

2016

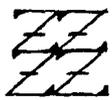
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
UNIDAD ACADÉMICA "ZARAGOZA"

VALORES DE REFERENCIA DE GLICOHEMOGLOBINA DE UNA POBLACION PEDIATRICA, POR EL METODO DE ELECTROFORESIS EN AGAROSA EN EL HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO "LA RAZA".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A .
ANA ISABEL BARCO GONZALEZ



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1994



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.

AGRADECIMIENTO

A MIS ASESORES:

Dr. PEDRO GARCIA RAMIREZ
JEFE DEL LABORATORIO DEL H.G.C.M. "LA RAZA"
POR SU VALIOSA ASESORIA E INTERES, POR LO
CUAL FUE POSIBLE LA REALIZACION DEL TRABAJO.

Q.F.B. OLIVA GRAJALES MORALES.
JEFE DE LA SECCION DE BIOQUIMICA DEL
H.G.C.M. "LA RAZA"

POR EL GRAN APOYO QUE ME BRINDO.

Q.F.B. MATILDE VALLEJO RUIZ.
POR SU TIEMPO Y ENSEÑANZA EN EL DESARROLLO
DEL TRABAJO.

Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZALEZ MELENDEZ.
POR SU ASESORIA Y COLABORACION.

A MIS AMIGOS:

LYDIA VIVEROS Y JUAN RIVERA.
QUIENES ME BRINDARON SU VALIOSA AYUDA
INCONDICIONALMENTE.

A TODOS ELLOS
MIL
G R A C I A S

DEDICATORIAS

A MIS PADRES...

GUADALUPE Y AURELIO QUE
CON TODO SU ESFUERZO Y SU
CARIÑO ME IMPULSARON A
CONSEGUIR ALGO TAN VALIOSO
COMO LO ES UNA CARRERA
PROFESIONAL.

A MIS TIAS...

CARMEN, JOSEFINA Y PRINCIPALMENTE A MI TIA ANA Y MI TIO ADRIAN QUE ME DAN SU AYUDA INCONDICIONALMENTE.

A ALGUIEN MUY ESPECIAL...

LUIS CARLOS QUE ME BRINDA SU CARIÑO, COMPRENSION Y ME APOYA PARA SEGUIR ADELANTE Y SUPERARME.

A MIS HERMANAS...

SOLEDAD, AMALIA, GUADALUPE ELENA Y A MI HERMANO ROBERTO, POR EL SIMPLE HECHO DE SERLO Y POR QUE DE ALGUNA MANERA RECIBI SU AYUDA.

A MI PEQUEÑA FAMILIA DE LA ESCUELA...

ANGELICA, CARMELITA, ISABEL, VICTOR Y ALBERTO. A QUIENES LES AGADEZCO INFINITAMENTE SU AYUDA Y SOBRE TODO SU VALIOSA AMISTAD.

A MI AMIGA...

ALICIA IBARRA OLMOS QUE SIEMPRE ESTUVO AL PENDIENTE DE MI Y POR QUE ES UNA PERSONA MUY HUMANA.

A CLAUDIA Y VICTORIA...

QUE SIEMPRE ESTAN CONMIGO
BRINDANDOME SU AMISTAD.

I N D I C E

1. INTRODUCCION.....	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
3. FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	6
3.1. Diabetes Mellitus	6
3.2. Complicaciones de la Diabetes	10
3.3. Hemoglobina y reacción de Glicosilación.....	11
3.4. Utilidad clínica de la Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)	18
3.5. Diagnóstico de la Diabetes	23
3.6. Ventajas y desventajas de los Métodos empleados en la determinación de la Hemoglobina Glicosilada	25
3.7. Método Electroforético	26
3.8. Valores de referencia	30
4. OBJETIVOS.....	33
5. HIPOTESIS	34
6. DISEÑO DE INVESTIGACION	
6.1. Selección de individuos de referencia.....	35
6.2. Tipo de estudio	35
6.3. Población.....	36
6.4. Criterios de inclusión y exclusión	36
6.5. Variables	37
7. METODOLOGIA	38
7.1. Técnica electroforética	41
7.2. Notas importantes sobre la técnica	43

7.3. Diagrama de flujo	45
8. DISEÑO ESTADISTICO	
8.1. Recomendaciones	46
8.2. Procedimiento para establecer los valores de referencia	46
9. RESULTADOS	49
10. DISCUSION DE RESULTADOS	61
11. CONCLUSION	65
12. BIBLIOGRAFIA	66

1. INTRODUCCION

Gracias a la Ciencia y la Tecnología el promedio de vida de los humanos se ha duplicado en los últimos 200 años y las condiciones laborales y el nivel de vida han elevado la condición humana, por lo menos en una parte de la población mundial (1).

Uno de los grandes logros de la Ciencia y la Tecnología es el área Médica, lo cual ha permitido se implementen técnicas y métodos más efectivos que faciliten y mejoren el control de muchas enfermedades, principalmente de aquellas que lo requieren de una manera más estricta y segura, como lo es el caso de la Diabetes mellitus.

Muchos han sido los esfuerzos del personal médico para conseguir un buen control en los pacientes diabéticos, sin embargo no ha sido tarea fácil. El control de estos pacientes es llevado a cabo periódicamente con las determinaciones en laboratorio de glucosa sanguínea y urinaria (2), que además de la terapia necesaria tienen el propósito de evitar hiperglicemias prolongadas que ocasionan daños posteriores e irreversibles a órganos y tejidos (2,3). Por otro lado, este control suele ser tedioso para los pacientes y proporciona en ocasiones información poco confiable (2), por lo que actualmente se prefiere realizar la determinación de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c), que proporciona importante información sobre el estado metabólico de

glucosa a largo plazo y no sólo del estado transitorio de una evaluación de glucosa en ayunas (2, 3).

La glicosilación de la molécula de Hemoglobina es llevada a cabo en un proceso no enzimático en forma lenta y continua durante los 120 días de vida del eritrocito humano (3-6), de esta manera una sola determinación puede reemplazar las múltiples determinaciones de glucosa a intervalos de tiempo (2, 3, 7), por lo que este metabolito es más utilizado en el control de pacientes diabéticos.

Muchos han sido los métodos empleados en la determinación de Hemoglobina glicosilada, principalmente la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía en minicolumna con temperatura controlada, afinidad cromatográfica, enfoque isoelectrico y electroforesis (2,3), cada uno de estos métodos proporciona importante información clínica, pero ninguno es considerado como el mejor, por esta razón cada laboratorio adquiere el que mejor se ajusta a sus necesidades.

En la interpretación de los resultados del laboratorio clínico, es necesario tener conocimiento de la variación de estos resultados con respecto a valores de referencia bien definidos, ya que pueden variar con respecto a la edad, sexo, de una población a otra y de acuerdo al método empleado para su determinación (8). de esta manera es necesario establecer valores

de referencia propios de cada laboratorio de acuerdo a sus necesidades.

En el presente trabajo se establecieron los valores de referencia de Hemoglobina Glicosilada propios de la población pediátrica mexicana con edades entre los 3 y los 16 años de edad, en ambos sexos, determinados por el método de Electroforesis en agarosa, los cuales fueron contrastados con los ya establecidos en población adulta norteamericana por el mismo método. Se encontro que no existe diferencia significativa entre los valores de la población pediátrica mexicana y la adulta norteamericana.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para una adecuada interpretación de los resultados en Análisis Clínicos, es necesario tener conocimiento de la variación de estos con respecto a valores de referencia bien definidos. Dichos valores son de gran ayuda en la evaluación del estado de salud del individuo, para la identificación de personas con riesgo a una enfermedad y para apoyar las decisiones del Médico. Sin embargo, se debe tener cuidado en el manejo de valores de referencia, debido a que estos suelen variar con respecto a la edad, sexo, de una población a otra y depende ampliamente del método empleado para su determinación (8-10). De esta manera, es necesario establecer valores de referencia propios de cada Laboratorio dependiendo del tipo de población que acude a sus servicios y de acuerdo a las necesidades de cada uno de ellos (11).

El propósito del presente trabajo es establecer los valores de referencia de Hemoglobina Glicosilada para una población pediátrica por el método de Electroforesis en agarosa, el cual pretende ser implementado como método de rutina en el Laboratorio del Hospital General Centro Médico La Raza.

La importancia de establecer estos valores de referencia de Hemoglobina Glicosilada en la población pediátrica mexicana, es debido a que no se han determinado valores de

referencia en esta población, pues generalmente han sido determinados en la población adulta (en ocasiones diferentes a la nuestra), empleando diversos métodos en su determinación, incluyendo el de Electroforesis en agarosa, además, debido a que los valores suelen variar con respecto a la edad, sexo, de una población a otra se obtuvieron los valores de referencia propios de la población pediátrica mexicana.

Dichos valores de referencia serán de gran ayuda en el monitoreo de pacientes pediátricos con Diabetes Mellitus, ya que la Hemoglobina Glicosilada es utilizada como indicador seguro a largo plazo en estos pacientes. De esta manera se observará el grado de control de los niños con este padecimiento.

Aun cuando la Diabetes es raramente encontrada en los niños, no deja de ser importante el número de ellos que son afectados por tal enfermedad (En México no se tiene la estadística de niños con este padecimiento, sin embargo cada vez son más los diabéticos que acuden al Hospital), sobre todo porque la Diabetes mal controlada puede ser un problema de semi o total incapacidad a consecuencia de los daños producidos a órganos y tejidos. Por lo que estos niños requieren de un control seguro, estricto y oportuno que pueda preservar su vida.

3.FUNDAMENTACION DEL TEMA

Una de las enfermedades más antiguas que ha afectado al hombre es la Diabetes Mellitus. La primera descripción sobre la enfermedad data de algunos 1500 años antes de Cristo, posteriormente se describió la aparición de Diabetes en generaciones sucesivas, así como también se indicaron algunos signos y síntomas de la enfermedad (12). De esta manera, la Diabetes es desde entonces una de las enfermedades más intensamente estudiadas. La enfermedad es compleja y presenta distintas clases y grados de patología, la tendencia a la Diabetes tiene un gran componente genético. Por otro lado, el ejercicio físico y la calidad de la alimentación ejercen un profundo efecto sobre su incidencia (13).

3.1.Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus es un síndrome crónico metabólico con afección vascular que se caracteriza por altas concentraciones de glucosa en sangre, debido a que existe una absoluta o relativa deficiencia de insulina (3,14-16).

Se han utilizado diversas formas de clasificación de la Diabetes Mellitus, en las que incluyen factores como : la edad del individuo, duración y etapas de la enfermedad, factores

hereditarios y ambientales, así como también signos y síntomas (12,16,17), no obstante algunas de estas clasificaciones llegan a dar una pobre descripción al considerar sólo alguno de estos factores.

Actualmente la diabetes es clasificada en cuatro grupos principales (3):

- a) Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID) o Diabetes tipo I (antes conocida como Diabetes Juvenil).
- b) Diabetes Mellitus Insulino No Dependiente (DMIND) o Diabetes tipo II (antes conocida como Diabetes de inicio adulto o Diabetes estable).
- c) Diabetes Mellitus del Embarazo o Diabetes Gestacional.
- d) Diabetes secundaria causada por enfermedades como: hemocromatosis, acromegalia, adenopatías, enfermedades pancreáticas, hormonales, drogas, herencia, etc.

Existen algunos autores que incluyen en su clasificación las anormalidades en la tolerancia a la glucosa (15).

La Diabetes Mellitus es una de las enfermedades endocrinas más frecuentes y a consecuencia es considerada como un problema de salud pública en el mundo entero, debido a su alta prevalencia de aproximadamente 30 millones de personas (17). Sin embargo, la verdadera incidencia es difícil de conocer, por los diferentes criterios diagnósticos que se aplican (16). Las

cifras de la incidencia en cada país son diferentes, siendo en promedio de 4 a 5 %, aunque estos números pueden ser aumentados a consecuencia del estilo de vida, nutrición particular y actividad física (13,18,19).

En 1960 la población urbana mexicana tuvo una ocurrencia de 1.3 % y la rural de 2.3%. Para 1983 se dio a conocer que la Diabetes es la tercera causa de muerte en el D.F. en personas de la 5a y 6a década de la vida (19).

Por otra parte la DMID es una de las enfermedades crónicas más importantes que afectan a los niños del mundo (ver cuadro 1) y se encuentra en los primeros lugares de mortalidad en países desarrollados y según la Organización Mundial de la Salud las cifras aumentan en países en vías de desarrollo (20).

En un estudio realizado en Suecia en los años de, 1977 a 1985 registraron de un total de 3228 pacientes con DMID, con edades de 0 a 14 años 10 muertes en este tiempo. Se encontró que de cinco muertes dos son a consecuencia de la Diabetes, otras dos son causa de accidentes y un caso no identificado con certeza (21). Desafortunadamente para la población pediátrica mexicana no se tiene una estadística que nos muestre como se ha desarrollado esta enfermedad en los últimos años.

Cruado No. 1
 PREVALENCIA DE ENFERMEDADES CRONICAS
 EN LOS NINOS DEL MUNDO

Enfermedad crónica	Prevalencia Rango/100 000
Cancer menores de 15 años (incluyendo todos)	12.2
Leucemia	3.9
Cerebro	2.6
Linfoma	1.3
Otros canceres	4.8
DMID	11.5
Ulcera péptica	3.5
Fibrocis Cística	3.1
Artritis Reumatoide Juvenil	3.0
Esclerosis Múltiple	3.0
Síndrome Nefrótico	1.3
Distrofia Muscular	1.1
Lupus Eritematoso	0.2

Fuente: Drash AL, 1987.

3.2. Complicaciones de la Diabetes

A diferencia de otros síndromes crónicos la Diabetes Mellitus puede ser detectada y controlada a tiempo (12). El control de estos pacientes es llevado a cabo dependiendo de la clasificación y la severidad de la enfermedad (3). Actualmente se pretende complementar el monitoreo de pacientes diabéticos utilizando la determinación de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) o Glicohemoglobina (GHb), como método de rutina y no como prueba especial en el laboratorio del Hospital General Centro Médico La Raza.

El realizar dicho control no es tarea sencilla, ya que cuando existe un pobre control se presentan hiperglicemias prolongadas que conducen a complicaciones irreversibles a largo plazo de órganos y tejidos como: nefropatías, retinopatías, (ambas complicaciones eventualmente afectan del 30 al 50 % de los pacientes con DMID, usualmente de 5 a 10 años después del inicio de la Diabetes (22)), sistema nervioso, alteraciones en las funciones de las células rojas, leucocitos, hiperagregación de las plaquetas, cascada de coagulación, anomalías en el metabolismo de lípidos dando lugar a enfermedades vasculares, etc. (2,3,16).

Por otra parte, los pacientes con DMID, en quienes no se logra un adecuado régimen de Insulina es frecuente observar

severos y diversos comas hipoglucémicos, que pueden ser una consecuencia en la mortalidad de los niños con este padecimiento (23-27). Cabe mencionar que además de estas complicaciones, los niños pueden presentar retardo en la velocidad de crecimiento (28-30).

3.3. Hemoglobina y reacción de Glicosilación

La Hemoglobina (Hb) es una proteína oligomérica unida a una fracción hemo, esta formada por dos cadenas alfa (α) y dos cadenas beta (β), sobre las cuales se fija el grupo hemo, tiene un peso molecular de aproximadamente 64 000 Daltons (13,31,32). Su síntesis es llevada a cabo en el eritroblasto y en condiciones normales diariamente se sintetizan aproximadamente 8 g de Hb; la concentración media es de 15 g / 100 ml de sangre.

En la especie humana existen genes para producir por lo menos siete subunidades de Hemoglobina diferentes, que se expresan en los diversos momentos del desarrollo (3,31,33).

En las etapas del desarrollo normal los valores de Hemoglobina son diferentes (Ver cuadro 2). En el nacimiento y pocos meses después de este, alrededor del 60 % de la Hb es Fetal (HbF), 40 % es Hb A y el resto es Hemoglobina A2 (HbA2). Durante la adolescencia está distribución cambia permanentemente, el 97 % es HbA, 2.5 % es HbA2 y el resto es HbF (3,6,7,31).

Las diversas funciones biológicas de muchas proteínas dependen de la modificación post-traslacional. Así, por ejemplo, en la reacción de glicosilación se unen a la cadena polipeptídica carbohidratos que ya no le confieren (en algunas ocasiones) las mismas propiedades específicas. El carbohidrato unido a la proteína puede conferirle propiedades lubricantes, actúan también como protectores a la destrucción por el Hígado, actúan como receptores, ayudan a la secreción a partir de su célula de origen (aunque existen algunas que no requieren del azúcar para realizar esta función), también sirven como modo de fijación entre células que le permiten intercambiar mensajes, tal vez reconocerse entre sí (7,34,35).

En el plasma sanguíneo existen más de 80 glucoproteínas diferentes, de las cuales algunas ejercen funciones precisas. Algunos de estos ejemplos son: las inmunoglobulinas, transferrinas, haptoglobinas, ceruloplasmina, α_2 -macroglobulinas (en algunos de estos casos no es necesario el azúcar para su actividad) (34). En la Hemoglobina no se ha encontrado una función específica (36).

Cuadro No. 2

Hemoglobinas normales durante el desarrollo

Hemoglobina	Subunidades	Desarrollo
Gower-1	alfa2-epsilon2 (a2-E2)	Embrionario
Gower-2	teta2-epsilon2 (ø2-E2)	Embrionario
Portland-1	teta2-gama2 (ø2-t2)	Embrionario
Fetal	alfa2-gama2 (a2-t2)	Fetal-Adulto
A	alfa2-beta2 (a2-ß2)	Adulto
A2	alfa2-delta2 (a2-s2)	Adulto

Fuente: Christenson RH, 1991.

Es importante mencionar que existe un grado de glicosilación para cada una de las proteínas y está relacionado con la vida media de cada una de ellas, la concentración de glucosa presente en la sangre y las características químicas de cada proteína. In vivo y en orden descendente las inmunoglobulinas son las más glicosiladas, posteriormente el complemento C3, albúmina, transferrina, haptoglobina y α -1-antitripsina (37).

A este conjunto de proteínas se les refiere el nombre de Fructosaminas de las cuales la albúmina es la más abundante. La glicosilación de ésta proteína se produce al reaccionar la glucosa con el grupo amino epsilon de la lisina (3,38).

Algunas de estas proteínas están relacionadas con las complicaciones a largo plazo de pacientes diabéticos, en quienes se tiene un pobre control glicémico (34,37). Desafortunadamente la determinación de la concentración de la albúmina y las otras proteínas plasmáticas no son utilizadas en el control de pacientes diabéticos, porque la vida media en circulación es comparablemente más corta en relación a la vida media de la Hemoglobina, por lo que a esta se le ha tomado como indicador seguro a largo plazo en el control de pacientes diabéticos (3,36,38).

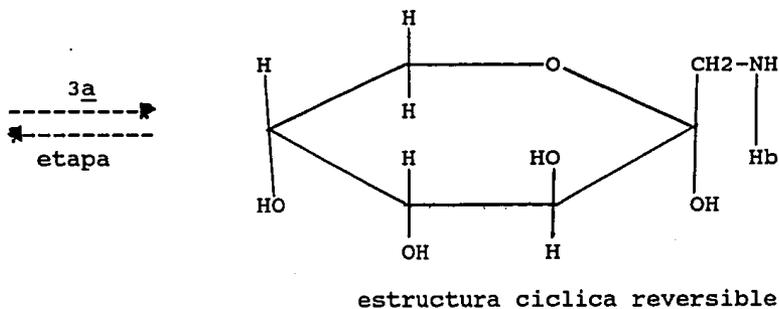
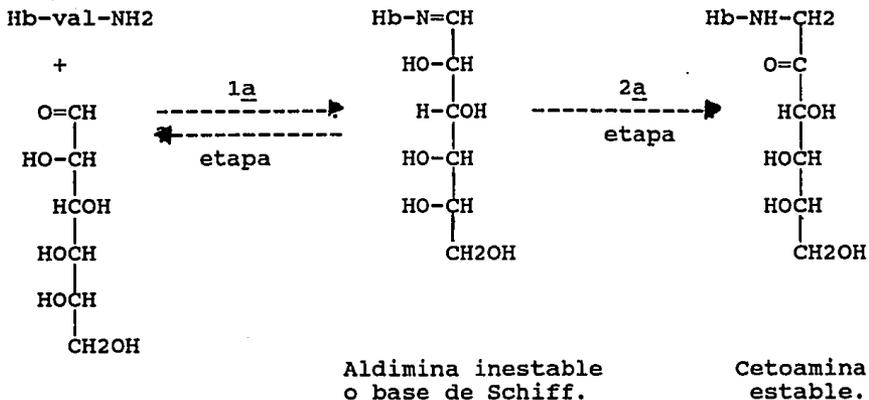
Por otro lado, una vez que ha ocurrido la síntesis de la Hemoglobina en el eritroblasto, inmediatamente después es llevada a cabo una reacción post-sintética llamada "Glicosilación", dando

lugar a una proteína con peso molecular de 64 500 Daltons (5,31,33). En esta reacción la glucosa reacciona espontáneamente con la Hb dando lugar a varios componentes menores en la sangre normal. A estos componentes se les denomina Hemoglobinas rápidas, ya que en el corrimiento cromatográfico se descubrió que se desplazaban más rápidamente que la Hemoglobina (7,35,36).

La glicosilación de la Hemoglobina A (HbA) puede realizarse con la glucosa o con algún otro azúcar, en una reacción no enzimática del grupo amino N-terminal de la cadena beta (β) de la Hb dando como resultado la HbA1 (esquema1). La reacción es llevada a cabo lenta y continuamente durante los 120 días de vida del eritrocito en un proceso de dos etapas. En la primera etapa (etapa rápida) es formada una aldimina inestable o base de Schiff que es conocida como "Hemoglobina Glicosilada Lábil", que puede ser nuevamente convertida en glucosa y HbA. Este equilibrio es seguido inmediatamente por la etapa dos (etapa lenta), que consiste en un reordenamiento de Amadori para dar lugar a una cetoamina estable que es irreversible a un pH fisiológico (3-6,39-41).

Algunos autores proponen que esta reacción ocurre en tres etapas, en la última hay un cambio conformacional favorable al pH sanguíneo, la estructura cíclica es reversible (3).

Figura No. 1
 Reacción de Glicosilación



La modificación post-traslacional de la proteína da lugar a varias subespecies de la HbA, tales como: HbA1a que comprende el 1.6 %, la HbA1b con 0.8 % y la más abundante HbA1c con el 4.0 % del total de la HbA1 (4-6). Estas hemoglobinas difieren entre sí por el tipo de azúcar unido a ellas, así la HbA1a1 se une a la fructosa 1,6-difosfato, la HbA1a2 a la glucosa 6-fosfato y la HbA1c a la D-glucosa. La reactividad de estos azúcares con la Hb depende ampliamente de la forma aldehídica que presente. Los azúcares fosfatados como la fructuosa 1,6-difosfato y la glucosa 6 fosfato son realmente más reactivos que la D-glucosa, pero su reactividad se ve limitada por la concentración presente en el eritrocito, siendo comparativamente menor a la concentración de la D-glucosa que da lugar a la HbA1c (4,7,39).

Es importante hacer notar que además de la concentración plasmática de la glucosa y la vida media del eritrocito, la glicosilación es afectada por la permeabilidad de la glucosa, grado de oxigenación del eritrocito y la concentración del 2,3-difosfato (39). Sin embargo no se ha mencionado que tan dependiente es la cantidad de Hemoglobina y Globulos para que se lleve a cabo la reacción de Glicosilación.

La glicosilación de la Hemoglobina A no sólo se limita al ataque del grupo aminon N-terminal de la Valina en las cadenas beta, puede ocurrir en otros sitios como en los N-terminales de la lisina en cadenas alfa y beta. Sin embargo la glicosilación en

estos sitios no altera significativamente las propiedades de la Hemoglobina y no es posible separarlas de las formas no glicosiladas de la Hb por medio de los métodos convencionales de cromatografía de intercambio iónico y electroforesis (39).

La concentración de la Glicohemoglobina se va acumulando durante la vida del eritrocito observándose mayor concentración en las células rojas más viejas que en las más jóvenes, pero disminuye en pacientes con células de corta vida como en las anemias hemolíticas (6), provocando la destrucción del eritrocito. Un claro ejemplo de esto es la HbS además de ser glicosilada polimeriza dentro del eritrocito formando túbulos de gran longitud que deforman la célula, la alargan, hacen más rígida y frágil la membrana lo que explica su destrucción prematura. Por otro lado las moléculas de HbF sólo se glicosilan sin causar daño a la célula (39,42).

3.4. Utilidad clínica de la Hemoglobina Glicosilada (HbA1c)

La utilidad clínica de la Hemoglobina Glicosilada radica en el monitoreo de pacientes diabéticos. La relación del mal control de glucosa con anormalidades o secuelas del estado diabético, esta relacionado con altas concentraciones de HbA1c, aumentando generalmente de dos a tres veces su valor normal en pacientes diabéticos mal controlados (2-4,6,22,39,43). La evaluación de la

HbA1c es válida de dos a tres meses dependiendo de la gravedad del paciente (39) y representa el valor de hiperglicemias prolongadas y no sólo el estado transitorio de una evaluación de glucosa en ayunas (2,3,16).

Posteriormente a la identificación de las hemoglobinas glicosiladas hecha por Allen y colaboradores en 1958 (36), fue posible establecer programas de normalización de la concentración de glucosa en pacientes con DMID. Con ayuda de este monitoreo fue posible establecer una terapia de insulina en estos pacientes. En dicho programa se observó que los pacientes tendían a normalizar la HbA1c en un plazo aproximado de seis semanas. Mientras tanto se mostró que en los pacientes con Diabetes tipo II en quienes se administro Clorpropamida los niveles de HbA1c fluctuaban muy poco, (Ver grafica 1), pero cuando el control con estos hipoglicemiantes es discontinuo la concentración de glucosa es incrementada hasta en 150 mg/dl. A esta situación responden los niveles de HbA1c incrementandose de inmediato en una semana, continuando el incremento hasta alcanzar una estabilidad en las tres semanas del tratamiento discontinuo. Al restituirse la terapia la concentración de glucosa en ayunas decrece de 180 mg/dl a 140 mg/dl en la primer semana, en cambio la concentración de Hemoglobina Glicosilada decrece en las siguientes cuatro a seis semanas (2).

A pesar, que en ocasiones estos programas son muy ambisiosos en pacientes con DMID y sobre todo en niños y adolescentes, no

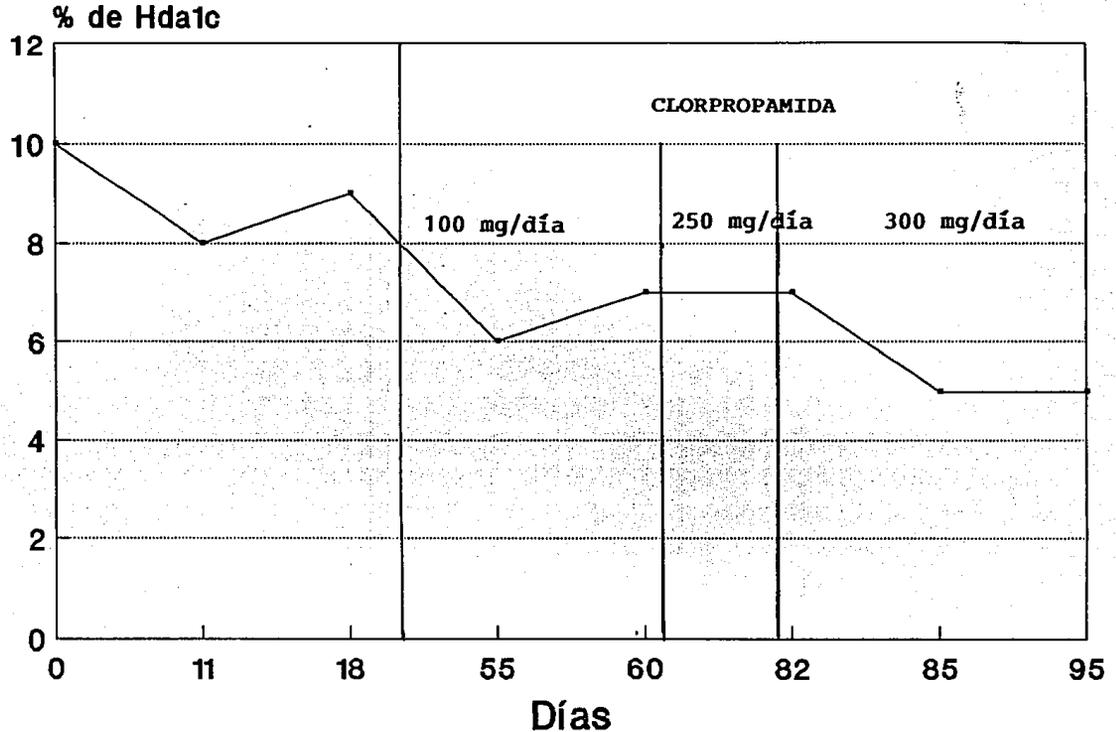
deja de ser importante la determinación de HbA1c, porque gracias a ella se da la pauta a conseguir el tratamiento más adecuado en este tipo de pacientes, siguiendo el control metabólico adecuado, una dieta y evaluando los beneficios o complicaciones que esta pudiera ocasionar (Ver grafica 2) (45,47).

Otro uso importante de la glicohemoglobina es el evaluar a cada paciente contra si mismo para dar un régimen adecuado de insulina (48,49).

Se ha encontrado que la velocidad de crecimiento en niños con DMID esta linealmente relacionada con el control metabólico. Los niños que se encuentran en un estado de pubertad y prepubertad son muy vulnerables a la supresión del crecimiento, pero una vez establecida la pubertad no ocurre la supresión hasta que exista una marcada hiperglicemia (valores normales de HbA1c mayores de 16 %) (27-29), por esta razón se debe tener un cuidado especial en estos niños.

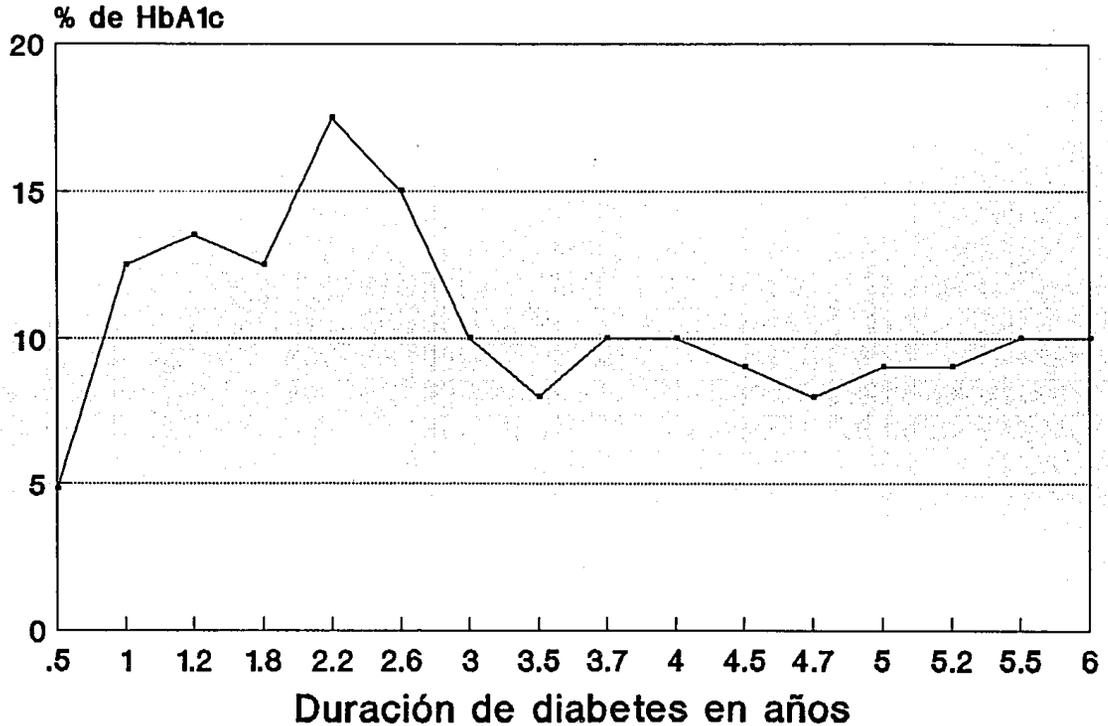
Desafortunadamente en México no se han determinado los valores de referencia de la Hemoglobina Glicosilada para una población pediátrica, que sería de alguna manera el principio de muchas investigaciones relacionadas con el control metabólico y las complicaciones de este en pacientes diabéticos, que ayudarían a mejorar y preservar su vida.

Gráfica 1. Control glicémico.



Diadnese (chlortrotamida 44). Diabetes de inicio en la madurez con dieta adecuada y aumento de clorpropamida.

Gráfica de control glicémico.



Ladenson J.M., 1985. Paciente de 13 años con DIMD, quien no seguía dieta adecuada tratado con 5 USP de Insulina.

La HbA1c también es útil en el control metabólico de mujeres embarazadas que cursan con Diabetes Gestacional. Existe una hipótesis de que la hiperglicemia en mujeres embarazadas produce hiperinsulinemia al feto y por lo tanto acromegalia y relaciona el peso del recién nacido con los niveles de HbA1c (2,3,5,50).

3.5. Diagnóstico de Diabetes

La poliuria, la polifagia y la polidipsia, síntomas característicos de la Diabetes Mellitus son importantes en el diagnóstico clínico, ya que la enfermedad puede cursar asintóticamente y presentar niveles de glucosa normales en ayunas (12,16,18).

La prueba estándar que se ha empleado en el diagnóstico de Diabetes Mellitus en el laboratorio, es la Prueba de Tolerancia a la Glucosa (PTG), gracias a su alta sensibilidad, sin embargo el inconveniente de esta prueba es el depender de factores como: edad del paciente, sexo, dieta previa y actividad física.

Una opción de gran valor en el diagnóstico es la Hemoglobina Glicosilada en combinación con la determinación de glucosa en ayunas que tiene una buena sensibilidad, pero una pobre especificidad, puede ser de gran ayuda en la Diabetes asintomática (Ver cuadro 3). La ventaja que presenta la

Hemoglobina Glicosilada sobre la PTG es que no depende de la edad, sexo, dieta previa y actividad física y de la hora que se realice la determinación (2,4,17,37,51).

Cuadro No. 3

Comparación de la PTG y la HbA1c

Parametro	Glucosa en ayunas	HbA1c	Combinación de glucosa en ayunas y HbA1c*
Sencibilidad relativa (%)	52.0	60.0	40.0
Especificidad relativa (%)	98.7	90.9	99.4
Evaluación de predicción para un diagnostico + (%)	76.5	34.9	83.3
Evaluación de predicción para un diagnostico - (%)	96.2	96.6	95.3
Eficiencia (%)	95.2	88.6	94.9

* Casos considerados como positivos que no son incrementados en la evaluación de ambos glucosa en ayunas y HbA1c. Simon D. 1985.

Fuente: Simon D, et al., 1985.

3.6. Ventajas y Desventajas de los Métodos empleados en la determinación de Hemoglobina Glicosilada.

Existe una gran variedad de métodos para la determinación de Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) desde los sencillos y relativamente baratos hasta los complicados y costosos (52), pero ninguno en realidad ha sido considerado el método estandar, ni adoptado como método de rutina, por lo que cada laboratorio adopta el que mejor se ajusta a sus necesidades y posibilidades.

Entre los métodos más utilizados se encuentran:

- Cromatografía en minicolumna, el que más se ha utilizado en el laboratorio, requiere de un sofisticado sistema buffer, requiere de tiempo, depende ampliamente de la temperatura, interviene la fracción lábil y las variantes de la hemoglobina. En realidad no es muy costoso y tiene una buena precisión (2,39,41,52-57).

- Cromatografía de alta precisión (HPLC), depende ampliamente de la temperatura, pH, fuerza iónica, existe interferencia con las variantes de la Hemoglobina, consume mucho tiempo (de seis a doce Hrs), es muy costoso, las muestras requieren de cierto tiempo de almacenaje. Tiene excelente precisión (2,3,5,39,41,55,56).

- Afinidad cromatográfica: Utiliza resina de agarosa de fenil borato, la fracción no glicosilada también es separada. Algunos

métodos son manuales y consumen mucho tiempo interfieren las variantes de la Hemoglobina, no depende del pH no afecta la temperatura o la fracción lábil (3,5,54,57,58).

- Enfoque isoeléctrico: se emplea un gradiente de pH, anfolitos con puntos isoeléctricos ajustados a los de las Hemoglobinas A y Alc, es muy costoso, consume mucho tiempo, por esta razón no es muy utilizado. No se usan solventes orgánicos de extracción, no interfieren las Hemoglobinas S,C y F (2,39,43,54,59).

- Métodos colorimétricos: Han sido muy empleados, sin embargo son muy engorrosos, la reacción no es estequiométrica por lo tanto hay que estandarizar las condiciones de ensayo. Interfieren las variantes de Hemoglobina, consume mucho tiempo (horas). No depende de la temperatura, ni del pH, tiene una buena precisión (2,5,38,57).

3.7.Método Electroforético.

La electroforesis método seleccionado en este trabajo, se basa en la migración proporcional en sentido y velocidad, de partículas cargadas en un campo eléctrico. Las partículas analizadas o analitos pueden ser: iones simples, complejos, macromoléculas coloidales o material corpuscular, etc. Estas partículas se mueven en un campo eléctrico según el tipo de

partícula y la carga superficial. Así, por ejemplo, la molécula proteica posee una carga eléctrica final que depende del número de grupos ácidos y básicos libres y de su constante de disociación, de la estructura terciaria y cuaternaria de la molécula, del pH y la fuerza ionica del disolvente (60,61).

Existen varios soportes que se emplean en este método dependiendo de la utilidad que se le de por ejemplo el agar, gel de agarosa y acetato de celulosa (3,60).

El agar se puede fraccionar en función de su contenido en grupos con carga, sulfatos y carboxilos, en una parte muy cargada, agarpectina y otra casi neutra, agarosa. A su vez esta última también se puede fraccionar, según su riqueza en grupos cargados, en tres tipos: alta, media y baja endosmosis. La elección del tipo depende de la finalidad que se destine. En este caso se utiliza la media endosmosis que es la más utilizada en la electroforesis de proteínas plasmáticas. La resolución que tiene la agarosas sobre el acetato de celulosa es superior (60).

En la Electroforesis no se produce la electrolisis, debido a que los electrodos se encuentran lo suficientemente separados por lo que la migración de las especies se va atenuando por el denominado "Sistema electroforético" cortandose la corriente antes de que estas lleguen al electrodo (61).

Un factor importante en la electroforesis es el voltaje aplicado. Un potencial elevado origina un calor excesivo, provocando fenómenos indeseables tales como evaporación y gradientes de temperatura irregulares que alteran la separación. Sin embargo la aplicación de voltajes altos tiene grandes ventajas como: reducir el tiempo de electroforesis y mejora la separación ya que los analitos se difunden menos y las manchas quedan más compactas (61).

La Densitometría como método de cuantificación. La densidad del color es proporcional a la cantidad de proteína y puede valorarse mediante un densitómetro. El movimiento através del gel por electroforesis, separa las fracciones glicatadas de las no glicatadas lo cual permite la determinación densitométrica de las bandas (61).

Se puede medir la densidad de la película haciendo pasar un rayo de luz a través de una porción trasparente de ésta y midiendo la intensidad del rayo transmitido con un fototubo. Después se hace pasar el rayo por la zona obscurecida de la película y se vuelve a medir la intensidad. Con esto se calcula el logaritmo de la relación de las dos intensidades (61).

Las partes más importantes de un Densitómetro son una fuente de luz (lampara de tungsteno), una rendija para detectar la porción deseada de la emulsión, un soporte para la placa (o película) fotográfica, un fototubo, y un circuito y un medidor (o

registro) para obtener las lecturas de la fotocorriente. Un sistema de proyección permite una inspección visual de una porción del espectro. Un mecanismo de bastidores proporciona un medio para mover la placa horizontalmente (exploración) y verticalmente (de un espectro a otro) (61).

La forma de la curva característica de una emulsión fotográfica variara de una emulsión a otra, con la longitud de onda y con las condiciones de revelado (61).

El revelado permite una cuantificación fácil debido a que las membranas quedan transparentes despues del tenido. Esta cuantificación se realiza frecuentemente con un fotodensitómetro el cual proporciona, después del tratamiento adecuado de las senales, la integración automática de las áreas de cada pico y ofrece un porcentaje asignable a cada analito. El fotodensitómetro utiliza la radiación reflejada o trasmitida para la cuantificación. Consiste en un bastidor donde se colocan las películas y un sistema mecanico que las trasporta bajo una rendija estrecha por la que pasa a un fototubo y la respuesta amplificada queda registrada en la carta (61).

El método de electroforesis ofrece ciertas ventajas sobre otros métodos, por lo que pretende ser empleado como método de rutina en el Laboratorio del Hospital General Centro Médico "La Raza". Este método no depende de la temperatura, se pueden hacer ocho determinaciones al mismo tiempo con dos controles en un

mismo gel en aproximadamente 45 minutos, no interfieren las hemoglobinopatías, las cuales son separadas y cunificadas cuando se encuentran presentes en el paciente. El método utiliza una pequeña cantidad de muestra (hemolizado 0.5 ul), las muestras de sangre completa se pueden almacenar hasta siete días y los hemolizados por 48 horas de 2 a 80C (3,11). Sin embargo el método requiere de equipo sofisticado y costoso (dato proporcionado en el Hospital).

3.8.Valores de referencia

Los valores de referencia han sido ampliamente usados, generalmente en individuos que se suponen sanos, pero es tanta la controversia que existe en cuanto al termino salud que se ha considerado como relativo, por lo que al seleccionarse los individuos de referencia los criterios de salud se aplicaran de acuerdo al objetivo de investigación del laboratorio (8).

Lo que si es cierto es que los valores de referncia pueden ayudar en las evaluaciones del estado de salud de individuos y poblaciones, se puede identificar gente con riesgo a una enfermedad y ayuda a las decisiones en medicina clinica con varios propósitos científicos (8).

Para establecer valores de referencia se deben estandarizar y describir las condiciones de acuerdo al uso pretendido (8), ya

que como es sabido el organismo humano está sometido a variación causada por procesos fisiológicos, diferencias genéticas enfermedades y factores ambientales.

Estos valores son significativos cuando el individuo y los métodos por los cuales se determinaron son descritos adecuadamente. Por esto es importante que los siguientes factores sean especificados cuando se establezcan y utilicen los valores de referencia:

- (1) Los criterios de inclusión o exclusión utilizados para definir la población de referencia.
- (2) Los criterios de partición utilizados para caracterizar subconjuntos de la población de referencia de acuerdo a la edad, sexo, grupos étnicos, factores genéticos y socioeconómicos, etc.
- (3) Las condiciones ambientales y fisiológicas bajo las cuales fue estudiada la población de referencia y fueron tomadas las muestras del grupo de referencia (9).

Se han reportado una gran variedad de niveles normales de Hemoglobina Glicosilada (Ver cuadro 4), sobre todo en población adulta, sin embargo los valores de referencia de este metabolito varían con respecto al procedimiento empleado. Como se menciona anteriormente la Hemoglobina Glicosilada Lábil interfiere en algunos de los métodos, por lo que de alguna manera influyen en esta variación.

Cuadro No. 4

Valores de referencia de HbA1c reportados por diferentes métodos

Método	Valores de referencia	Referencia (Autor)
HPLC *	4.0-6.0 %	Daneman D,etal. 1989
HPLC **	4.5-5.7 %	King M E 1990
Cromat. con tem. contl.**	5.1-7.8 %	Egger M,etal. 1991
Cromatografía en minicol.**	4.5-8.3 %	King M E 1990
Cromatografía en minicol.***	3.0-6.0 %	Roe T F, etal. 1991
Cromat.intercambio ionico.**	5.5-7.7 %	Helena Laborat.
Enfoque isoelectrico **	4.0-5.2 %	King M E 1990
Afinidad cromatográfica **	5.3-7.5 %	King M E 1990
Electroforesis **	3.0-7.6 %	King M E 1990
Electroforesis (agarosa)**	3.4-5.8 %	Beckman

* No se especifica la población.

** Determinados en población adulta.

*** Determinados en una población con edades de 3 a 24 años.

El método de minicolumna varía con la edad y se cree que esto es válido para otros métodos (5).

4.OBJETIVOS

4.1. Determinar los valores de referencia de Hemoglobina Glicosilada a una población pediátrica entre 3 y 16 años de edad, en ambos sexos, utilizando como método de separación de la Hemoglobina la Electroforesis en agarosa y la Densitometría para su cuantificación.

4.2. Contrastar los valores de referencia obtenidos de la población pediátrica mexicana con los de la población adulta norteamericana que reporta Beckman por el método de Electroforesis en agarosa.

4.3. Analizar si los valores obtenidos de la Biometría Hemática como cuantificación de globulos rojos (GR) y Hemoglobina, así como también la concentración de glucosa de un día tienen relación con la determinación de la HbA1c.

5.HIPOTESIS

Si la ideosincracia de la población pediátrica mexicana es diferente a la de los adultos, en quienes se han establecido valores de referencia de la Hemoglobina Glicosilada (HbA1c) por diferentes métodos incluyendo el de Electroforesis en agarosa y debido a que en México no han sido determinados los valores de referencia para población pediátrica (3 a 16 años de edad), entonces es necesario establecer los valores de referencia para esta población, esperando sean diferentes a los establecidos por Beckan en población adulta norteamericana, empleando el método de Electroforesis en agarosa.

6. DISEÑO DE INVESTIGACION

6.1. Selección de individuos de referencia

6.1.1. Aspectos éticos. Para la determinación de valores de referencia es necesario seleccionar individuos que reúnan las características para lo cual van a ser determinados. Obtener los individuos de referencia no es tarea sencilla, sobre todo cuando se trata de población pediátrica.

Para conseguir la participación de estos sujetos fue preciso pedir la autorización de los padres de familia, a quienes se les explicó en que consistía el estudio y se aclaró que se tomarían las precauciones pertinentes, de tal forma que se respetaría la integridad física de sus hijos, que no corrían ningún riesgo de contraer enfermedades como SIDA y Hepatitis principalmente, ya que se usaría material desechable limpio y esteril. Se les hizo no tan que de no desear su participación en el estudio podían abstenerse de hacerlo (63).

6.2. Tipo de estudio:

- a) Prospectivo.
- b) Trasversal.
- c) Descriptivo.
- d) Observacional.

6.3. Población: Se estudiarón 124 muestras de sangre de niños
Clínicamente sanos con edades de 3 a 16 años.

6.4. Criterios de inclusión y exclusión (8,9,10,62).

INCLUSION:

a) Características de los individuos de referencia

Edad: 3 a 16 años

Sexo: Masculino y Femenino

Factores Genéticos: Que no tengan antecedentes de padres
diabéticos.

b) Factores Biológicos:

Dieta: La acostumbrada (que no acostumbren ayuno prolongado)
que realicen las tres comidas.

Farmacológicos: Que no estuvieran bajo algún tratamiento
médico (principalmente ácido acetilsalicílico,
ya que compiten por los mismos sitios a los
cuales se pega la glucosa (36)).

c) Individuos a quienes al evaluar el médico determine que no
presentan Anemia o Diabetes (que se encuentren clínicamente
sanos). También que al ser evaluados por el laboratorio no
presenten anormalidades en la sangre y que sean
normoglicémicos (Ver cuadro 5).

Cuadro No. 5.

Valores de Glucosa y BH

Parametro	Valor de referencia
Glucosa	60 a 120 mg/dl
Hemoglobina	11 a 15 g/dl
Globulos rojos	4.0 a 5.3 μ/mm^3

6.5. Variables:

a) Independiente: Toma de muestra, preparación de las mismas, biometría hemática y química sanguínea.

b) Dependiente: Valores de Hemoglobina Glicosilada.

METODOLOGIA

7. METODOLOGIA

Material	Especificación
I) Equipo	
Cubeta de electroforesis con puente	PARAGON
Puente de alimentación	PARAGON
Pipeta de rango multiple	0.5, 1, 3, 5ul PARAGON
Procesador de líquido	PARAGON
Densitómetro (Appreise)	PARAGON
Pipeta	50 ul PARAGON
Agitador	VORTEX
II) Material de vidrio	
Tubos de ensayo	10X75 PYREX
Pipeta Sally	20 ul
Matraz aforado	500 ml PYREX

Material	Especificación
----------	----------------

III) Material adicional

- | | |
|-------------------------------------|---------|
| - Gradilla para tubos | --- |
| - Marco para geles | Paragon |
| - Boquilla con manguera | --- |
| - Papel secante para gel | Paragon |
| - Plantillas con pozos para muestra | Paragon |
| - Gasas | --- |

IV) Reactivos

- | | |
|-------------------------------------|---------|
| - Buffer ácido trismaléico (pH=5.2) | Paragon |
| - Reactivo hemolizador | Paragon |
| - Gel de HbA1c (diatrac) | Paragon |
-

7.1. Técnica electrofóretica.

FUNDAMENTO: El estuche Paragon de HbA1c, realiza la separación electroforética de las Hemoglobinas en un gel de agarosa con tampón ácido. Después de la electroforesis, el gel se lava con agua desionizada. El modelo obtenido puede ser cuantificado por densitometría.

7.1.1. Preparación y almacenamiento de reactivos.

Los geles de HbA1c momentos antes de usarlos, se deben de retirar de su embalaje de papel aluminio cuidadosamente. Los geles deben almacenarse a temperatura ambiente, entre 18 y 26°C, hasta su fecha de caducidad. No refrigerar ni congelar.

Tampón trismaléico pH=5.7; Disolver el contenido del frasco de tampón en 400ml. de agua desionizada en un matraz aforado de 500ml. El tampón sin abrir debe almacenarse a temperatura ambiente, entre 18 y 26°C, hasta su fecha de caducidad. El tampón reconstituido en un recipiente cerrado permanece estable por 60 días o hasta su fecha de caducidad, en caso de ser lo anterior.

7.1.2. Obtención de muestras.

La muestra de preferencia para la investigación de rutina de la HbA1c es un hemolizado de sangre entera. La sangre debe recolectarse en EDTA. Al almacenarse entre 2 y 8°C, la sangre

entera permanece estable por 7 días y resulta adecuada para el procedimiento electroforético.

7.1.3. Procedimiento de Hemolizado.

Mezclar 20ul. de sangre entera bien mezclada con 50ul. reactivo hemolizador; invertir o mezclar vigorosamente durante 5 segundos, la muestra esta lista para el procedimiento electroforético, los hemolizados permanecen estables por 48 horas si se les almacena entre 2 y 8oC.

7.1.4. Procedimiento electroforético.

Preparar las muestras de acuerdo a lo mencionado anteriormente. Llenar cada compartimiento de la cubeta de electroforesis con 45ml. de tampón trismaléico. Llenar un recipiente de procesador de líquidos con 300ml. de agua desionizada. Quitar el gel HbA1c de su embalaje de papel aluminio y colocarlo sobre una toalla de papel.

Secar cuidadosamente con un papel secante de gel. Desechar el secante.

Aplicación de la plantilla: Con la posición "A" del borde del gel, aplicar la plantilla al gel, de modo que sus ranuras esté en contacto primero con la superficie del gel, aplicar el

secante de plantilla a lo largo de la misma, alizando suavemente con el dedo para asegurar el contacto, retirar y desechar el secante de plantilla.

Aplicar 0.5ul. de muestra a través de cada ranura de la plantilla. Luego de la aplicación, esperar 5 minutos para permitir la difusión. Retirar inmediatamente y desechar la plantilla, empezar la electroforesis. Colocar el gel en el puente de la cubeta alineando sus posiciones positiva (+) y negativa (-) con los polos respectivos indicados en el puente. Colocar el conjunto en la cubeta de electroforesis y cerrarla. Colocar la cubeta de electroforesis en la fuente de alimentación. Fijar la tensión en 50 voltios, encender y mantener la electroforesis durante 35 minutos. Una vez completada la electroforesis retirar el gel de la cubeta y colocarlo en un marco para geles. Sumergir el gel en agua desionizada durante 5 segundos. Secar el exceso de agua de la parte posterior del gel. El gel debe ser evaluado en húmedo. Evaluar el gel con el densitómetro apropiado a 415nm. editar la gráfica del corrimiento.

7.2. NOTAS IMPORTANTES SOBRE LA TECNICA.

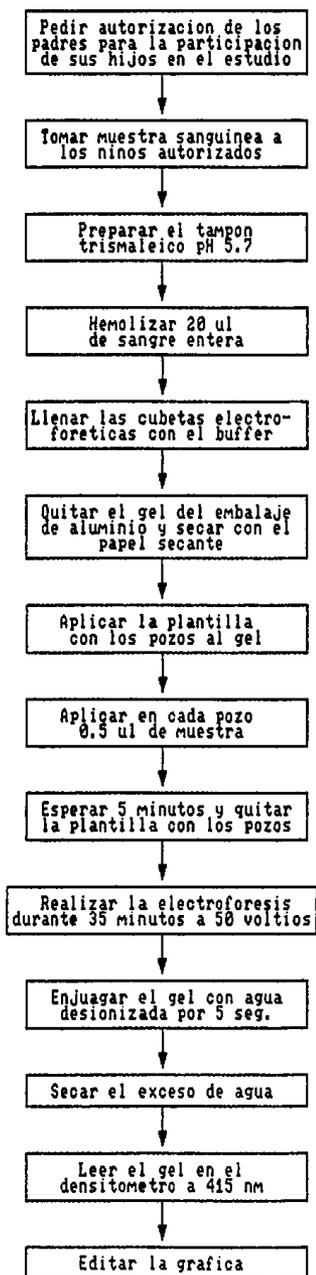
Es muy importante que la cubeta de Electroforesis permanezca bien cerrada una vez que se está llevando a cabo el corrimiento, ya que de no ser así este no se realizara.

Las muestras que se almacenen no deben guardarse en el congelador, ya que de ser así, estas se hemolizaran y se verán alterados los resultados.

Se debe cuidar que los geles estén a la temperatura indicada (ambiente), y que no se sequen, pues de ser así el corrimiento no se lleva adecuadamente aunque no se ven alterados los resultados.

Se debe cuidar que el gel no sea rasgado porque se obtendrán gráficas con diversos picos y no se verá cual es el esperado de la Hemoglobina Glicosilada.

7.3 DIAGRAMA DE FLUJO



8. Diseño estadístico

Los resultados son tratados de acuerdo a las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica IFCC, sobre tratamiento estadístico de valores de referencia (62).

8.1. Recomendaciones:

1.- Para que exista una diferencia numérica pequeña que sea prácticamente insignificante es importante utilizar 100 o más valores de referencia .

2.- Realizar un muestreo simple al azar, es decir cada individuo de referencia, tiene la misma probabilidad de ser obtenido, independientemente de los demás.

3.- Es muy importante que el intervalo de referencia contenga el 95 % de la distribución.

4.- De acuerdo al tamaño de muestra en el presente trabajo se utilizó una técnica de estimación paramétrica, que además se ajusta a un modelo aproximadamente normal o gaussiana.

8.2. Procedimiento para establecer los valores de referencia:

1.- Recolectar los valores de referencia.

2.- Agrupar los datos (por edad, sexo, etc.).

3.- Graficar los valores obtenidos, con el fin de examinar el tipo de distribución y además se podrá observar el sesgo, curtosis y valores marginales.

El sesgo puede ser positivo, la distribución es asimétrica con una cola extendida a la derecha. En el sesgo negativo la cola esta extendida hacia la izquierda.

En la curtosis se observa la agudeza, es decir puede ser demasiado punteaguda, comparada con la distribución normal, puede estar combinada en la parte central con largas colas (curtosis positiva) o estar demasiado chata o aplanada, comparada con la gaussiana, pero con colas cortas (curtosis negativa).

4.- Determinación de valores marginales o valores aberrantes. Estos valores se ubican inesperadamente lejos de la mayoría de los otros valores de referencia.

Un método confiable para la identificación de posibles valores marginales, es la observación de la gráfica. Los posibles valores marginales no deben ser descartados de inmediato se debe hacer una reevaluación en cuanto a la obtención y preparación de muestras. De no ser posible su corrección se descartan.

5.- Determinación de límites de referencia.

a) Prueba para la distribución gaussiana. Graficar los valores de referencia.

b) Transformar los datos para ver si se ajusta mejor a una distribución gaussiana.

- c) Obtener la media aritmética \bar{X} y la desviación estándar SD.
- d) Estimar los fractiles o límites de referencia, en donde se encuentre en 95% de la distribución:

$$\bar{X} \pm 2 \text{ SD}$$

El análisis de correlación consiste en la medición del grado o intensidad de asociación entre dos variables sin importar cual es causa y cual es efecto. cuando se puede demostrar que la variación de una variable está de algún modo asociada con la variación de otra, entonces se puede decir que las dos variables están correlacionadas.

Correlación positiva al aumentar una aumenta la otra.

Correlación negativa cuando al aumentar una variable disminuye la otra.

Ambas son variables aleatorias.

La medida del grado de relación entre dos variables se llama coeficiente de correlación "p" X,Y varían conjuntamente en una distribución normal bivariable.

r coeficiente de determinación indica el porcentaje de la determinación de X que esta asociada con (o explicada por) la variación de Y , o biceversa. Cuando $p=0$ la distribución muestral de r sigue una distribución t con $n-2$ grados de libertad (64).

RESULTADOS

9. RESULTADOS

(Tabla 1)

Valores de HbA1c

Valor	log.	Masc.	Fem.	Total
3.0	0.4771	1	1	2
3.1	0.4913	0	1	1
3.2	0.5051	2	7	9
3.3	0.5185	2	4	6
3.4	0.5314	4	0	4
3.5	0.5441	1	2	3
3.6	0.5563	1	2	3
3.7	0.5682	4	6	10
3.8	0.5797	8	1	9
3.9	0.5910	7	8	15
4.0	0.6020	2	3	5
4.1	0.6127	3	4	7
4.2	0.6232	5	3	8
4.3	0.6334	2	1	3
4.4	0.6434	2	5	7
4.5	0.6532	3	2	5
4.6	0.6627	0	2	2
4.7	0.6720	0	6	6
4.8	0.6812	1	1	2
4.9	0.6901	2	2	4
5.0	0.6989	2	1	3
5.1	0.7075	2	2	4
5.2	0.7160	1	1	2
5.3	0.7242	1	1	2
5.4	0.7323	0	1	1
5.6	0.7481	0	1	1
Total		56	68	124

- Tabla de valores normales de HbA1c, encontrados en 124 individuos con edades de 3 a 16 años, en donde se muestran los valores naturales, sus logaritmos de estos, la frecuencia de los valores de HbA1c por sexo y los totales.

Desviación estandar y media aritmética

HbA1c	log HbA1c
$\bar{X} = 4.0919$	0.6049
SD = 0.6169	0.0639

Para considerar los intervalos de referencia se ha convenido que dichos intervalos contengan el 95 % de la distribución.

Para obtener el 75 % de la distribución:

Usando las transformaciones a logaritmos.

$$\begin{aligned} \bar{X} + SD \\ 0.6049 + 0.0639 &= 0.6688 \\ 0.6049 - 0.0639 &= 0.541 \end{aligned}$$

Sacando antilog.

$$\begin{aligned} \text{antilog } 0.541 &= 3.4753 \\ \text{antilog } 0.6688 &= 4.6644 \end{aligned}$$

Para obtener el 95 % de la distribución.

Usando las transformaciones a logaritmos.

$$\begin{aligned} \bar{X} \pm 2 SD \\ 0.6049 - 2 (0.0639) &= 0.4771 \\ 0.6049 + 2 (0.0639) &= 0.7327 \end{aligned}$$

Sacando antilog.

$$\begin{aligned} \text{antilog } 0.4771 &= 2.9998 \\ \text{antilog } 0.7327 &= 5.4038 \end{aligned}$$

Tabla No. 2

VALORES DE REFERENCIA CONTRASTADOS

	Valores encontrados
Población pediátrica mexicana encontrados en este trabajo.	3.0 - 5.4 %
Población adulta norteamericana reportados por Beckman	3.4 - 5.8 %

- Valores de referencia de HbA_{1c} de las poblaciones pediátrica mexicana determinados en 124 niños de 3 a 16 años, que se comparan con los establecidos en una población de 99 adultos norteamericanos del Estado de California (11).

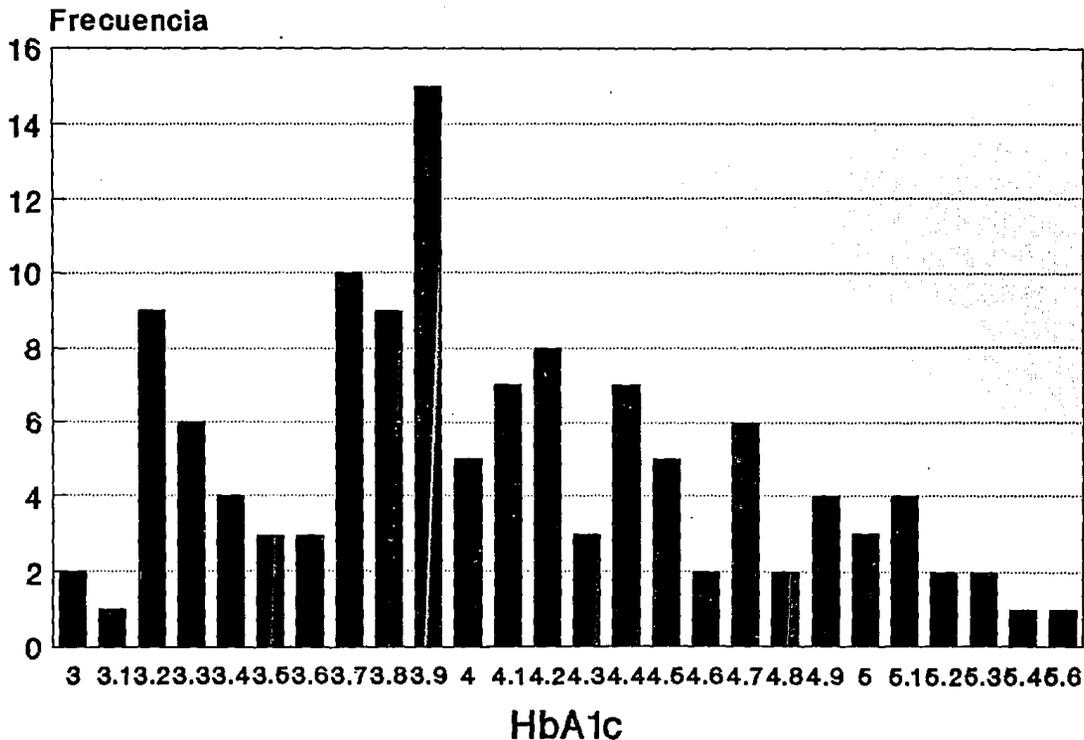
Tabla No. 3

CORRELACION DE VARIABLES

	Hb X	VS	HbA1c Y	GR X	VS	HbA1c Y	Glucosa X	VS	HbA1c Y
SDx	2.6249			0.6014			10.37		
SDy			1.06			1.06			1.06
\bar{X}	13.46			4.89			77.54		
\bar{Y}			4.08			4.08			4.08
r	0.0321			0.014			7.01XEx-3		
r ²	1.03XEx-3			0.1425			4.92XEx-5		
%	0.103			14.25			4.92XEx-3		

- Parametros importantes para la determinación del coeficiente de correlación de las variables Hb(hemoglobina) vs HbA1c, GR (globulos rojos) vs HbA1c y Glucosa vs HbA1c. El coeficiente de correlación "r" nos indica el grado de asociación entre ambas variables.

Gráfica 1. Distribución de hemoglobina glicosilada.

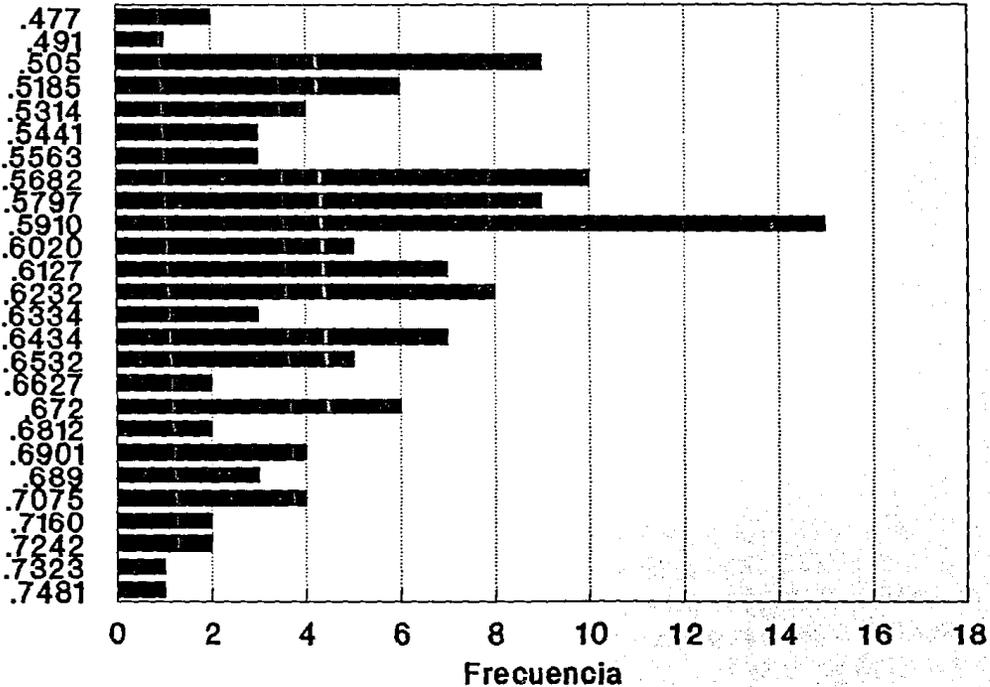


Distribución normal de los valores encontrados de HbA1c sin ninguna transformación.

Gráfica 2. Valores transformados (log) HbA1c

Log HbA1c

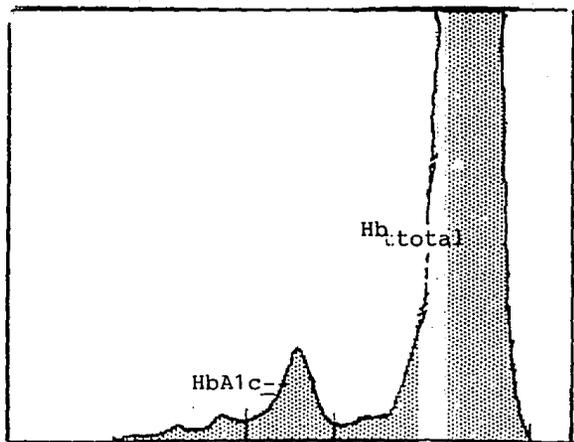
Distribución normal de los valores encontrados de HbA1c transformados a logaritmos, observándose de esta manera mejor la distribución Gaussiana.



A) CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PACIENTES NORMALES.

C.M.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

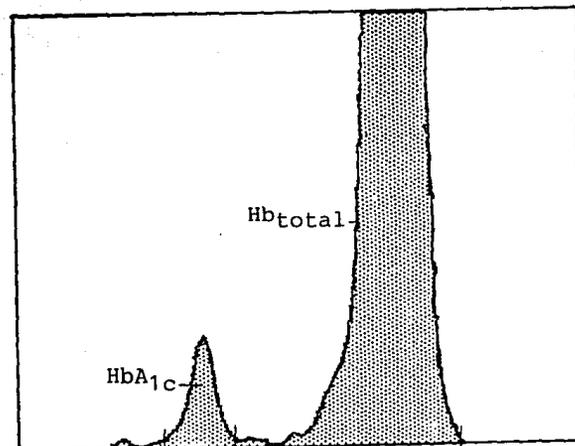
Patient: GUILLERMO GUERRERO S
Test: HbA1c Gel 1 - 2 17-JUNIO-1993
No. MUESTRA 113



Fraction	Rel%
1	4.1
2	95.9

C.M.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

Patient: ANA PATRICIA SOLIS
Test: HbA1c Gel 1 - 10 7-MAYO-1993
No. MUESTRA 80-183



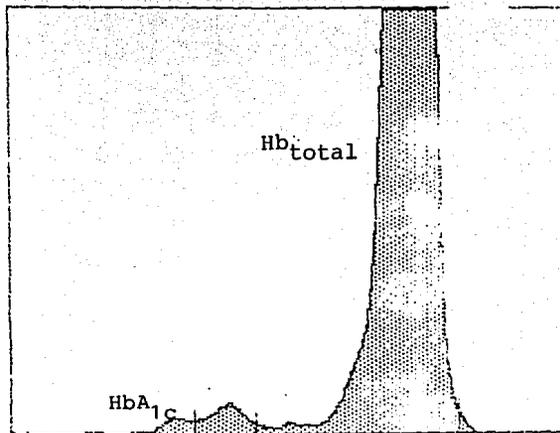
Fraction	Rel%
1	3.6
2	96.4

Gráfica de pacientes normales, el densitómetro proporciona directamente el porcentaje de las Hemoglobinas. Como se observa en las gráficas existen dos picos en este tipo de pacientes, el primero corresponde a la hemoglobina rápida o HbA1c y el más grande a la hemoglobina total.

B) CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PACIENTES CON ANEMIAS HEMOLITICAS.

I.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

Patient: PEREZ REYNOSO JOSE
Test: HbA1c Gel 1 - 9 14-MAYO-1993
No. MUESTRA 0934-7



Fraction	Rel%
1	1.6
2	98.4

Dx. Anemia Hemolítica.

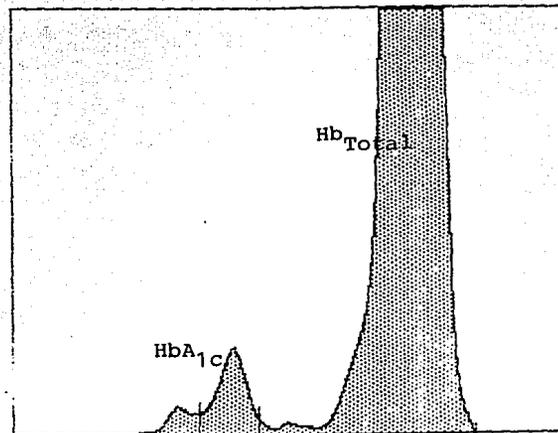
Hb= 10.8 g/dl, Hto= 33 %, CMHb= 32 g/dl

Gráfica de pacientes con anemias hemolíticas, en quienes también existen dos picos.

En el primer paciente observamos un valor muy bajo de HbA1c con valores considerables de Hb. En el segundo paciente un valor de HbA1c dentro de lo normal y con valores normales de Hb.

C.M.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

Patient: MADRIGAL GROZCO J.
Test: HbA1c Gel 1 - 2 14-MAYO-1993
No. MUESTRA 1023-13



Fraction	Rel%
1	3.0
2	97.0

Dx. Anemia Hemolítica Autoinmune.

Hb= 11.9 g/dl, Hto= 38 %, CMHb= 32 g/dl

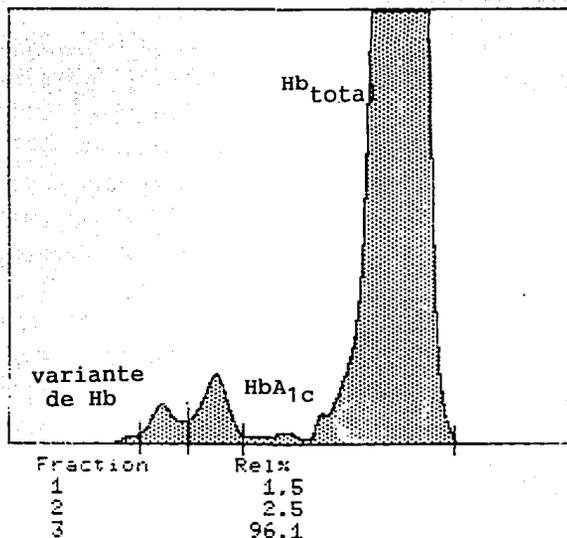
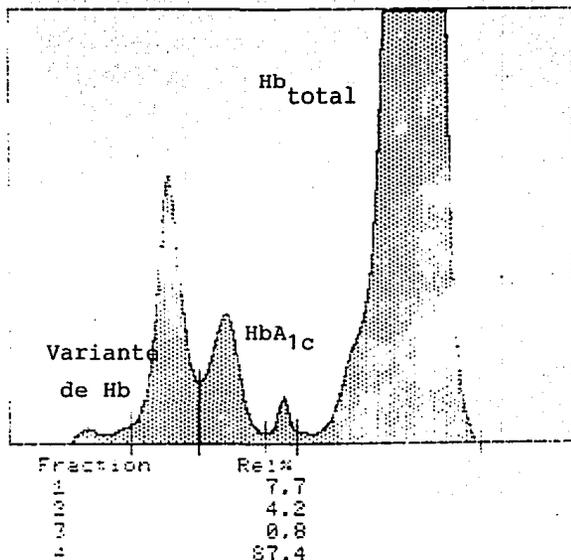
C) CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PACIENTES EN QUIENES APARECE VARIANTE DE LA HEMOGLOBINA

C.M.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

C.M.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

Patient: TORPES LOYA ART.
Test: HbA1c Gel 1 - 1 14-MAYO-1993
No.MUESTRA 1026-15

Patient: ARROYO MENDEZ JOSE
Test: HbA1c Gel 1 - 10 12-MAYO-1993
No.MUESTRA 0739



Dx. Aplasia Pura de la Médula Roja
Hb+7.9 g/dl, Hto+ 24 %, CMHb= 32 g/dl

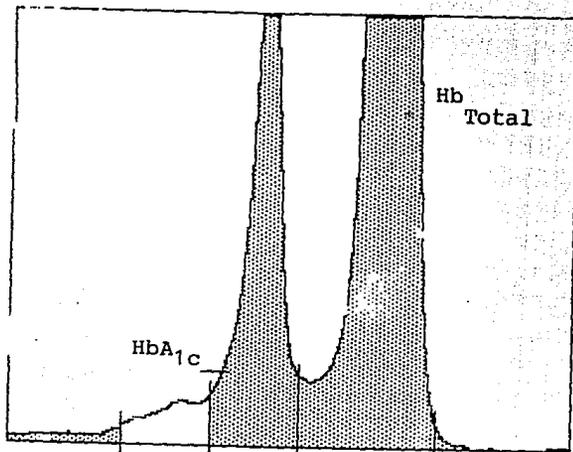
Dx. Leucemia Linfocitica Aguda.
Hb= 10.5 g/dl, Hto=35 %, CMhb=30g/dl

Gráfica de pacientes con problemas sanguíneos, en quienes aparece variante de la Hb por lo cual aparecen diversos picos, es decir el método separa a dichas variantes. En el primer paciente se muestra una alta glicosilación de las variantes, por lo que se piensa que el paciente curso con una hiperglicemia. En el segundo aparecen dos picos con valores bajos de lo normal de la HbA1c.

D) CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE PACIENTES CON "DMID".

C.M.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

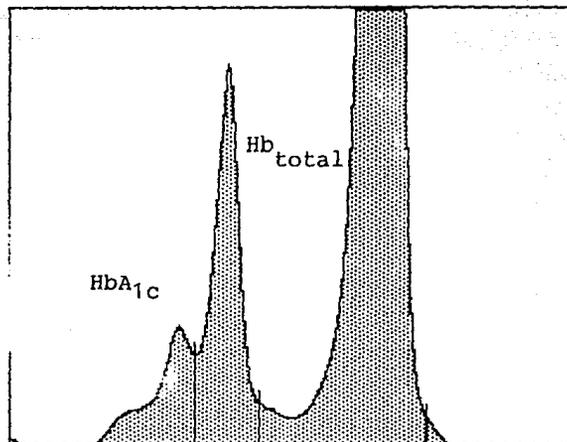
Patient: SOLIS SOTO JUAN M.
Test: HbA_{1c} Gel 1 - 7 15 ENERO 1993
No. MUESTRA 11171



Fraction	Rel%
1	18.1
2	81.9

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMR INSS
LABORATORIO CENTRAL BIOQUIMICA ESPECIAL

Patient: ELIZABETH GARFIAS U.
Test: HbA_{1c} Gel 1 - 9 24-JUNIO-1993
Folio: 9



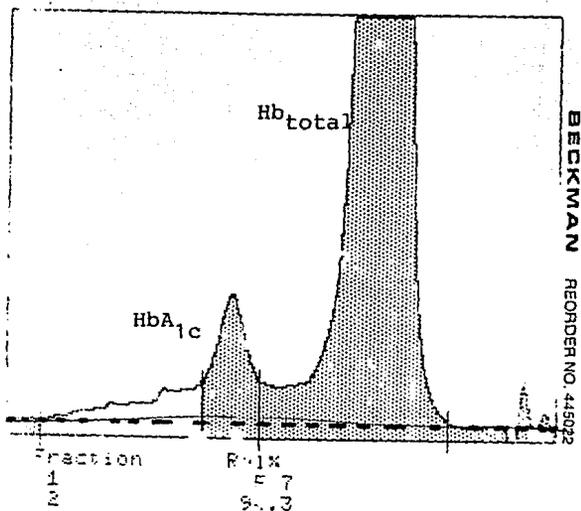
Fraction	Rel%
1	13.4 +++
2	86.6

Gráfica de pacientes pediátricos con DMID, en quienes se observa un picomuy alto de HbA_{1c}, lo que indica que están muy descompensados con el tratamiento de insulina y la dieta que están llevando, por lo que estos no son los adecuados.

E) CORRIMIENTO ELECTROFORETICO.

MAL EDITADO

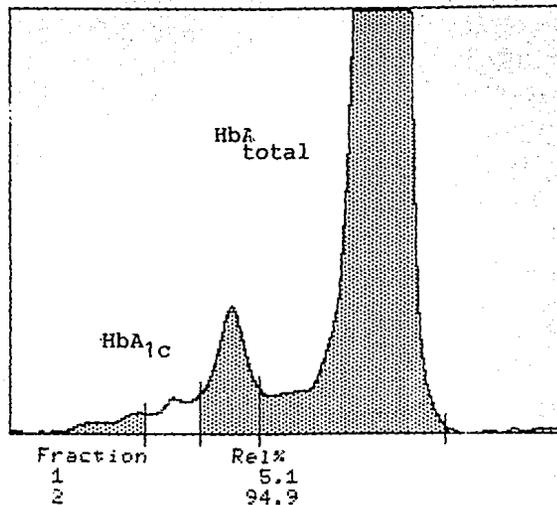
Paciente: G.M.C.R.
 Test: HbA1c Gel 1 - 2 14 Enero 93.
 No. MUESTRA : 125-3036



BIEN EDITADO

C.M.R. I.M.S.S. HOSPITAL GENERAL
 LABORATORIO CENTRAL-BIOQUIMICA

Paciente: G.M.C.R.
 Test: HbA1c Gel 1 - 3 14 Enero 93.
 No. MUESTRA : 125-3036



La línea punteada indica donde debe ser editada la gráfica.
 Como se observa existe una variación entre ambas ediciones, por lo que se debe tener cuidado en la edición para que no se alteren los resultados.

10. DISCUSION DE RESULTADOS

Como se ha mencionado anteriormente la utilidad clínica de los intervalos de referencia es dar una idea del estado biológico de los individuos a partir de un valor observado. La obtención de estos valores de referencia no es difícil una vez que han quedado bien establecidas las condiciones bajo las cuales serán determinados.

De esta manera, se obtubieron los valores de referencia de HbA_{1c} por el método de electroforesis en agarosa, en 124 individuos de una población pediátrica mexicana, los cuales fueron considerados como sanos para esta finalidad por el médico y por las evaluaciones de química sanguínea y biometría hemática que correrspondían a valores normales de estos estudios.

Según las recomendaciones de la IFCC la distribución que siguieron los resultados obtenidos (Tabla No. 1) es la de una curva gaussiana, pero como se puede observar en la grafica no. 1 los valores así graficados no son tan claros, por lo que creyó conveniente hacer la conversión a logaritmos (grafica no. 2). Como se observa existe en la curva un sesgo positivo (la cola hacia la derecha), que es compensado con el grado de curtosis que es muy agudo. Sin embargo los resultados fueron trtados como una distribución Normal.

Si observamos los valores de referencia (Tabla No. 2) de la población adulta norteamericana y los obtenidos en la población pediátrica mexicana y además, considerando que la técnica con que fueron determinados ambos valores de referencia especificada por Beckman, podemos decir que no existe una diferencia significativa entre estos que nos haga pensar que la HbA1c depende de las características individuales de cada población, por ejemplo: tipo y costumbres alimenticias (considerando que en México está es altamente rica en carbohidratos, y en los niños y adolescentes de nivel primaria y secundaria prevalece la ingesta de comida chatarra), así como también la actividad física, raza, edad y sexo.

En cuanto a los valores obtenidos de glucosa, concentración de Hemoglobina y cantidad de globulos rojos, (determinaciones hechas de un día) observamos que estadísticamente no existe ninguna relación con los valores obtenidos de la Hemoglobina glicosilada. Como se ve en la tabla no. 3 el coeficiente de relación de la glucosa con la HbA1c nos indica que no existe ninguna relación entre esta variable determinada en un día con la determinación de HbA1c ocurriendo de la misma manera con la concentración de Hb. Sin embargo observamos que en la cantidad de globulos rojos si existe un 14.25 % de relación con la HbA1c. En la bibliografía no se ha reportado nada al respecto de esta relación, se ha mencionado que la glicosilación depende de la vida media del eritrocito y que depende de la concentración de

glucosa, sin embargo aunque este no es el tema principal del trabajo no quisimos pasar por alto estos resultados y puede ser la pauta a un estudio más amplio sobre la relación que pudieran tener estas variables. Por otro lado, no podemos dar una conclusión a este respecto pues los casos de pacientes presentados fueron muy pocos. De esta manera, vemos que en el B) corrimiento electroforético de pacientes con anemia hemolítica se presenta una cantidad considerable de Hb y sin embargo se tienen valores de HbA1c bajos (Según los valores normales que se encontraron, ver A) corrimiento electroforético de pacientes normales) debido a que en la Anemia Hemolítica es importante la vida media del eritrocito. Por otro lado vemos que en otras anomalías (Ver C corrimiento electroforético de pacientes en quienes aparece variantes de la Hemoglobina) sanguíneas como la aplasia pura de la médula roja, se lleva acabo la glicosilación con la cantidad de hemoglobina presente hasta de una manera anormal, de igual forma ocurre en el caso de la leucemia. Es importante hacer mención que en estos casos no ocurre destrucción de los globulos rojos y sin embargo se tienen valores bajos de HbA1c y además existe una cantidad considerable de Hb como para que se lleve acavo la glicosilación.

Por otro, lado vemos que en los D) corrimientos electroforéticos de pacientes con DMID se muestran curvas en las que nos indican que dichos pacientes están muy descompensados y que el

tratamiento de insulina no es el adecuado aunado a que no se esta siguiendo la dieta adecuada. Lo que nos indica hiperglicemias prolongadas. En cuanto a estos pacientes se pueden hacer otros estudios como es el evaluar el control metabolico con una dieta establecida, ver que tanto pueden ser aumentados los valores normales en pacientes pediatricos con este padecimiento, etc.

Algo muy importante que se debe de tomar en cuenta en este método es la forma de editar las graficas (ver E) corrimiento electroforético) en el densitómetro y solamente tomar en cuenta la línea base que nos indique un área bajo la curva, ya que de otra manera si se verán afectados los valores de referencia.

Cabe mencionar que algunos de estos pacientes presentaron hemoglobopatias, las cuales no interfirieron en el valor de la HbA1c, ya que fueron separadas y cuantificadas por el metodo de electroforesis, esta característica puede ser empleada también como una técnica de recurso para determinar la existencia de este tipo de anomalías.

11. CONCLUSION

Quedaron determinados los valores de referencia de HbA1c (3.0-5.4 %) de una población pediátrica mexicana con edades entre los 3 y los 16 años de edad, en ambos sexos por el método de electroforesis en agarosa el cual presenta ventajas de tiempo y precisión y será implementado como método de rutina en el Laboratorio del Hospital General Centro Médico la Raza.

Se concluye que los valores de HbA1c no dependen de las características particulares de cada población, al no encontrar diferencias significativas entre los valores de referencia de la población pediátrica mexicana y la población adulta norteamericana. Y se piensa que es un proceso puramente metabólico.

Por otra parte estos valores de referencia serán de gran ayuda en el monitoreo de pacientes pediátricos con Diabetes Mellitus, que requieren de un control seguro y estricto que proporciona la determinación de HbA1c y que no lo presenta una sola determinación de glucosa en ayunas. Además, el contar con los valores de referencia se dará la pauta a continuar con estudios relacionados al control metabólico.

12. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Jinich H "Ciencia, Tecnología y Humanismo en Medicina". Gaceta Médica de México 1990; 26: 481-486.
- 2.- Jovanovic L Peterson CM "The Clinical Utility of Glycosylated Hemoglobin" Ame J Med 1981; 70: 331-338.
- 3.- Christenson RH "Diatrac Glycated Hemoglobin A1c Test Clinical and Laboratory value" Paragon Beckman Instruments U.S.A. 1991;EP-11: 1-12.
- 4.- Gabbay KH, Hasty K, Breslow JL, Ellison RC, Buun HF, Gallop PM "Glycosylated Hemoglobins and Long-Term Blood Glucose Control in Diabetes Mellitus" J Clin Endocrinol Metab 1977; 44: 859-864.
- 5.- King ME "Hemoglobina Glicosilada" En: Kaplan Química Clínica Métodos. Buenos Aires Argentina. Ed Médica Panamericana, 1990: 129-133.
- 6.- Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM "The Biosynthesis of Human Hemoglobin A1c (slow Glycosylation of Hemoglobin in vivo)" J Clin Inves 1976; 57: 1652-1659.
- 7.- Mc Gilvery RW, Golstein GW "Bioquímica, aplicaciones clínicas" Ed. interamericana, México D.F. 1986; 283,284,289-292.

- 8.- PetitClerc C, Solberg HE "Selección de individuos para la producción de valores de referencia" (IFCC) parte 2. Acta Bioq Clin Latinoamer 1988; 22: 443-450
- 9.- Solberg HM "Conceptos de valores de referencia" (IFCC) parte 1 Acta Bioq Clin Latinoamer 1986; 20: 485-492.
- 10.- Solberg HE, PetitClerc C "Preparación de individuos y obtención de especímenes para la producción de valores de referencia" (IFCC) parte 3. Acta Bioq Clin Latinoamer 1988; 22: 603-620.
- 11.- Paragon Diatrac HbA1c Glicohemoblobin Electroforesis Kit. Beckman Instructions U.S.A. 1991: 62,63.
- 12.- Krall LP "Manual de Diabetes Joslin" México D.F. Ed. Continental 1983:2-43, 202-213.
- 13.- Leninger AL "Bioquímica" 2a edición Ed. Ediciones Omega Espana Barcelona 1979: 148-153.
- 14.- Greenspan FS y Forsham PH "Endocrinología Básica y Clínica" México D.F. 2a Edición Ed. El Manual Moderno 1988.
- 15.- Drash AL "Clinical Care of the Diabetic Child" U.S.A. Ed Year Bokk Medical Publishers 1987: 1-21.
- 16.- Wilson JD, Braunwal E et al. "Harrison Principios de Medicina Interna" México D.F. 12a edición. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. 1991; 2018-2030.

17.- Vazquez C, Gutierrez G "Diabetes Mellitus:progresos recientes en el conocimiento de su etiopatogenia y en su clasificación " Rev Med IMSS 1983; 21: 97-103.

18.- Simon D, Corgnet MC, Thibult N, Senan C, Eschwecer E "Comparison of Glycosylated Hemoglobin and Fasting Plasma Glucose with two-hour post-load plasma glucose in the Detection of Diabetes Mellitus" Ame J Epidemiology 1985; 122: 589-593.

19.- Abrew LM "Introducción a la Medicina Interna" Ed. Mendez Cervantes, México D.F. 1989.

20.- La Parte RE, Toumilehto J, King H "WHO multinational project for childhood diabetes" Diabetes Care 1990; 13: 1062-1068.

21.- Sartor G, Nystrom L, Dahquist G "The swedish childhood Diabetes study: A seven-fold decrease in short-term mortality?" Diabetic Med 1991; 8: 1821.

22.- Roe TF, Castin G, Kaufman F R , Carsol M E "Blood glucose Controland albumunuria in type I Diabetes Mellitus" J Pediatr 1991; 119: 178-181.

23.- Daneman D, Frank M, Perlman K etal. "Severe hypoglycemia in children with insulin-dependent- Diabetes mellitus: frequency and predisposig factors" J Pediatr 1989; 115: 681-685.

- 24.- Egger M, Gschwend S, Smith GD, Zuppinger Klaus "Increasing incidence of Hypoglycemic coma in children with IDDM" Diabetes Care 1991; 14: 1001-1005.
- 25.- Zeller J, Bougners P "Hypoglycemia in infants" Trends Endocrinol Metab 1992; 3: 366-370.
- 26.- Holtop PC "The frequency of hypoglycemia in full-term large and small for gestacional age mewborns" Am J Perinatol 1993; 10: 150-154.
- 27.- Wasserman D, Amilai Y "Hypoglycemia follonwing albuterol overdose in child" Am J Emerg Med 1992; 10: 556-557.
- 28.- Leslie RDG, Lo S, Millword BA, etal. "Decreased growth velocity before IDDM onset" Diabetes 1991; 40: 211-216.
- 29.- Wise JE, Kolb EL, Sauder SE "Effect of glycemc control on growth velocity in children with IDDM" Diabetes Care 1992; 15: 826-830.
- 30.- Price DE, Burden A "Growth of children before onset of diabetes" Diabetes Care 1992; 15: 1393-1395.
- 31.- Novales CXJ, Amalo MJD "Sistema Linfohemático" ENEP Izta-cala Edo. de México 1989: 84-87.
- 32.- Herrera E "Bioquímica" Ed. Interamericana México D.F. 1986: 737-745.

ESTE TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 33.- Montoporek M "Bioquímica" 3a edición Ed. Interamericana México D.F. 1985: 282-285.
- 34.- Borel JP, Randoux A, Maquart FX, Le Peuch Ch, Valeyre J "Bioquímica Dinámica" Ed. Panamericana Argentina Buenos Aires 1989; 175-177.
- 35.- Rodríguez BA "Hemoglobina Glicosilada, Interés Clínico, fundamento, técnicas de cuantificación y separación en columna" Seminario de patología Clínica CMN IMSS 1985.
- 36.- Instructivo de técnicas GlycoHb Quik column. de Helena Laboratories.
- 37.- Austin GE, Mullins RH, Morin LG "Non-enzymic Glycation of individual plasma proteins in Normoglycemic and Hyperglycemic patients" Clin Chem 1987; 33: 2220-2224.
- 38.- Demetriou JA "Proteínas glucosiladas (albúmina y proteína total)" En: Kaplan Química Clínica Métodos. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina 1990: 134-140.
- 39.- Ladenson JM, Chan KM "Glycated Hemoglobin and Diabetes: A Case and an overview of the subject" Clin Chem 1985; 31: 1060-1067.
- 40.- Nathan DM, Avezzano ES, Palmer JL "A Rapid Chemical Means for removing labile Glycohemoglobin" Diabetes 1981; 30: 700-701.

- 41.- Bunn MF "Evaluation of Glycosylated Hemoglobin Diabetic Patients" Diabetes 1981; 30: 613-616.
- 42.- Joaquin CF "Hematología-Casos Clínicos". Ed Interamericana Mc Graw Hill, México D.F. 1992: 12-15, 61-64.
- 43.- Simon M, Cuan J "Hemoglobin A1c by Isoelectric focusing" Clin. Chem. 1982; 28: 9-12.
- 44.- Diabinese (Clorpropamide) "Hemoglobin A1c: New method of measuring integrated glucose values over time" Diabetes 1992.
- 45.- Schmidt LE, Klover RV, Arfken CL et al. "Compliance with dietary prescriptions in children and adolescents with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus" J Am Diet Assoc 1992; 92: 567-570.
- 46.- Adegbenro SA, Dada OA, Olanrewaju DM, Fafunso MA "Glycosylated hemoglobin levels in children with protein-energy malnutrition" Ann Trop Pediatr 1991;11: 337-341.
- 47.- Peveler RC, Farburn CG, Boller J, Dunger D "Eating disorders in adolescents with IDDM: A controlled Study". Diabetes Care 1992;15: 1356-1360.
- 48.- Bougneres PF, Landais P, Mairesse AM et al. "Improvement of diabetic control and acceptability of a three-injection insulin regimen in diabetic adolescents: A multi center controlled study". Diabetes Care 1993;16: 94-102.

49.- Veijola R, Knip M, Risteli L etal. "Clinical characteristics and circulating collagen and laminin metabolites in insulin-dependent diabetic children with joint and skin manifestations". Pediatr Res 1993; 33: 501-505.

50.- KJaergaard JJ, Ditzel J "Hemoglobin A1c as an Index of Long-term blood glucose regulation in diabetic pregnancy". Diabetes 1979; 28:694-696.

51.- Dods RF, Bolmey C "Glycosilated Hemoglobin assay and oral Glucose Tolerance Test Compared for Detection of Diabetes Mellitus". Clin Chem 1979; 25: 764-768.

52.- Penaloza R "Método Cromatografico para la determinación de Hemoglobina glucosilada en forma de rutina". Rev Mex Patol Clin 1985; 32: 135-137.

53.- Kaplan LA, Cline D, Gartside P, Bustein S, Sperling M Stein EA "Hemoglobin A1c in Hemosylates from Healthy and insulin-Dependent Diabetic children, as determined with a temperature-controlled mini colum assay". Clin Chem 1982; 28: 13-18.

54.- Mullins RE, Austin GE "Sensitivity of Isoelectric Focusing, Ion Exchange, and Affinity chromatography to labile Glicosilated Hemoglobin". Ciln Chem 1986; 32: 1460-1463

55.- Degg R, Schmilt U, Rollinger W, Ziegenhorn J "A new approach to Photometry of Glycated Hemoglobin in HUMAN blood". Clin Chem 1984; 30: 790-793.

56.- Nathan DM, Duun BS, Francis TB "Two Commercial Methods Evaluated for Eliminating the labile fraction from the assay for glycated Hemoglobin (Glycohemoglobin)". Clin Chem 1984; 30: 109-110.

57.- Little RR, England JD, Wiedmeyer HM, Goldstein DE "Effects of whole Blood Storage on results for Glycosylated Hemoglobin as Measured by Ion-Exchange, Cromatography, Affinity Chromatography, and Colorimetry"Clin Chem 1983; 29: 1113-1115.

58.- Bruns DE, Lobo PI, Svory J, Wills MR "Specific Affinity-Chromatographyc Measurement of Glycated Hemoglobins in Uremic Patients". Clin Chem 1984; 30: 569-571.

59.- Shoos R, Schoos-Barbette S, Lambotte C Dosage of hemoglobin A1c by Isoelectrofocusing". Clin Chem Acta. 1978; 86: 61-65.

60.- Aguzzi F ,Merlini G "Aspectos clinicos del Analisis de las proteinas plasmáticas". Beckman Instruments. Espana S.A. 1-10.

61.- Valcarcel M, Gomez Hens A "Técnicas Analíticas de separación"Ed. Reverte Espana, Barcelona 1988:109-146.

62.- Solberg HE "Tratamiento estadístico de valores de Referencia obtenidos. determinación de límites de Referencia". parte 5 (IFCC). Acta bioq Clin Latinoam 1988; 22: 453-471.

63.- Camedo DL Investigación Clínica" Ed Interamericana, México 1987.

64.- Marquez MJ "Probabilidad y estadística". ENEP Zaragoza, México D.F.