109-110
- 40.- National Diabetes Data Group. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. Diabetes 1979;28:1039-1058

- 41.- Ocegüera V.R., Reyes L.W., Guerrero R.S., Loeza B.F. "et al" Detección de Diabetes mellitus en Puerepechas. XXIX Reunión anual de la sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 42.- Ocegüera V.R., Ruiz V.H., Vargas Z.E., Ramirez E.J. " et al" Comportamiento de la Glucemia en la Relajación Inducida por Retroalimentación Biológica. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. 1989
- 43.- Palomino A.A., Carrasco C.P. Oroginales. Hemoglobinas Glucosiladas y Control del Diabético Ambulatorio. Análisis Clínicos 1983;32:177-185
- 44.- Parker K.M., England J.D., Da Costa J., Hess R.L. "et al" Clin Chem 1981;27:669-672
- 45.- Peñaloza R. Metodo Cromatográfico para la Determinación de Hemoglobina Glucosilada en forma Rutinaria. Rev. Mex. Patol. Clin. 1985;32:135-137
- 46.- Peterson C.M. and Jovanovic L.M.A. Prime for Glycosylated Hemoglobins. Laboratorios Helena.
- 47.- Quibrera R., Hernández H., Aradillas C. y González S. Prevalencia de la Diabetes Mellitus en Diferentes Clases Sociales de la Población de San Luis Potosí. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989

- 48.- Ramírez E.J., Ramírez S.J., Ocoquera V.R. Epidemiología de la Diabetes Mellitus en el Hospital General Regional del IMSS en Morelia. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 49.- Ramos V.M., Hernández H., Loyola R. Neuropatía Diabética Sensorial. Manejo con Neuroestimulación Eléctrica Transcutánea. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 50.- Robles V.C., Cornejo B.J., Dorante A.L., Gutierrez G. R. 2et al2 Actualización del Registro de diabetes Mellitus Tipo I; grupo Ciudad de México 1984-1988. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 51.- Ramón R.R., Arcoola O.F., Partida H.G., Flores S.J.L."et al" Estudio Experimental del Efecto Hipoglicémico de Plantas Antidiabéticas. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 52.- Schellekens A.P.M., Sanders G.T.R., Thornton W.y Groenestein T. Sources of Variation in the Column-Chromatographic Determination of Glycohemoglobin (HbA_{1c}). Clin Chem 1981; 27:94-99
- 53.- Singer D.E., Coley Ch.M., Samet H. and Nathan D.M. Tests of Glycemia in Diabetes Mellitus their Use in Establishing a Diagnosis and in Treatment. Annals of Internal Medicine 1989;110:125-135
- 54.- Standefer J.C. and Eaton R.P. Evaluation of a Colorimetric Method for Determination of Glycosylated Hemoglobin. Clin Chem 1983;29:135-140

- 55.- Swamy N.S., Qiu C.C., Abraham A. and Abraham E.C. Glycation and Thiol, oxidation of Erythrocyte membrane proteins during Diabetes: Inhibition by Acetylsalicylic acid. Diabetes 1989;58:84 B
- 56.- Tamez P.H.E., Barquet J., Quintanar E.A., Salas G. L.R. Diabetes mellitus en el Anciano. ¿ Problema cualitativo y cuantitativo de la Insulina? Rev. de la Sociedad de medicina Interna de México 1989;5:114
- 57.- Tamez P.H.E., García V.C., Santos F.R., González M.P. M. "et al" Respuesta Heterogenea de peptido C en el Paciente con Diabetes mellitus. utilidad Clínica. Rev.de la Sociedad de Medicina Interna de Mexico 1989;5:114
- 58.- Tavano C.L., Avila R.H., Nissan S.E., Breña F.H. "et al" El Efecto Diabetogénico del Embarazo se Presenta en Todas las Mujeres Gestantes? XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 59.- Vargas A.L., Laviada A.E. y Rosado C.R. Prevalencia del Binomio Obesidad Diabetes en un grupo de Población Socio-economica Baja del Estado de Yucatán. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. 1989
- 60.- Vargas A.L., Laviada E.A., Chan L.C. Prevalencia de Diabetes Mellitus en Adultos que Asisten a la Consulta Externa del Hospital O'Horan S.S.A. XXIX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología 1989
- 61.- Vesely D.L. and Sander L.L. False Elevation of Hemoglobin A_{1c} by Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. Journal of Medicine 1987;18:81-92

- 62.- Vlassara H., Esposito C., Gerlach H. and Stern D. Receptor-Mediated Binding of Glycosylated Albumin to Endothelium Induces Tissue Factor, and Acts Synergistically with TNF Procoagulant Activity. Diabetes 1989;58:83 A
- 63.- Winterhalter K.H. Determination of Glycosylated hemoglobins. Enzymology 1985;76:732-739
- 64.- Yamashita K., Yoshikawa H., Bannai C., Kato M. " et al " Glycosylation of Glomerular Basement membrane type IV Collagen and Proteinuria. Diabetes 1989;58:25 A