



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“HEMOGLOBINA GLICOSILADA COMO
MARCADOR Y SU UTILIDAD CLÍNICA EN EL
CONTROL DE PACIENTES CON DIABETES
MELLITUS “**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

JUAN ANTONIO CHÁVEZ FLORES

ASESORA:

DRA. GILDA FLORES ROSALES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2009



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 esta 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
AV. PUEBLA 18
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Hemoglobina glicosilada como marcador y su utilidad clínica en el control de pacientes con diabetes mellitus.

que presenta el pasante: Juan Antonio Chávez Flores

con número de cuenta: 40400636-7 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Septiembre de 2009

PRESIDENTE	Dra. Gilda Flores Rosales	
VOCAL	MC. Ma. Esther Revuelta Miranda	
SECRETARIO	MC. Francisco López Mejía	
PRIMER SUPLENTE	QFB. René Damián Santos	
SEGUNDO SUPLENTE	MC. Gloria Leticia Arellano Martínez	

ESTE TRABAJO LO DEDICO:

A DIOS

Que ha sido mi creador, mi maestro y guía.

A MIS PADRES

**PETRA FLORES MONTAÑO
PEDRO CHÁVEZ NAVARRETE**

Por que este triunfo también es suyo, por todo el amor y esfuerzo que me han ofrecido, por el tiempo que me han dedicado, por su apoyo, sus consejos, su paciencia y sobre todo por confiar y creer en mí.

A MI HERMANA

BEATRIZ CHÁVEZ FLORES

Por todos los momentos buenos y malos de nuestras vidas, por sus consejos y paciencia.

A

JUAN PABLO BAUTISTA CHÁVEZ, A JAIRO Y MITZI

Quienes le han dado un nuevo sabor a mi vida, y de quienes he recibido apoyo y cariño.

A MIS ABUELITOS

Con los cuales, pase momentos muy agradables durante mi infancia. Tres de ellos ya no están en este mundo pero siempre vivirán en mis pensamientos.

A

YOLANDA PEREZ AVENDAÑO

Por todo el apoyo incondicional que me ha brindado, por su compañía y amor.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por permitirme ser parte de su creación, por acompañarme en cada momento, permitirme vivir la alegría de terminar con esta faceta de mi vida y por prestarme a los dos ángeles que me guían en el mundo y que son mis padres.

“Tu señor, sabes bien
lo que yo tengo guardado en mi interior,
todo aquello que me aturde,
lo que no puedo olvidar,
esas cosas que no dejan caminar.

Tu señor, hasta hoy
me has seguido en cada parte de mi vida
y me has dado grandes cosas

que no puedo olvidar,
los momentos que en mi vida quedaran.

Por eso ven señor, que te quiero hoy decir
que mis ojos se han abierto y que sin ti no
puedo mas vivir.

Ven señor que ahora tengo el corazón
con un grito que me pide tu amor”.

AMIS PADRES

A quienes amo con todo mi corazón y a los cuales jamás encontraré la forma de agradecer su amor, comprensión y apoyo brindados en las derrotas y logros obtenidos, a ellos que me han enseñado el valor de la vida y el verdadero significado de la palabra AMOR, a quienes me han entregado hasta SU VIDA misma para que yo sea feliz. Los AMO papás.

A ti mamá que me has enseñado que ante las derrotas no nos queda mas que levantarnos con mayor fuerza, que me has enseñado a luchar por mis objetivos y dar mi mayor esfuerzo para ello.

A ti papá del que he aprendido mucho como hombre y del que tengo una gran admiración y que en conjunto con mi mamá te has esforzado por darme lo mejor de tu vida a mi y a tu familia.

A BETTY

A ti tampoco tengo como agradecerte, por todo tú tiempo dedicado a mi.
Te agradezco hermanita por todos los momentos buenos y malos a mi lado, de todos ellos he aprendido mucho, por todo el apoyo me has brindado incondicionalmente. Te amo.

A JUAN

Por la fortuna de haberte conocido, por tus palabras de aliento en momentos difíciles de mi vida, y por brindarme tu amistad y cariño

A JAIRO Y MITZI

Gracias niños por todo su cariño, apoyo y compañía
Ustedes son uno de los mejores regalos que me ha dado Dios.
Nunca olviden sus sueños y siempre luchen por que sean una realidad.

A YOLANDA

Por ser un pilar importantísimo en mi vida.
Este tiempo a tu lado ha sido fabuloso y recuerda que no es necesario recorrer todo el mundo ni conocer mucha gente, para saber que tú eres la persona más maravillosa y el amor de mi vida.

Agradezco a los directivos de la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO** y de la **FES CUAUTITLAN C-1** por brindarme el privilegio de formar parte esta institución donde adquirí conocimientos, principios y valores los cuales me servirán para mi superación personal y profesional.

Doy un agradecimiento muy especial a la **DRA. GILDA FLORES ROSALES**, por todo el apoyo que me ofreció, por sus consejos, por su tiempo, por su conocimiento y principalmente por su confianza.

Gracias Dra. por creer en mí, y darme ese empujoncito que necesite a lo largo de estos años en la universidad; en verdad la admiro y respeto.

Gracias por permitirme realizar este sueño, ser profesionista útil a la sociedad espero no llegar a defraudarla y sepa que la quiero mucho.

Agradezco **A TODOS Y CADA UNO DE MIS PROFESORES** desde el nivel preescolar hasta la licenciatura, ellos también formaron parte de mi vida. Seria difícil nombrarlos pero todos y cada uno están presentes en mis pensamientos, por que sin ellos no estaría hasta esta etapa. De ellos aprendí valores, experiencias, modos de vivir, hice grandes amistades y cada uno dejó en mí una grandísima herencia de conocimientos, recuerdos y emociones.

Agradezco a las Químicas **BEATRIZ VEGA DELGADILLO** y **SELENE BELTRAN** quienes fueron mis principales apoyos dentro del ambiente laboral y con las cuales aprendí a desenvolverme y trabajar con respeto y amor en la profesión. Muchas gracias Químicas por todo su apoyo, sus consejos, su dedicación, paciencia y también por creer que si podía hacerlo.
Muchas gracias.

Agradezco a **MIS SINODALES**, por su valiosa y desinteresada participación en la revisión de este trabajo.

Agradezco también **A TODOS MIS AMIGOS**, que afortunadamente son muchos y que quisiera nombrar a cada uno pero ustedes saben bien quienes son, son ustedes que conocen de mí como yo conozco aspectos suyos, ustedes que han compartido conmigo diversas emociones, que comparten mis secretos, que conocen a mi familia, que han estado conmigo en las buenas y en las no tan buenas, a ustedes muchas gracias por que de alguna manera han contribuido para mi formación académica y profesional.

ÍNDICE

	PAG
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	6
OBJETIVO	9
CAPÍTULO 1. DIABETES MELLITUS	
1.1 Definición y generalidades	10
1.1.1 Mecanismo de secreción de la insulina	13
1.1.2 Mecanismo de acción de la insulina	15
1.2 Clasificación	16
1.3 Factores de riesgo	23
1.4 Etiología	26
1.4.1 Diabetes tipo 1	26
1.4.2 Diabetes tipo 2	30
1.4.3 Otros tipos específicos de diabetes	32
1.4.4 Diabetes gestacional	32
1.5 Complicaciones	33
1.5.1 Agudas	33
1.5.2 Crónicas	34
1.5.3 Otras complicaciones en la diabetes	35
1.6 Tratamiento	36
1.7 Control	37
1.8 Pruebas de diagnóstico (métodos de evaluación del control diabético)	39
1.8.1 Pruebas de glucosa sanguínea	40
1.8.2 Otras determinaciones importantes	44

CAPÍTULO 2. HEMOGLOBINA

2.1 Generalidades	48
2.2 Función	49
2.3 Tipos de hemoglobina	49
2.3.1 Tipos de hemoglobina normal	49
2.3.2 Formas derivadas de la hemoglobina	53
2.3.3 Formas variadas de la hemoglobina	54
2.4 Glicosilación de la hemoglobina	55
2.5 Importancia clínica de la determinación de hemoglobina glicosilada	65

CAPÍTULO 3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA

3.1 Generalidades	80
3.2 Estandarización de métodos	84
3.3 Metodología	91
3.3.1 Procesamiento de la muestra	93
3.3.2 Métodos por separación de carga	94
A. Electroforesis	95
B. Enfoque isoelectrico (IEF)	97
C. Cromatografía de columna de intercambio iónico	99
C.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por Intercambio Catiónico	101
C.2 Mini o micro columna de intercambio iónico	104
3.3.3 Métodos por afinidad	106
A. Captura iónica	107
B. Cromatografía por afinidad	109
B.1 Cromatografía líquida de alta resolución por columnas de afinidad	111
B.2 Mini o micro columnas de afinidad	114

3.3.4 Inmunoensayos	115
A. Inmunoaglutinación en látex	117
B. Turbidimétrico de inmunoinhibición	118
3.3.5 Otros métodos utilizados	120
CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN	123
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	136

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAG.
FIGURA 1. Imagen representativa del páncreas	11
FIGURA 2. Composición anatómica del páncreas y su producción de hormonas	12
FIGURA 3. Niveles de insulina durante la ingesta de alimentos	14
FIGURA 4. Curva de tolerancia promedio después de la ingestión de glucosa	42
FIGURA 5. Diferentes niveles estructurales de uniones moleculares en la hemoglobina	48
FIGURA 6. Hemoglobinas humanas	51
FIGURA 7. Recromatografía de la zona A1, obtenido en los trabajos de Allen	57
FIGURA 8. Componentes de la hemoglobina humana de individuos sanos	59
FIGURA 9. Los tres pasos de la reacción de glicación no enzimática	61
FIGURA 10. Hemoglobina glicosilada en la porción N-Terminal de la cadena β	63
FIGURA 11. Reacción de glicosilación de la hemoglobina	64
FIGURA 12. Sensibilidad y especificidad de la glicemia venosa en ayunas y la Hb A1c en detectar mal control metabólico	67
FIGURA 13. Relación de HbA1c y riesgo de complicaciones microvasculares	68
FIGURA 14. Medida de nivel de riesgo conforme al porcentaje de HbA1c.	68
FIGURA 15. Relación entre niveles de glucemia y hemoglobina glicosilada	74
FIGURA 16. Modelo de un Isoelectroenfoque de un hemolizado normal	98
FIGURA 17. Cromatograma de HPLC Diamat. Muestra de una persona con diabetes.	101

FIGURA 18.	Esquema de preparación del agente de afinidad polianionica	111
FIGURA 19.	Principio de separación del ensayo de Hemoglobina glicosilada	112
FIGURA 20.	(a) cromatograma en tiempo real (gráfico de tiempo vs. Absorbancia); (b) software y equipo utilizado en HPLC de afinidad	113
FIGURA 21.	Esquema que muestra la metodología por inmunoensayo	116
FIGURA 22.	Esquema de la reacción química de inmunoinhibición	118
FIGURA 23.	Mecanismo de la señal electroquímica en la hemoglobina	121
FIGURA 24.	Esquema del proceso de medición del %HbA1c en el trabajo de Sang	121
FIGURA 25.	Diagrama esquemático de un chip en sistema de inmunoensayo de flujo electroquímico	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Efectos de la insulina en el organismo	15
Tabla 2.	Clasificación de la diabetes mellitus	17
Tabla 3.	Factores de riesgo para diabetes mellitus	23
Tabla 4.	Comparación de las definiciones clínicas actuales del síndrome metabólico	25
Tabla 5.	Criterios del Comité Experto en Diabetes para la valoración de la prueba estándar de tolerancia a la glucosa oral	43
Tabla 6.	Composición y proporción de las hemoglobinas humanas	50
Tabla 7.	Estructura de las hemoglobinas y glicohemoglobinas	58
Tabla 8.	Promedio y desviación estándar de superóxido dismutasa (SOD), y de glutatión peroxidasa (GPx) de pacientes sanos	70
Tabla 9.	Valores de referencia establecidos por algunas organizaciones	75
Tabla 10.	Métodos que han recibido la certificación de estandarización con respecto al método de DCCT/Goldstein BioRex 70 en 1998	86
Tabla 11.	Efectos de frecuencia encontrados en las variantes de Hb y los derivados de la hemoglobina, en la medición de hemoglobina glicosilada	90

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un padecimiento crónico que se caracteriza por una alteración en el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos. Se manifiesta principalmente como hiperglucemia a consecuencia de una deficiencia absoluta de insulina o de una resistencia tisular a su acción (Islas, 2002; Aschner, 2006; Gardner, 2008). Es un síndrome que implica una serie de complicaciones metabólicas a largo plazo que afectan la mayor parte de aparatos y sistemas, constituyendo una de las principales causas de invalidez y mortalidad prematura en la mayoría de los países desarrollados, aparte de afectar a la calidad de vida de las personas enfermas (Islas, 2002; Ceballos, 2005; Alpizar, 2001; Gardner, 2008).

El médico alejandrino Demetrio de Apamaia, en el siglo I a. C., utilizó por primera ocasión el término diabetes (Figueroa, 2003). Más tarde, en el siglo II de nuestro tiempo, Areteo de Capadocia lo popularizó entre los médicos. Desde 1794 Johan Peter Frank, define dos tipos de diabetes, a la que tiene excreción de azúcar le llamó mellitus, y a la que no se acompaña de salida anormal de azúcar le denominó insípida, debido a su frecuencia y gravedad, los médicos se dirigieron a estudiar la diabetes mellitus; en años subsiguientes se planteo una nueva clasificación en donde se colocaban en un eslabón de esta, los distintos casos que surgían, de acuerdo a sus características (Figueroa, 2003).

En el año de 1997, se estableció una nueva clasificación que sigue vigente actualmente considerando cuatro grupos de diabéticos: Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), otros tipos específicos de diabetes y diabetes mellitus gestacional. Por su magnitud y trascendencia, las diabetes mellitus tipo 1 y 2, son las más importantes, principalmente la tipo 2, que representa aproximadamente 90% de todas las formas clínicas y constituye un importante problema de salud pública, tanto a nivel internacional como nacional e institucional (Alpizar, 2001).

Uno de los principales peligros de la diabetes es su avance silencioso, ya que puede ser asintomática en etapas iniciales y cursar durante lapsos variables en forma inadvertida. Aproximadamente 30 a 50% de los enfermos desconoce su enfermedad, ya sea porque efectivamente se encuentran asintomáticos o porque sus signos y síntomas no han sido identificados como tales, por lo que se debe tratar de identificar a esos sujetos en una etapa más temprana para poder ofrecer una terapia más fisiológica y menos agresiva (Alpizar, 2001).

El control y tratamiento adecuado, así como la prevención, deberán convertirse en pilares que eviten el desarrollo de las complicaciones; las cuales se cree que se deben principalmente a la hiperglucemia a través de dos mecanismos: 1) La alteración del metabolismo de los polioles (metabolismo de la glucosa a sorbitol) y 2) la glicosilación no enzimática de las proteínas, sobre todo albúmina, colágeno, LDL y hemoglobina (Pfreundschuch, 2002).

La medición de los productos surgidos de la reacción de glicosilación no enzimática tiene un doble significado, por un lado medir los productos tempranos de glicosilación dependientes de la vida media de las proteínas glicosiladas las cuales son medidas y proporcionan una estimación de su exposición a la glucosa y de alguna manera el control metabólico previo; por otro lado también medir los intermediarios y productos finales de esta reacción que es un instrumento importante en la verificación y relación entre los productos de glicosilación y las modificaciones tisulares, aclarando la patogénesis de las complicaciones crónicas y la asociación de la exposición a la glucosa y su desarrollo (Lapolla, 2005).

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular, que esta presente en altas concentraciones en los glóbulos rojos y se encarga del transporte de O₂ del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos; por su parte los eritrocitos tienen como función transportar a la hemoglobina (Peñuela, 2005; Turgeon, 2006; Brandan, 2008). En individuos normales, 97% de la hemoglobina es Hb A; aproximadamente 2% de Hb A₂; y 1% de hemoglobina fetal (HbF) (Mayer, 1998).

Una fracción de la hemoglobina A normal (HbA0) es la hemoglobina A1. Esta fracción puede denominarse hemoglobina glicosilada e incluye las fracciones separadas de hemoglobina A1a, A1b y A1c; esta última tiene la característica de tener una unión con la glucosa mucho más fija y específica (Antuña, 1995). Se refiere como hemoglobina glicada a toda las especies de hemoglobina derivadas de la reacción de un carbohidrato con la valina o lisina terminal de la cadena alfa o beta de la globina (Lapolla, 2005). Aproximadamente un 5% de la Hb A sufre esta glicosilación post-traduccional y de esta manera las hemoglobinas glicosiladas se han designado como HbA1a (<1%) HbA1b (<2%) y Hb A1c (3%) (Henry, 2007).

La glucosa reacciona con el grupo amino libre de la hemoglobina para formar un compuesto inestable aldimina llamada base de Schiff. A través de un rearrreglo esta base proporciona una cetoamina estable el llamado producto de Amadori. Debido a que esta reacción no requiere la participación de enzimas, las variables por la cual se regula *in vivo* son: la concentración de glucosa y hemoglobina, el tiempo de vida media de la hemoglobina, la reactividad en términos de grupos aminos libres y la permeabilidad celular a la glucosa. En condiciones *in vivo* el producto de Amadori alcanza su equilibrio después de aproximadamente 15-20 días, a través de enlaces irreversibles acumulados tanto en proteínas de corta vida como de larga vida (Lapolla, 2005).

Teniendo en cuenta el promedio de vida del eritrocito, aquellos que estén entre 30 y 90 días de vida son los que van a predominar y como la glicosilación depende de la concentración integrada de la glucosa en el tiempo, la información que proporciona la medición de la hemoglobina glicosilada es el valor integrado de las ocho semanas precedentes a la toma de la muestra (Islas, 2002). Numerosos estudios han demostrado que los niveles de Hb glicosilada son proporcionales a los valores de glucosa en el eritrocito (Mayer, 1998), y por tanto la concentración de hemoglobina glicosilada es un reflejo exacto del nivel sanguíneo de glucosa del paciente en las semanas previas (Turgeon, 2006).

Durante mucho tiempo, las determinaciones de glucemia, bien sea venosa o capilar, fueron las únicas técnicas empleadas para el control del paciente diabético. En las últimas dos décadas, la comprensión de la naturaleza e importancia clínica de la unión no enzimática entre carbohidratos y proteínas o glicosilación, se ha incrementado. La medición de las hemoglobinas glicosiladas o glicadas se ha convertido en la herramienta más importante para el monitoreo a largo plazo del control diabético (Barrón, 2000).

La concentración de hemoglobina A1 es de 3 a 6% en las personas normales y de 6 a 12% en los diabéticos dependientes y no dependientes de insulina (Turgeon, 2006). Esta evaluación, tiene una clara ventaja sobre el análisis directo de la glucosa debido a que la medición de hemoglobina glicosilada está libre de las amplias fluctuaciones que se observan durante el análisis de glucosa en sangre. Estas variaciones dependen de diversos factores como el momento del día, el consumo de alimentos y la actividad física (Hemoglobina glicosilada en: www.rochediagnostics.com).

La hemoglobina glicosilada fue observada por primera vez por Allen y colaboradores en 1958. Sin embargo la importancia de esta prueba en el control de la diabetes fue reconocida hasta 1986, cuando la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomendó el uso de dos medidas anuales de hemoglobina glicosilada para realizar el seguimiento de la patología. En el año 1993 se presentaron los resultados de un trabajo conocido como Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes (Diabetes Control and Complications Trial o DCCT). En esta investigación se observó por primera vez que la reducción en el valor de la hemoglobina glicosilada estaba asociada con una disminución en el riesgo de desarrollar complicaciones de la diabetes a largo plazo (Hemoglobina glicosilada: www.rochediagnostics.com). La comparación de los valores de hemoglobina glicosilada con los valores de determinaciones de glucosa en sangre o suero ayudan en gran medida al adecuado control y posible mejora de pacientes diabéticos, y ninguna desplaza a la otra, mas bien se complementan.

La HbA1c es la mejor prueba disponible que refleja el control glucémico del paciente diabético, además ha permitido estratificar a los pacientes en categorías de riesgo para desarrollar complicaciones microvasculares. También ayuda a intensificar a tiempo la terapia de control de la DM (control glucémico), así como a identificar los casos que requieran atención especial (enfoque de riesgo) (Laclé, 2004). Aunque no se ha podido encontrar un cierto nivel de HgbA1c que garantice una protección absoluta de las complicaciones tardías, existen varios trabajos que al menos, sugieren que existiría un “nivel crítico” que correspondería a una HgbA1c superior a 8%, a partir del cual el riesgo sería inaceptablemente elevado (Antuña, 1995). De esta forma se puede entender que las pruebas de laboratorio son un instrumento valioso tanto en el diagnóstico médico como en la investigación epidemiológica (Méndez, 2007).

Los métodos más comunes de cuantificación de hemoglobina glicosilada en el laboratorio clínico se han clasificado en tres grupos principales: Métodos por separación de carga; métodos de afinidad y métodos de inmunoensayo.

El uso de diferentes metodologías y la fracción que se determine hacen imposible la comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. Se ha visto además que existe interferencia con otras sustancias que no son glucosa, a las que se les conoce como derivadas de hemoglobina; en particular la carbamilación en la uremia con penicilina o aspirina en grandes cantidades y con los metabolitos en el alcoholismo. Las variantes de hemoglobina comúnmente conocidas como hemoglobinopatías, también causan problemas, ya que pueden presentar picos que interfieran y necesitan ser interpretadas por otra forma.

Así también se ven afectados por procesos en los que hay un mayor recambio eritrocitario y por lo tanto una disminución en la edad promedio de los eritrocitos, lo cual provoca una falsa disminución de los valores de la hemoglobina glicosilada, esto sería en pacientes con anemia hemolítica, pérdida aguda de sangre, esplenectomía y embarazo (Barrón, 2000).

JUSTIFICACIÓN

La diabetes es un padecimiento de gran incidencia en la población mundial y que aumenta en proporciones alarmantes. Su existencia se conoce desde el siglo XV antes de la era cristiana. El concepto actual sobre la diabetes señala que la enfermedad, más que ser un solo desorden, es un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica que constituye una de las patologías más frecuentes en la consulta del médico de familia. En los últimos años el número de diabéticos se ha incrementado de forma dramática, considerándose a un conjunto de factores que inciden sobre la población, destacando la ingesta calórica excesiva y la escasa realización de ejercicio físico.

En la actualidad, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, se estima que existen alrededor de 246 millones de personas con diabetes mellitus en el mundo, y se espera que esa cifra se eleve a más de 300 millones en los próximos 25 años. En 1995, México contaba con 3.8 millones de adultos con diabetes mellitus y ocupaba el noveno lugar dentro de los diez países con mayor número de personas con diabetes, para el año 2025, se prevé que alcance los 11.7 millones y pase a ocupar el séptimo lugar en orden de frecuencia (Alpizar, 2001; Kuri, 2001).

El conocimiento de la magnitud real de la diabetes mellitus, en cuanto a los indicadores básicos de incidencia y prevalencia, está limitado por aspectos importantes de tipo metodológico, comunes no solamente a todas las instituciones de salud en el país, sino también en el ámbito mundial. Uno de ellos es la falta de uniformidad en los criterios de estudio y diagnóstico de los pacientes, lo cual le resta validez a la comparación de frecuencias entre diferentes poblaciones.

Durante la pasada década se han producido grandes avances en el diagnóstico y control de la diabetes, particularmente, los profesionales clínicos han reconocido la importancia creciente de las pruebas de laboratorio para establecer el diagnóstico al determinar el grado de control de la glucemia

alterada y así evaluar y definir las complicaciones asociadas y los factores de riesgo (Aschner, 2006). Se han desarrollado también nuevos métodos para evaluar la glucemia entre los que destaca la prueba de la hemoglobina glicosilada (HbG). Esta prueba proporciona una comprensión mayor del grado de control metabólico de un paciente y de esta forma ofrece a los clínicos la oportunidad de diseñar programas de cuidado más eficaces.

La medición de la hemoglobina glicosilada resulta de gran importancia en la supervisión y control glucémico en el paciente con diabetes, debido a que la glicosilación de la hemoglobina ocurre de manera constante en las células rojas de la sangre o eritrocitos a lo largo de la vida media de estas células (120 días), y puesto que esta reacción es no enzimática e irreversible, la concentración de HbG en una célula refleja clínicamente el promedio de los niveles de glucosa en sangre durante la vida de esta célula, por tanto los niveles de hemoglobina glicosilada (HbG) en la muestra de sangre hemolizada de un paciente reflejarán los niveles promedio de glucosa de los dos a tres meses anteriores, a diferencia de la cuantificación de glucosa en sangre bajo el método tradicional que sólo indicará el valor en ese preciso momento (López, 1997).

El resultado de la Hb glicosilada no es únicamente una simple media de los niveles de glucosa durante un periodo de tiempo sino que se trata de una media ponderada con lo que los resultados se ven mucho más influenciados por la mayor representación en la sangre de los hematíes más jóvenes y por eso se acepta que solamente el grado de control del último mes contribuye al 50% del resultado (Manual para el manejo de insulinas, 2001); mientras que el control de los 3 a 4 meses previos contribuye sólo con 10% (Antuña, 1995; Islas, 2002; Hemoglobina glicada: www.2.ucg.br...pdf). Por ello la rápida mejoría inicial de los pacientes recién diagnosticados es acompañada por un rápido decremento de la hemoglobina glicosilada en los 2 primeros meses, seguida de un descenso gradual a los 4 meses (Islas, 2002).

La finalidad de este trabajo es dar a conocer la determinación de hemoglobina glicosilada, la cual es poco usada en el sector salud ya que lamentablemente

su uso ha predominado a nivel hospitalario y solo en algunos de estos, en donde la mayoría de los pacientes ya tienen las complicaciones crónicas de la DM por lo que un monitoreo de control de esta prueba, aunque es de utilidad no produce el beneficio de prevención secundaria que podría darse en los diabéticos que se manejan en atención primaria. Por tal motivo surge la necesidad de crear conciencia en las personas que laboran en el sector salud, acerca de la importancia de esta prueba y mostrar en el medio hospitalario un marcador bioquímico útil que sea más sensible y específico que la determinación de glucemia en ayunas y que, por otra parte, ofrezca una posibilidad, por medio de sus resultados, de tomar medidas terapéuticas adecuadas que permitan aumentar la calidad de vida del paciente diabético y de esta manera evitar la aparición de las complicaciones a largo plazo producidas por la enfermedad, como por ejemplo, retinopatía que puede conducir a ceguera, neuropatía, nefropatía, problemas cardiovasculares, entre otros, los cuales tienen fundamentada su etiología en los elevados niveles de glucosa, estas alteraciones orgánicas secundarias pueden llevar al paciente diabético a un estado de incapacidad e inclusive hasta la muerte.

El tratamiento de estas complicaciones, representa para el sector salud inversiones anuales millonarias que lo han afectado al paso del tiempo hasta llevarlo a la actual crisis económica en la que se encuentra, por lo cual resulta más viable conocer y aplicar formas de diagnóstico y control oportuno de la DM para lo cual es indispensable conocer las variaciones de la glucemia y de la hemoglobina glicosilada donde esta última es de gran apoyo para el control de este tipo de pacientes.

Así mismo este trabajo proporciona información para todos aquellos interesados en el tema de la DM que es de gran utilidad para el entendimiento de esta enfermedad ya que una mejor comprensión de la DM favorece el autocontrol y cuidado de la misma, para reducir complicaciones inmediatas y de largo plazo y la prevención de la enfermedad. La relevancia social de la diabetes, las aplicaciones prácticas del estudio y el valor teórico que ofrece esta investigación justifican el esfuerzo desplegado.

OBJETIVO

- ⌘ Realizar una búsqueda bibliográfica, hemerográfica y electrónica, que permita integrar un texto en el cual se muestre la importancia de la determinación de hemoglobina glicosilada en el seguimiento del control metabólico de la glucosa en pacientes con Diabetes Mellitus.

CAPÍTULO 1. DIABETES MELLITUS

1.1 DEFINICIÓN Y GENERALIDADES

La diabetes mellitus es un padecimiento crónico que se caracteriza por una alteración en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos. Se manifiesta principalmente como hiperglucemia a consecuencia de una deficiencia absoluta de insulina o de una resistencia tisular a su acción, aunque puede coexistir con hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (Alpizar, 2001; Islas 2002; Ceballos, 2005; Aschner, 2006; Gardner, 2008). Es un síndrome que implica una serie de complicaciones metabólicas a largo plazo que afectan la mayor parte de aparatos y sistemas, constituyendo una de las principales causas de invalidez y mortalidad prematura, aparte de afectar a la calidad de vida de las personas enfermas (Alpizar, 2001; Islas, 2002; Gardner, 2008).

La glucemia en plasma suele ser 110 mg/dl en ayunas e inferior a 140 mg/dl tras la ingesta. Cuando los valores de glucemia en ayunas oscilan entre 110-126 mg/dl y la glucemia a las 2 horas de la prueba de tolerancia oral a la glucosa oscila entre 140-200 mg/dl se considera que existe una alteración de la homeostasia de la glucosa (Alpizar, 2001; Henry, 2007).

La falta de control en el metabolismo de los carbohidratos y de los lípidos tiene su origen principal en el caso de la diabetes mellitus en defectos originados en el páncreas (Fig. 1); este órgano está situado anatómicamente entre el estómago y el intestino delgado, su función principal es ser una glándula de acción endógena y exógena (Pfreundschuch, 2002; Ceballos, 2005; Gardner 2008).

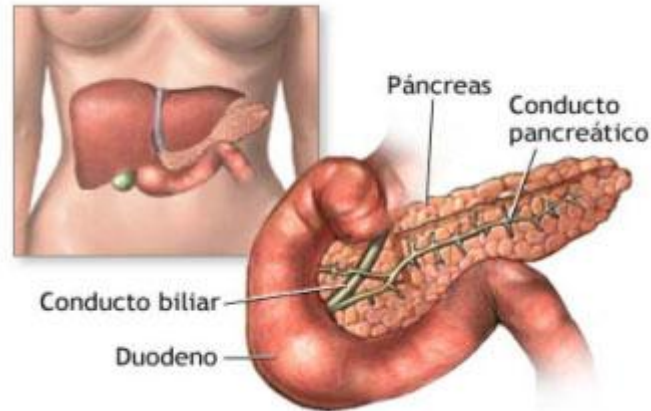


FIGURA 1. Imagen representativa del páncreas, el cual posee acción endógena y exógena. Tomado de www.google.com en www.cancerinfo.es/index.php?textoid=21&orden=6, el 29 de septiembre de 2009.

Dentro de su función exocrina secreta el jugo pancreático que contiene enzimas que intervienen en la hidrólisis de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos. Su función endógena se refiere a la producción de hormonas que intervienen en el metabolismo fundamentalmente de los carbohidratos pero también de las lípidos y de las proteínas (Pfreundschuch, 2002; Ceballos, 2005; Gardner, 2008), las hormonas son vertidas al torrente sanguíneo independientes del jugo pancreático que interviene en la digestión (Pfreundschuch, 2002; Aschner, 2006).

En este órgano es donde se encuentran los denominados islotes de Langerhans (encargados de la función endocrina), los cuales están diseminados en él y representan un 1% de la totalidad del mismo, se encuentran compuestos por al menos 5 diferentes tipos de células secretoras, denominadas alfa (α), beta (β), delta (δ) y PP (ϕ), productoras de glucagón, insulina, somatostatina, polipéptido intestinal y polipéptido pancreático, respectivamente. La composición celular de los islotes es heterogénea, dependiendo ésta de su localización en el páncreas (Fig. 2) (Fernández, 1996; Pfreundschuch, 2002).

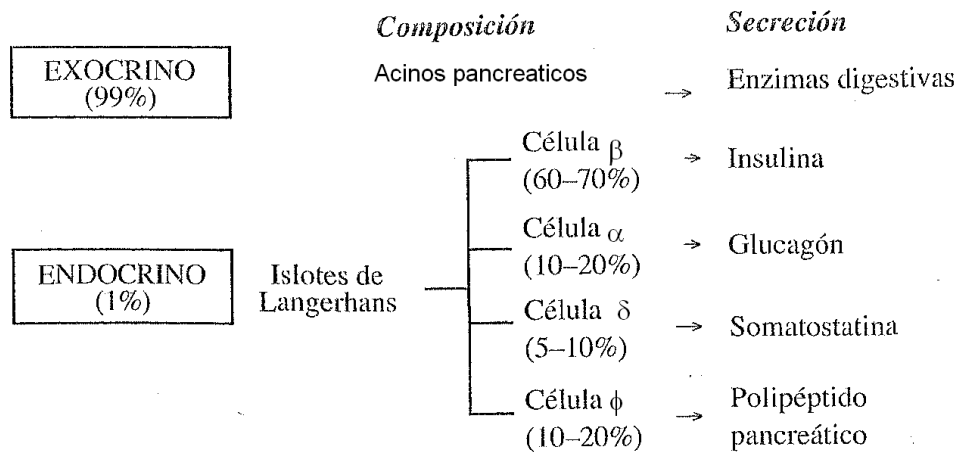


FIGURA 2. Composición anatómica del páncreas y su producción de hormonas. Tomado de Ceballos, 2005.

El páncreas entonces es el responsable de poner en circulación a la insulina para que ésta tenga efecto directo sobre otros tejidos y órganos para metabolizar los carbohidratos. De su buen funcionamiento, de su correcta síntesis y secreción en momento y cantidad depende la presencia o no de los síntomas característicos de la diabetes mellitus.

La falta de insulina puede ser:

- ✓ Cuantitativa: por disminución de la producción de insulina por la célula β , como consecuencia de una lesión directa, que hace que el número de células capaces de producir insulina se vea cuantitativamente disminuido.
- ✓ Relativa: como consecuencia de una falta de acción de la insulina, que a pesar de producirse en cantidades normales, no es capaz de ejercer su acción (Ceballos, 2005).

En cualquiera de los dos casos el resultado final será el mismo, una elevación de los niveles de glucosa en sangre por falta de utilización de ésta en los tejidos.

Para entender un poco mejor esta situación hay que poner en evidencia el proceso que se lleva a cabo. Primeramente la glucosa es un monosacárido, de

fórmula $C_6H_{12}O_6$, se forma por la hidrólisis de numerosos carbohidratos, como la sacarosa, maltosa, celulosa, almidón y glucógeno. Es el principal sustrato energético para la producción del adenosintrifosfato (ATP) compuesto indispensable en muchas de las reacciones que se llevan a cabo en la célula (Díaz, 2002; Pfreundsouch, 2002).

Durante muchos años fue conocido el hecho que en algunas células, como las musculares y las adiposas, la insulina potenciaba la entrada del azúcar, en tanto que en otras el efecto insulínico no era aparente, sugiriendo la existencia de diferentes transportadores de glucosa (Fernández, 1996). Ahora se han identificado transportadores codificados por diferentes genes y localizados en diferentes cromosomas. Se han descrito dos sistemas de transporte de glucosa y de otros monosacáridos: los transportadores de sodio y glucosa llamados SGLT (por sus siglas en inglés) y los transportadores de glucosa llamados GLUT (Fernández, 1996; Díaz, 2002).

1.1.1 Mecanismo de secreción de la insulina.

La insulina se libera tras la rotura de la proinsulina junto con un péptido pequeño, el péptido C. Esta hormona (51 aminoácidos, PM = 5.800 D) se compone de una cadena α y otra β unidas entre sí por enlaces disulfuro (Pfreundsouch, 2002). Gran parte de la insulina se elimina de la circulación tras su paso por el hígado (efecto del primer paso). Otro lugar de eliminación es el riñón, en el que se produce la captación de insulina mediada por receptor.

El páncreas segrega insulina en forma continua en una cantidad aproximada de 0.5 a 10 unidades por hora, esta secreción llamada "basal" controla que el hígado no produzca menos ni más glucosa de la que el organismo necesita cuando estamos en ayuno. La secreción pulsátil estimulada por la ingestión de alimentos, que se caracteriza por ser rápida y de corta duración, es de 5 a 10 veces mayor que la basal (Pfreundsouch, 2002). Esta secreción tiene como principal función la utilización y almacenamiento de los nutrientes producidos por los alimentos, glucógeno en el hígado y músculos, triglicéridos en el tejido

graso, síntesis de proteínas y producción de energía (ATP) (Manual para el manejo de insulinas, 2001). La secreción de Insulina en respuesta a la glucosa se efectúa a las concentraciones postprandiales de glucosa. La concentración de insulina sérica aumenta unos 10 minutos después de la ingesta, alcanzando el máximo en 30-45 minutos y disminuyendo a lo largo de 2 horas hasta cifras basales (Fig. 3) (Pfreundschuch, 2002). La secreción basal tiene una periodicidad de 9 a 14 minutos y su periodicidad es inherente a la célula beta, posiblemente modulada por mecanismos neurales. Estímulos hormonales intrainstote y otros secretagogos pueden afectar la secreción basal de insulina (Fernández, 1996; Pfreundschuch, 2002).

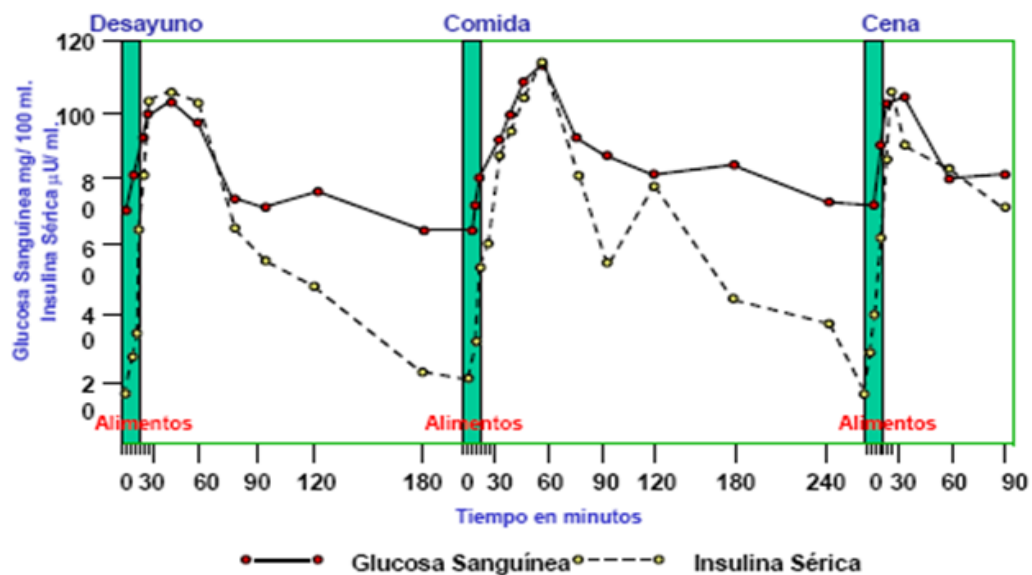


FIGURA 3. Niveles de insulina durante la ingesta de alimentos. Tomado de Manual para el manejo de insulinas, 2001.

La secreción de insulina en respuesta a la glucosa es un complejo mecanismo que requiere de dos grandes bloques de eventos, uno de tipo bioquímico involucrando el metabolismo del azúcar, la generación de segundos mensajeros y otro de tipo eléctrico que incluye la depolarización de la membrana plasmática y la entrada de calcio; la conjunción de estos produce la fusión de los gránulos secretores maduros conteniendo la insulina con la membrana y finalmente la liberación de la hormona al torrente sanguíneo.

1.1.2 Mecanismo de acción de la insulina.

Las acciones de la insulina son múltiples, muchas de estas acciones se efectúan en segundos, sugiriendo que el efecto se lleva a cabo sobre mediadores existentes en la membrana o en el citoplasma (efectos post-traduccionales), mientras que otros requieren de horas para manifestarse, sugiriendo por lo tanto un efecto en la transcripción y en la síntesis de proteínas.

La insulina regula la captación y el metabolismo de la glucosa, de los ácidos grasos y de los aminoácidos en el interior de la célula. Aunque la insulina influye sobre todas las células, su principal efecto se ejerce sobre el tejido muscular, el tejido adiposo y el hígado (Tabla 1) (Pfreundschuch, 2002).

TABLA 1. EFECTOS DE LA INSULINA EN EL ORGANISMO.

Efectos de la insulina	
Sobre el músculo	Aumento de la captación de glucosa, aumento de la síntesis de glucosa, aumento de la captación de aminoácidos y de la síntesis de proteínas
Sobre el tejido adiposo	Aumento de la concentración de α -glicerol-fosfato con el consiguiente incremento de la síntesis de triglicéridos, inhibición de la lipólisis y depósito de triglicéridos.
Sobre el hígado	Inhibición de la gluconeogénesis, aumento de la síntesis de glucógeno, aumento de la síntesis de colesterol y triglicéridos, aumento de la síntesis proteica, inhibición de la síntesis de cuerpos cetónicos

Tomado de Pfreundschuch, 2002.

1.2 CLASIFICACIÓN

De acuerdo a la clasificación recientemente aprobada por la Asociación Americana de Diabetes y avalada por la Organización Mundial de la Salud en julio de 1997 y plasmada en la Modificación de la Norma Oficial Mexicana NOM 015 SSA2 1994, para la Prevención, Tratamiento y Control de la Diabetes (Manual para el manejo de insulinas, 2001), la diabetes se divide de la siguiente manera (Alpizar, 2001; Islas, 2002; Ceballos, 2005):

- Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)
- Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)
- Otros tipos específicos de diabetes
- Diabetes mellitus gestacional

Se aceptó también eliminar los términos diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM) y no insulino dependiente (NIDDM); sustituyéndolos por los términos tipo 1 y tipo 2, usando números arábigos, en lugar de números romanos. Se agrega una nueva etapa llamada “Alteración de la Glucosa en Ayuno” (AGA) (Alpizar, 2001; Islas, 2002; Ceballos, 2005). En la tabla 2 se presenta la clasificación que estuvo vigente desde 1979 y la actual.

Por su magnitud y trascendencia, la diabetes mellitus tipo 1 y 2, son las más importantes, principalmente la tipo 2, que representa aproximadamente 90% de todas las formas clínicas y constituye un importante problema de salud pública, tanto a nivel internacional como nacional e institucional. Forma parte del grupo de padecimientos descritos en la denominada transición epidemiológica de nuestro país, que es un fenómeno resultante de los cambios en el comportamiento humano, desarrollo urbano acelerado y aumento en la esperanza de vida, que se refleja en la modificación de los patrones de morbilidad y mortalidad (Alpizar, 2001).

TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LA DIABETES MELLITUS.

Clases clínicas	
No vigente Elaborada en 1979	Vigente Elaborada en 1997
Diabetes mellitus insulino dependiente (DMID o tipo I)	Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)
Diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID o tipo II) a. Obesos b. No obesos	Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)
Diabetes secundaria y de otros tipos Diabetes mellitus relacionada con malnutrición.	Otros tipos específicos de diabetes Diabetes mellitus gestacional (DMG)
Diabetes mellitus gestacional (DMG)	
Clases de riesgo estadístico	
Alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG) a. Obesos b. No obesos	Intolerancia a la glucosa (IG) (o IGT: Impaired Glucose Tolerance): Glucosa plasmática a las dos horas poscarga ≥ 140 pero < 200 mg/dl (75 g glucosa para la carga oral disuelta en agua).
Anomalía potencial de tolerancia a la glucosa	Alteración de la glucemia en ayuno (AGA): glucemia en ayuno ≥ 110 pero < 126 mg/dl (Alpizar, 2001); también denominada glucemia basal alterada (IFG: Impaired Fasting Glucose) (Ceballos, 2005).

Modificado de Alpizar, 2001.

Una de las razones iniciales para introducir el concepto de IG fue el hecho que además de asociarse a un aumento del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, supone un riesgo elevado de progresión de diabetes, hecho confirmado por numerosos estudios; de igual manera es el papel de AGA que tiene la capacidad de identificar a aquellos sujetos que progresaran a diabetes (sensibilidad) sin embargo en menor grado que IG.

Diabetes tipo 1

Se considera en aquellos individuos que presentan cualquiera de las siguientes condiciones:

- Síntomas clásicos de diabetes y una prueba aleatoria de glucosa en plasma >200 mg/dl.
- Glucemia plasmática en ayuno igual o mayor de 126 mg/dl.
- Glucosa en plasma a las dos horas pos carga > 200 mg/dl utilizando un máximo de 75 g como carga oral disuelta en agua (Alpizar, 2001).

La diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por la destrucción de las células β del páncreas, que suele llevar a deficiencia absoluta de insulina y corresponde a un 10% del total de personas con diabetes mellitus (Méndez, 2005; Ministerio de salud, 2005). Las manifestaciones clínicas se caracterizan en general por un inicio súbito de polidipsia, poliuria y polifagia que progresan rápidamente y que pueden desencadenar hasta una cetoacidosis diabética. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, casi siempre delgados, y suelen presentar comienzo abrupto de signos y síntomas con insulinopenia y dependencia de la aplicación de insulina para llevar una vida normal antes de los 30 años de edad. En la fase inicial de ese tipo de diabetes se puede identificar en algunos pacientes la presencia de anticuerpos anti insulina, lo cual sugiere el carácter inmunológico de la fisiopatología (Méndez, 2005; Ministerio de salud, 2005; Aschner, 2006). Su etiología en el 90% es autoinmune, lo que se determina por la presencia de anticuerpos anti-isletos (ICA), antiGAD y anti-insulina. Un 10% de los casos son idiopáticos (Alpizar, 2001; Ministerio de salud, 2005).

Diabetes tipo 2

Se considera DM2 todo aquel individuo que presente cualquiera de las siguientes condiciones:

- Glucemia plasmática en ayuno igual o mayor de 126 mg/dl.
- Glucemia plasmática ocasional > 200 mg/dl.
- Glucosa en plasma a las dos horas poscarga > 200 mg/dl, 75 g glucosa para la carga oral disuelta en agua (Aschner, 2006).

Aquí se incluye a poco más de 90% de todos los pacientes con diabetes mellitus. En general se manifiesta en adultos mayores de 40 años de edad, es de inicio insidioso y es frecuente que haya obesidad. Sólo eventualmente conduce al desarrollo de cetoacidosis diabética y puede presentarse durante periodos de estrés. Los pacientes no necesitan insulina exógena para corregir la hiperglucemia ya que tienen insulina en su organismo que incluso puede encontrarse en concentraciones superiores a los valores de referencia sin embargo pueden requerirla en algunos casos para el control de la hiperglucemia; la dieta, ejercicio apropiado e hipoglucemiantes orales sirven para un adecuado control (Alpizar, 2001; Aschner 2006).

La pérdida de peso se observa más frecuentemente en la DM1 o en la DM2 de larga evolución (diabetes tipo2 insulino- recurrente). Los síntomas clásicos de poliuria, sed, visión borrosa recurrente, parestesias y fatiga son manifestaciones de hiperglucemia y diuresis osmótica y, por tanto, son comunes en ambas formas de diabetes. Sin embargo, muchos pacientes con diabetes tipo 2 tienen inicio insidioso de hiperglucemia. Son comunes las infecciones cutáneas crónicas. El prurito generalizado, y los síntomas de vaginitis frecuentemente son los síntomas iniciales en mujeres con diabetes mellitus tipo 2. Debe sospecharse diabetes en mujeres con vulvovaginitis candidiásica crónica. En ocasiones, un varón con diabetes previa no diagnosticada, puede presentarse con disfunción eréctil (Gardner, 2008).

Otros tipos específicos de diabetes

En esta categoría se incluye a 3% de los pacientes con diabetes mellitus, se relaciona con defectos en la secreción pancreática de insulina y con interferencias para que ejerza su acción sobre las células efectoras. Los defectos e interferencias se pueden agrupar de la manera siguiente (Alpizar, 2001; Ceballos, 2005):

a) Defectos genéticos en la función de las células β , que comprende varias entidades

- Cromosoma 12, HFN-1 alfa (antes MODY 3)
- Cromosoma 7, glucocinasa (antes MODY 2)
- Cromosoma 20, HFN-4 alfa (antes MODY 1)
- DNA mitocondrial
- Otros

Estas formas de diabetes se caracterizan por comienzos de hiperglucemia moderados a edades precoces de la vida, de manera que en el sistema de clasificación previa se consideraba a los pacientes designados como MODY (maturity onset diabetes of the young) (Ceballos, 2005); esto ha desaparecido, ya que se ha identificado una serie de alteraciones genéticas, sobre todo en adolescentes y en menores de 30 años, existiendo un defecto en la función de la célula β , con una secreción inapropiada de la insulina. Estas formas de diabetes se heredan en forma autosómica dominante, y la más frecuente se asocia a un defecto en el cromosoma 12, seguida por la alteración a nivel del cromosoma 7 caracterizado por una deficiencia de glucocinasa, enzima que convierte a la glucosa en glucosa-6-fosfato, vía metabólica mediante la cual se estimula la secreción de insulina.

b) Defectos genéticos en la acción de la insulina

- Resistencia a la insulina tipo A
- Leprechaunismo
- Síndrome de Rabson-Mendenhall
- Diabetes lipoatrófica
- Otros

c) Enfermedades del páncreas exocrino

Cualquier proceso que lesione en forma difusa al páncreas puede causar diabetes ya que se reduce la secreción de insulina, por ejemplo:

- Pancreatitis
- Trauma / pancreatectomía
- Neoplasia

- Fibrosis quística
- Hemocromatosis
- Pancreatopatía fibrocalculosa
- Otras

La pancreatopatía fibrocalculosa anteriormente se incluía en la antigua clasificación como diabetes asociada a desnutrición, caracterizada por la presencia de dolor abdominal irradiado a la espalda y calcificaciones pancreáticas por rayos X con presencia de cálculos de calcio en los conductos pancreáticos (Pfreundschuch, 2002; Aschner 2006).

d) Endocrinopatías

- Acromegalia
- Síndrome de Cushing
- Glucagonoma
- Feocromocitoma
- Hipertiroidismo
- Somatostatinoma
- Aldosteronoma
- Otros

Algunas hormonas, como la de crecimiento, cortisol, glucagón y epinefrina, antagonizan la acción de la insulina. Cualquier exceso en la producción de éstas, por enfermedades como la acromegalia, el síndrome de Cushing, el glucagonoma, el feocromocitoma y el hipertiroidismo, pueden causar diabetes, sobre todo en individuos con alteración preexistente de la secreción de insulina. De tal forma que, una vez tratadas, llega a resolverse el problema de hiperglucemia. El somatostatinoma y el aldosteronoma provocan hipocalcemia, y ésta, a su vez, genera disminución en la secreción de insulina y por tanto también causan diabetes (Pfreundschuch, 2002). El glucagón se opone a la hipoglucemia en condiciones fisiológicas. Su nivel está relativamente elevado en la diabetes de tipo 1 como consecuencia de la deficiencia de insulina, para poder estimular la gluconeogénesis y la glucogenólisis (Pfreundschuch, 2002).

e) Diabetes inducida químicamente o por fármacos

Estos fármacos no causan diabetes, sin embargo, pueden precipitarla, sobre todo en individuos con resistencia a la insulina

- Vacor
- Pentamidina
- Ácido nicotínico
- Glucocorticoides
- Hormonas tiroideas
- Diazóxido
- Antagonistas β adrenérgicos
- Tiazidas
- Otros

f) Infecciones

- Rubéola
- Citomegalovirus
- Otros

g) Diabetes poco común mediada inmunológicamente

- Síndrome del “hombre rígido”
- Anticuerpos contra el receptor de insulina
- Otros

h) Otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados con diabetes

- Síndrome de Down
- Síndrome de Klinefelter
- Síndrome de Turner
- Síndrome de Wolfram
- Ataxia de Friedrichs
- Distrofia miotónica
- Porfiria
- Síndrome de Pander Willi

Diabetes gestacional

Este término se refiere a la hiperglucemia que se descubre durante el embarazo y ocurre aproximadamente entre el 2 al 5% de todas las embarazadas, generalmente en el segundo y tercer trimestre. Se refiere al surgimiento de intolerancia a los carbohidratos durante la gestación y tal anomalía cesa al terminar el embarazo aunque algunas de estas pacientes llegan a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (30 a 60%) en los siguientes 5 y 10 años (Islas, 2002; Figueroa, 2003; Ceballos 2005; Aschner, 2006)

1.3 FACTORES DE RIESGO

Factores de riesgo es un término moderno que combina un concepto clásico de causa directa de enfermedad con conceptos más recientes de probabilidad, predicción y pronóstico. Los factores de riesgo para diabetes mellitus los podemos clasificar en modificables y no modificables. En la tabla 3 se mencionan los factores de riesgo de acuerdo a la clasificación.

TABLA 3. FACTORES DE RIESGO PARA DIABETES MELLITUS.

No modificables	
-Edad (es independiente)	
-Herencia genética: antecedente de diabetes mellitus en un familiar de primer grado (padres, hermanos o hijos)	
Modificables	
-Peso	-Índice de masa corporal ≥ 27 kg/m ² en hombres y ≥ 25 kg/m ² en mujeres
-Sedentarismo	
-Tabaquismo	-Índice cintura-cadera ≥ 0.9 en hombres y ≥ 0.8 en mujeres
-Manejo inadecuado del estrés	-Presión arterial con cifras $\geq 140/90$ mmHg
-Hábitos inadecuados de alimentación	-Triglicéridos ≥ 150 mg/dl
-Estilo de vida contrario a su salud	-HDL de colesterol ≤ 35 mg/dl

Modificada de Alpizar 2001.

Los factores modificables son los que más preocupan al médico en su práctica diaria, ya que si se logra incidir en ellos, ya sea por cambios en el estilo de vida o por intervención farmacológica, se puede disminuir la probabilidad de que la enfermedad se manifieste o bien se retarde su aparición y se modifique la evolución desfavorable hacia complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía o neuropatía periférica, etc.) y macrovasculares (miocardiopatías, ataques cerebrovasculares o enfermedades vasculares periféricas, etc.) (Alpizar, 2001; Aschner, 2006).

SÍNDROME DE DISFUNCIÓN CARDIOMETABÓLICA (SDC)

El Síndrome Metabólico o SDC se define como un conjunto de factores de riesgo para diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular (ECV), caracterizado por la presencia de hiperglucemia asintomática, hipertensión, obesidad central (abdominal) y dislipidemia.

Un paciente con una de estas afecciones, por ejemplo DM2 y obesidad abdominal, también tendrá uno o más de los otros factores de riesgo de ECV. Esta agrupación se ha llamado el cuarteto mortal y cuando el grupo de factores de riesgo se amplía síndrome X y posteriormente Síndrome Metabólico (Pfreunschuch, 2002) o recientemente denominado Síndrome de Disfunción Cardiometabólica (SDC) (Alpizar, 2008). En la Tabla 4 se muestran las principales características de esta afección.

Está bien documentado que los demás elementos del SDC pueden presentarse hasta 10 años antes del diagnóstico de la DM2. Esto tiene gran importancia con relación a nuestra comprensión de la etiología de la DM2 y el riesgo de ECV, morbilidad y mortalidad asociadas. En otras palabras, el riesgo y el proceso patogénico de la ECV se inicia muchos años antes de que se manifieste la intolerancia hacia la glucosa (Alpizar, 2001).

TABLA 4. COMPARACIÓN DE LAS DEFINICIONES CLÍNICAS ACTUALES DEL SÍNDROME METABÓLICO.

OMS	NCEP ATP III	AACE
<p>Resistencia a la insulina identificada para cualquiera de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • DMS tipo 2 • Glucosa en ayuno alterada <p>• Tolerancia de la glucosa Alterada.</p> <p>Cualquiera de los siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión ($\geq 140/90$) • Triglicéridos en plasma ≥ 150 mg/dL o colesterol HDL <35 mg/dL en hombres o <39 mg/dL en mujeres • IMC >30 kg/m² e índice cintura -cadera > 0.9 en hombres y > 0.85 en mujeres • Microalbuminuria 	<p>Un mínimo de tres de los siguientes cinco criterios:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Circunferencia en cintura: <ul style="list-style-type: none"> • Hombres ≥ 102cm • Mujeres ≥ 88 cm 2. Triglicéridos ≥ 150 mg/dL 3. Colesterol HDL: <ul style="list-style-type: none"> • Hombres <30 mg/dL • Mujeres < 50 mg/dL 4. Hipertensión $\geq 130/85$ o medicación antihipertensiva 5. Glucosa en ayuno ≥ 100 mg/dL. 	<p>Glucosa postprandial a las dos horas ≥ 140 mg/dL</p> <p>Glucosa en ayuno 110-126 mg/dL</p> <p>IMC ≥ 25 kg/m²</p> <p>Triglicéridos ≥ 150 mg/dL</p> <p>Colesterol HDL:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hombres < 40 mg/dL • Mujeres <50 mg/dL <p>Hipertensión $\geq 130/85$ mmHg</p> <p>Otros factores relacionados:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Historia familiar de DM tipo 2, hipertensión o ECV • Poliquistosis ovárica <ul style="list-style-type: none"> • Sedentarismo • Grupos étnicos de alto riesgo <ul style="list-style-type: none"> • Hígado graso no alcohólico • <i>Acantosis nigricans</i>

* (NCEP ATP III) Programa Nacional de Educación en Colesterol y panel de tratamiento para adultos III. (AACE) Asociación americana de endocrinología clínica. Tomado de Alpizar, 2008.

1.4 ETIOLOGÍA

1.4.1 Diabetes tipo 1

Existen dos subtipos, la autoinmunitaria y la idiopática.

A. Diabetes mediada por procesos inmunes

Este tipo de diabetes es causada por una destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas; la susceptibilidad genética y los factores ambientales, entre los que destacan estudios epidemiológicos demuestran que el factor geográfico influye en la incidencia de la enfermedad. Representa la mayoría de los casos con DM tipo 1 y aunque lo común es que comience en niños o adultos jóvenes, puede ocurrir a cualquier edad. El comienzo suele ser de forma brusca, con cetoacidosis, en niños y adolescentes. Otros tienen moderada hiperglucemia basal que puede evolucionar rápidamente a hiperglucemia severa y/o cetoacidosis en presencia de infección o estrés. Estos individuos pueden volverse eventualmente dependientes de la insulina. Habitualmente el peso es normal o por debajo de lo normal además de que estos pacientes son propensos a otras alteraciones autoinmunes, tales como enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Addison, vitíligo y anemia perniciosa (Ceballos, 2005; Méndez 2005).

El estado prediabético, que se podría definir como aquel periodo anterior a la aparición de los síntomas clínicos de la DM 1, que puede tener una duración de meses e incluso años, en el cual se inician y desencadenan una serie de procesos de autoinmunidad que conducen a la destrucción progresiva de la masa de células beta, con la consecuente disminución y posterior abolición de la respuesta secretora de insulina, se caracteriza por la aparición precoz de una serie de autoanticuerpos dirigidos contra autoantígenos (marcadores inmunológicos): ICA (anticuerpos antiislotos), AAI (anticuerpos antiinsulina), EMA (anticuerpos antiendomiso), AGA-A (anticuerpos antigliadina), Atgt (anticuerpos antitransglutaminasa) (Méndez, 2005).

Los genes clase II están fuertemente relacionados con la susceptibilidad genética a la diabetes tipo 1. Los antígenos más comunes son los DR-3 y DR-4, con una frecuencia del 90% en diabéticos dependientes de insulina de raza blanca y 40% en la población general. Cuando un individuo presenta el DR-2 no desarrolla diabetes, por ello a este gen se le atribuye un papel protector. En la población general el riesgo a desarrollar diabetes tipo 1 es del 0.7%, porcentaje que se incrementa 110% cuando el individuo porta los haplotipos DR-3/DR-4 (Islas, 2002). De esta forma se puede decir que la susceptibilidad genética para desarrollar DM 1 está relacionada, al menos en parte con la herencia de genes de la respuesta inmunitaria específica asociados con el sistema de histocompatibilidad HLA-DR/DQ del cromosoma 6, así como con otros genes y marcadores genéticos (Henry, 2007).

Otro factor aunque con menor asociación de susceptibilidad genética para diabetes mellitus tipo 1, es la presencia en el brazo corto del cromosoma 11 del gen que codifica para insulina, con un gran polimorfismo que durante el desarrollo embrionario afecta el tiempo de expresión de la molécula de insulina en la célula beta o en el timo y que en su momento modifica la tolerancia inmunológica a la misma. Se ha sugerido que la autoinmunidad se activa antes de los 5 años de edad (Islas, 2002).

Existe una predisposición genética que en presencia de factores ambientales desencadenantes como las infecciones virales como en la rubeola el autoantígeno de 52 kd da lugar a una reacción autoinmunitaria frente a diversos autoantígenos de las células de los islotes (ICA), sobre todo la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) (Islas, 2002; Pfreundschuch, 2002; Ministerio de salud, 2005). Se pueden demostrar anticuerpos frente a las células insulares, frente a GAD o frente a la insulina (menos frecuentes) mucho tiempo antes de que exista una enfermedad clínicamente manifiesta.

B. Diabetes idiopática

La etiología no es conocida, sólo una minoría de pacientes con DM1 entran en esta categoría, la mayoría son de origen africano o asiático. Existe un fuerte

factor hereditario, no hay fenómenos autoinmunes, y no se asocia al HLA (Antígenos Linfocitarios Humanos). Los individuos con esta forma de diabetes pueden tener episodios de cetoacidosis, y presentar diversos grados de deficiencia insulínica entre los episodios. La necesidad absoluta de insulina puede aparecer y desaparecer (Ceballos, 2005).

De manera general ambos subtipos de diabetes llegan a las mismas alteraciones.

Alteraciones del metabolismo en la diabetes tipo 1

En el inicio de la enfermedad la hiperglucemia sólo se manifiesta postprandialmente, debido a que en esta condición grandes cantidades de insulina son requeridas para mantener la homeostasis de la glucosa. A medida que la destrucción de las células beta progresa, los niveles de insulina decrecen produciendo un aumento de la concentración de glucosa en la sangre. La falta de hormona produce la disminución de la entrada de glucosa al músculo y al tejido adiposo, tejidos de alta captación de glucosa debido al efecto potenciador de la insulina. Por otro lado en el hígado la disminución de insulina y el exceso relativo del glucagón produce un aumento en la degradación del glucógeno y un aumento de la vía de glucogénesis, por lo que se produce de esta manera un aumento adicional de glucosa sanguínea. Un exceso en la concentración de glucosa en sangre sobrepasa la capacidad de reabsorción en el riñón y como consecuencia se pierde la glucosa por orina (glucosuria) arrastrando consigo agua y sales, esta pérdida produce los síntomas de poliuria y polidipsia característicos de la enfermedad. La escasez de glucosa como fuente de energía en el interior de las células da como consecuencia la necesidad de utilización de grasas desde el tejido adiposo y degradación de proteínas principalmente musculares para la obtención de aminoácidos produciendo así una pérdida de peso.

La degradación de aminoácidos aumenta la producción de urea y un balance negativo de nitrógeno. Por otro lado la lipólisis se encuentra también favorecida

por falta de entrada de glucosa al adipocito y el aumento relativo de glucagón produciendo un exceso en la salida de ácidos grasos, parte de ellos son utilizados por otros tejidos como combustible y/o transformados a cuerpos cetónicos en el hígado, estos cuerpos cetónicos representan una fuente eficiente de energía. En la forma más avanzada de la diabetes tipo 1, en la que la destrucción de las células beta produce la carencia casi total de insulina, el catabolismo del glucógeno, proteínas y en especial de lípidos, sobrepasa las necesidades nutricionales del paciente y ocasiona un exceso de cuerpos cetónicos los cuales captan sodio del bicarbonato plasmático provocando de esta manera cetoacidosis, responsable del coma diabético. La cetoacidosis es una característica clínica diferencial entre la diabetes de tipo 1 y 2 la diferencia radica en la cantidad de insulina producida entre los dos subtipos del padecimiento, aparentemente la pequeña cantidad de insulina producida en la DM2 es capaz de bloquear la producción de ácidos grasos a partir de la lipólisis evitando la sobreproducción de cuerpos cetónicos (Fernández, 1996).

Con lo anterior se puede considerar que el cuadro clínico incluye:

*Hiperglucemia secundaria a la deficiencia de insulina.

* Poliuria por diuresis osmótica al incrementarse la excreción de glucosa en la orina por superarse el umbral renal (unos 180 mg/dl); además se produce sed y aparece polidipsia.

*Pérdida de peso, por aumento de la excreción de líquido y también por la pérdida de calorías al eliminar la glucosa no utilizada.

*Cansancio y debilidad, porque la célula recibe menos energía en forma de glucosa y porque se producen alteraciones electrolíticas adicionales.

*Hiperlipoproteinemia secundaria (hipertrigliceridemia) a la deficiencia de insulina; aumenta la síntesis hepática de VLDL que se degrada menos por acción de las lipoproteinlipasas dependientes de la insulina (Gardner, 2008).

1.4.2 Diabetes tipo 2

Alteraciones del metabolismo en la diabetes de tipo 2

Mientras que los desarreglos metabólicos en la diabetes de tipo 1 son explicados fácilmente por la falta de insulina, las bases metabólicas de la diabetes de tipo 2 no resultan tan evidentes. Una anomalía previa al desencadenamiento de la enfermedad es la hiperinsulinemia, la cual se encuentra asociada a una resistencia a la insulina, es decir que la insulina a concentraciones normales no es capaz de producir sus efectos, requiriendo mayor cantidad de ella para obtener funcionalidad, este mecanismo compensatorio genera que la curva de tolerancia a la glucosa en esta etapa sea normal o cercana a los límites altos. Otra característica de estos pacientes es un contenido alto de triglicéridos plasmáticos, presión arterial elevada y distribución del tejido adiposo en la parte superior del cuerpo (síndrome X) (Pfreundschuch, 2002). La diabetes sobreviene cuando las células beta pancreáticas no son ya capaces de producir la cantidad extra de insulina para contrarrestar los efectos de la resistencia y es en esta etapa en donde se hace evidente la elevación anormal de la glucosa postprandial en el avance de la enfermedad. Es importante hacer hincapié que es esta incapacidad de la célula beta para secretar insulina adicional el evento crítico en el desarrollo de la diabetes de tipo 2 (Fernández, 1996). Una subsecuente disminución de insulina produce franca hiperglucemia tanto en ayuno como después de la ingestión de alimentos, esta hiperglicemia a su vez produce toxicidad en las células beta afectando aún más su secreción de insulina.

En las causas de la diabetes de tipo 2 es posible que sea más de un único defecto el responsable de la alteración de la homeostasis de la glucosa en estos pacientes (Fernández, 1996; Alpizar, 2001; Ceballos, 2005), entre las causas destacan los factores genéticos, pero resulta difícil definirlos por su naturaleza poligénica, obesidad, factores metabólicos (sobre todo hiperglucemia), edad y actividad física (Pfreundschuch, 2002; Ceballos, 2005).

Uno de los primeros eventos en la patogénesis de la diabetes de tipo 2 es la resistencia del tejido adiposo y del músculo para incorporar a la glucosa aún en presencia de grandes cantidades de insulina (resistencia insulínica); así también como una secreción deficiente de la insulina (Fernández, 1996; Alpizar, 2001).

La resistencia a la insulina reduce dramáticamente la absorción de glucosa en el tejido periférico, y causa una sobreproducción de glucosa por el hígado. Ambos defectos contribuyen a mantener la hiperglucemia en pacientes con DM2. En etapas tempranas del proceso de la enfermedad, la resistencia a la insulina ya está presente, y los pacientes son hiperinsulinémicos aunque no hiperglucémicos. Sin embargo, con el tiempo los mecanismos compensatorios fallan y los pacientes progresan a una diabetes tipo 2 manifiesta, cuyo primer trastorno es la ausencia de la primera fase de secreción de la insulina (Fernández, 1996).

Dado que la resistencia a la insulina en el transporte de glucosa es una de las manifestaciones iniciales en la patogénesis de este tipo de diabetes, se ha enfocado un interés especial en el estudio de los transportadores de glucosa; este es el caso del transportador GLUT 4. La velocidad del transporte de la glucosa depende del número de transportadores presentes en la superficie celular. La insulina, por intermedio de las fosforilaciones producidas en su interacción con el receptor, favorece el movimiento de los transportadores hacia la membrana, este incremento en número de transportadores se ve reflejado en un aumento de la velocidad de transporte. Considerando el mecanismo de transporte de glucosa del transportador GLUT4, existen varias hipótesis que podrían explicar la disminución del transporte observada en los pacientes diabéticos: 1) Disminución en el número de transportadores, 2) Incapacidad de los transportadores localizados intracelularmente de translocar en respuesta a la insulina y 3) Función transportadora dañada (Fernández, 1996).

1.4.3 Otros tipos específicos de diabetes

Como se menciona anteriormente en esta categoría se incluye a 3% de los pacientes con diabetes mellitus, se relaciona con defectos en la secreción pancreática de insulina y con interferencias para que ejerza su acción sobre las células efectoras. Los defectos e interferencias fueron citados en el apartado 1.2 ayudando de esta forma a entender la etiología que da origen a este particular grupo de pacientes diabéticos.

1.4.4 Diabetes Gestacional

La diabetes mellitus gestacional (DG) se produce en mujeres susceptibles de diabetes a causa de la acción antiinsulínica de las hormonas lactógeno placentario humano y gonadotropína coriónica humana, prolactina y cortisol producidas por la placenta. La diabetes mellitus gestacional se presenta, por tanto, en la segunda mitad del embarazo, a medida que aumenta el tamaño de la placenta. La diabetes que aparece en la primera mitad del embarazo es probable que estuviera presente previamente, pero sin ser detectada (Figueroa, 2003; Hernández, 2005 Aschner, 2006). La diabetes gestacional puede manejarse muchas veces sólo con la dieta. Si los niveles de glucosa en sangre están por encima de 140mg/dl, está indicada la terapia con insulina. Durante el embarazo está contraindicado el emplear agentes hipoglucemiantes orales.

La detección de la DG debe hacerse a toda embarazada o es imprescindible realizarla al menos en todas las embarazadas que presenten factores de riesgo de DG, los cuales son los siguientes: antecedentes de diabetes mellitus en familiares de primer grado, edad materna igual o superior a 30 años, sobrepeso u obesidad (índice de masa corporal = 27), mortalidad perinatal inexplicada, macrosomía fetal, malformaciones congénitas, glucosuria positiva en la primera orina de la mañana y antecedentes de enfermedad tiroidea autoinmune (Manual para el manejo de insulinas, 2001; Pfreundschuch, 2002).

1.5 COMPLICACIONES

Uno de los principales peligros de la diabetes es su avance silencioso, ya que puede ser asintomática en etapas iniciales y cursar durante lapsos variables en forma inadvertida. Aproximadamente de 30 a 50% de los enfermos desconoce su enfermedad, ya porque efectivamente se encuentran asintomáticos o porque sus signos y síntomas no han sido identificados como tales. Muchas veces cuando el sujeto es diagnosticado con diabetes ya tiene una historia de 3 a 5 años de complicaciones, por lo que se debe tratar de identificar a esos sujetos en una etapa más temprana para poder ofrecer una terapéutica más fisiológica y menos agresiva (Alpizar, 2001). Estas complicaciones están determinadas en muchas de las veces por los cambios fisiológicos, forma de vida, además de contemplar aspectos sociológicos y psicológicos.

Los posibles mecanismos mediante los cuales la hiperglucemia produce las complicaciones tardías son:

*Alteración del metabolismo de los polioles, metabolismo de la glucosa a sorbitol y fructosa con disminución de inositol, diacilglicerol y de la actividad de la proteinacinasas C.

* Glicosilación no enzimática de las proteínas, sobre todo albúmina, colágeno, LDL y hemoglobina, que es reversible en las primeras fases. Su nivel se correlaciona de un modo estrecho con los niveles de glucemia (Pfreundschuch, 2002).

1.5.1 Agudas

A. HIPOGLUCEMIA

Entre las causas más frecuentes están, el exceso de insulina o hipoglucemiantes orales, consumo inadecuado de alimentos, ejercicio intenso y el consumo de alcohol, mala técnica de inyección de insulina, interacciones con otros fármacos como salicilatos, sulfamidas, β -bloqueantes, enfermedades que disminuyan las necesidades de insulina (insuficiencia renal, hepática, déficit hormonal) (Ceballos, 2005; Aschner, 2006).

B. CETOACIDOSIS DIABÉTICA (CAD)

- a) Coma cetoacidótico, sobre todo en la diabetes de tipo 1 que se suele producir por una deficiencia de insulina. Las hormonas antagonistas de la insulina hacen que se liberen más triglicéridos y ácidos grasos libres y el hígado produce cuerpos cetónicos sin oposición, que además son menos captados fuera del hígado, lo que determina una acidosis metabólica.

- b) Coma hiperosmolar, sobre todo en diabéticos de tipo 2, cursa con aumento de la glucemia con la consiguiente pérdida de líquidos y alteraciones electrolíticas, teniendo menos relación con la deficiencia de insulina (Pfreundschuch, 2002).

1.5.2 Crónicas

A. ATEROESCLEROSIS

La hiperglucemia por sí misma, es un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis, actúa induciendo la modificación de lipoproteínas (glicosilación de LDL), glicosilación de las proteínas de la pared arterial, incrementa los niveles de productos finales de la glicosilación avanzada (AGE) y estimula la secreción de la insulina (Alpizar, 2001).

B. RETINOPATÍA

La DM se acompaña también de daño en los vasos sanguíneos de pequeño calibre en la retina, dando como resultado pérdida de la visión. Se correlaciona la presencia de complicaciones microvasculares con hiperglucemia a través de la vía de los polioles y asociada con un incremento en los AGE los cuales pueden cambiar las características de la matriz extracelular de células vasculares y por lo tanto, alterar la susceptibilidad a la acción de factores de crecimiento, que están vinculados con enfermedad oftálmica angiogénica (Molina, 2005).

C. NEFROPATÍA DIABÉTICA

La nefropatía diabética es la principal causa de muerte prematura en los pacientes con DM, principalmente cuando presentan uremia y manifiestan enfermedad cardiovascular. Consiste en el daño vascular y metabólico causado a la unidad estructural y funcional del riñón y es la principal causa de enfermedad renal crónica. La progresión y severidad se relaciona con el grado de hiperglucemia, la duración de la diabetes y la elevación de la presión arterial

D. NEUROPATÍA DIABÉTICA

El efecto central de daño a la estructura del nervio es la hiperglucemia asociada con DM, a través de un número de posibles mecanismos, que incluyen el aumento de la glucosa por la vía de los polioles, y el aumento en la glicosilación no enzimática de las proteínas, además alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos esenciales, las prostaglandinas y los gangliósidos de la membrana axonal (Alpizar, 2001; Aschner, 2006).

E. PIE DIABÉTICO

El pie del paciente con diabetes es quizá el sitio del organismo en el que más se evidencia el efecto devastador de las complicaciones vasculares y neuropáticas, que se presentan en mayor o menor grado a lo largo de la evolución de la enfermedad y constituye una de las principales causas de amputación, así como de morbimortalidad e incapacidad física en nuestro país, causando graves repercusiones económicas y sociales.

1.5.3 Otras complicaciones en la diabetes

INFECCIONES

Los pacientes con un deficiente control de la diabetes tienen una mayor predisposición a desarrollar infecciones bacterianas, en particular micobacterias y anaerobios y micóticas. La infección de las vías urinarias es la más común, más frecuente en gente con diabetes que en los que no la padecen (Alpizar, 2001).

COMPLICACIONES EN EL EMBARAZO

Si la madre permanece con cifras de glucosa sanguínea altas, el feto también estará expuesto a una hiperglucemia sostenida o a pulsos intermitentes de glucosa elevada. Este fenómeno es principalmente peligroso en la etapa de la organogénesis (de la segunda a la octava semana de gestación), ya que es durante este tiempo cuando ocurre la formación de órganos internos, como el corazón, riñones, cerebro y esqueleto, estructuras por demás sensibles a las concentraciones altas de glucosa. Esto explica la presencia de malformaciones adquiridas; la incidencia de malformaciones en los hijos de mujeres diabéticas es, del 6% al 13%, la cual es dos o tres veces superior a la observada en la población en general.

1.6 TRATAMIENTO

Por ser una enfermedad incurable, los diabéticos deben recibir tratamiento durante toda su vida. Esto determina que una gran parte de ellos, en el transcurso del tiempo, manifiesten una baja adherencia al tratamiento, lo que conduce a un deficiente control metabólico de la enfermedad. Sólo una pequeña fracción de los afectados acude regularmente a los servicios de salud y de éstos entre el 25 y el 40% logra el control metabólico de la enfermedad (Manual para el manejo de las insulinas, 2001).

Los objetivos de tratamiento van encaminados a aliviar y prevenir tanto los síntomas como las complicaciones de la diabetes:

- Lograr el bienestar de los pacientes con diabetes mellitus e intolerancia a la glucosa, aliviando y previniendo los síntomas de la hiper e hipoglucemia.
- Evitar o retardar las complicaciones de la diabetes mellitus, logrando un control metabólico óptimo y una reducción de los factores de riesgo cardiovascular para cada paciente. Esto incluye el peso corporal, los lípidos y la presión arterial, así como los niveles de glucosa en sangre. Dejar de fumar es vital.
- Detectar el desarrollo precoz de complicaciones, para poder instaurar el tratamiento en el momento adecuado (Aschner, 2006).

Para tratar a los pacientes diabéticos los médicos se auxilian en primera instancia de un tratamiento no farmacológico con el cual se busca controlar simultáneamente la mayoría de los problemas metabólicos de la persona, este tratamiento comprende tres aspectos básicos: plan de alimentación, ejercicio físico y hábitos saludables.

El otro tipo de de tratamiento es el farmacológico, también es referente al tipo de diabetes que se desarrolla, en los dos tipos principales la DM 1 es tratada con insulina y la DM2 con tratamiento en el cual se incluye, agentes hipoglucemiantes orales (secretagogos de insulina como nateglinida, sulfonilureas), antihiperoglucemiantes (inhibidores de las α -glucosidasas, biguanidas), sensibilizadores de la insulina (tiazoldinedionas), insulina y terapia combinada.

Cada uno de ellos al igual que el tratamiento no farmacológico debe ser dosificado y acondicionado para cada tipo de paciente y de las condiciones de este. Para lograr un tratamiento farmacológico exitoso debe tomarse como base la participación activa del enfermo y del personal médico cuidando la regularidad y la flexibilidad requeridas para administrar el tipo y cantidad de medicamentos según la evolución de la enfermedad.

1.7 CONTROL

Control, tratamiento y diagnóstico, no pueden ser considerados por separados en esta enfermedad pues el control implica tratamiento terapéutico y dietético, además de un seguimiento en el cambio de los niveles glucémicos de los pacientes, mismo que precisa de métodos altamente confiables para la mejor valoración.

El control y tratamiento adecuado, así como la prevención, deberán convertirse en pilares que eviten el desarrollo de las complicaciones. Las acciones de prevención deben ejecutarse, no sólo a través de actividades médicas, sino también con la participación y compromiso de la comunidad y autoridades sanitarias utilizando los medios de comunicación masivos existentes en cada

región (radio, prensa, TV, etc.), a través de sus acciones, obtener impactos en la salud del paciente con factores de riesgo asociados a diabetes mellitus o quienes ya la padecen. La población debe ser educada para que conserve su peso ideal y se realice la detección periódica de la enfermedad y que, en el caso de presentarla y detectarla a tiempo, el efecto de las medidas preventivas, como son el tratamiento y la vigilancia periódica, tienen mayor impacto.

Por mucho tiempo el estándar de referencia para el diagnóstico de la diabetes fue la prueba de tolerancia oral a la glucosa, sin embargo esta prueba es inconveniente para los pacientes que ya han desarrollado la enfermedad pues puede provocar un choque hiperglucémico, por lo que ya no es muy usada en la actualidad, sin embargo algunos médicos la siguen solicitando. De manera general los estudios realizados para evaluar si se lleva buen control y tratamiento adecuado son: la determinación de glucosa en orina, en suero y en sangre total y el estudio de hemoglobina glicosilada, así también la determinación de un perfil de lípidos, un EGO y urocultivos si es necesario, y aquellas pruebas que el especialista crea necesario.

La concentración de glucosa en suero fluctúa a lo largo del tiempo. Las pruebas de glucosa en suero proveen sólo un pequeño momento del estado de la glucemia por lo tanto las pruebas de glucosa en sangre, suero o plasma únicas o muy espaciadas en tiempo, no son útiles en el control a largo plazo de la glucosa (Aschner, 2006). En cambio la prueba de hemoglobina glicosilada, es una prueba considerada como control a largo plazo.

Los estudios de autoanálisis de glucosa en sangre realizados por el propio paciente en el hogar proporcionan una información valiosa acerca del estado metabólico actual que podría resultar en un aumento en el nivel de responsabilidad personal con la enfermedad, mejorando así la adherencia al tratamiento y permitiendo el mantenimiento de un buen control diabético.

Obtener un adecuado control glucémico depende de una serie de factores, entre los cuales uno de los principales es conocer los niveles de glucosa a

diferentes tiempos, por lo que las determinaciones realizadas por el propio paciente son de suma importancia. La frecuencia de las mediciones depende del tipo de diabetes y del grado de control de la glucosa sanguínea que se desee alcanzar, este automonitoreo se hace a través de aparatos llamados glucometros (Barrón, 2000).

Es evidente también que la diabetes mellitus tipo 2 y la gestacional, son dos padecimientos cada vez más frecuentes en mujeres en edad reproductiva y, en consecuencia, las complicaciones inherentes en la díada madre-hijo. Por lo tanto, es fundamental llevar un control estricto de la glucemia durante el embarazo a través de mejorar los hábitos alimentarios e incrementar la actividad física. En el caso de mujeres en quienes se haya encontrado una hemoglobina glicosilada (prueba de control) anormal, es necesario realizar pruebas de tolerancia a la glucosa durante las seis primeras semanas del postparto, para asegurarnos que la alteración ha desaparecido (Gómez, 2005).

1.8 PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO (MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL CONTROL DIABÉTICO)

Las pruebas de laboratorio son un instrumento valioso tanto en el diagnóstico médico como en la investigación epidemiológica, de esta forma no sólo deben cumplir criterios de calidad analítica sino también tener relevancia clínica (Méndez, 2007). Los siguientes criterios son las recomendaciones más recientes de un comité internacional de expertos en diabetes que revisaron los criterios de diagnósticos previos. El diagnóstico de diabetes puede basarse en cualquiera de estos criterios pero debe confirmarse con estudios posteriores.

El primer diagnóstico se realiza cuando el paciente presenta síntomas, como orinar con frecuencia y sentir mucha hambre y sed. Si a este individuo se le hace una toma de sangre a cualquier hora del día, seguramente el nivel de su azúcar será superior a los 200 miligramos por decilitro (mg/dl). Si es así, se considera que padece diabetes.

El segundo diagnóstico se lleva a cabo cuando el paciente no muestra síntomas, pero tiene una fuerte herencia familiar. Se realiza una medición de glucosa en ayunas (ayuno nocturno de al menos 8 horas), y si el resultado es igual o mayor a 126 mg/dl (7 mmol/L), por lo menos en dos ocasiones, es posible sospechar el diagnóstico.

El tercer diagnóstico es tener concentraciones plasmáticas de glucosa 2h después de una prueba de tolerancia a la glucosa con 75g de glucosa por vía oral, con resultado mayor de 200 mg/dl (11.1 mmol/L) (Islas, 2002; Ministerio de salud, 2005; Gardner, 2008).

Las pruebas de laboratorio aunque permitan hacer diagnósticos de mayor validez, no están exentas de error (3%); una de las fuentes de variabilidad pueden ser las discrepancias tanto biológicas como analíticas entre los laboratorios (Méndez, 2007), sin embargo cada uno de ellos trabaja para ofrecer un servicio de calidad y confianza a los pacientes.

1.8.1 Pruebas de Glucosa Sanguínea

DETERMINACIÓN DE GLUCOSA

El rango normal de glucosa plasmática o sérica en ayuno es 70 a 110 mg/d (3.9 a 6.1mmol/L). El objetivo de esta determinación es descubrir alteraciones en el metabolismo de la glucosa, principalmente la diabetes, y se usa como auxiliar para indicar el tratamiento de la misma. Existen diferentes métodos de laboratorio para realizar las determinaciones de glucosa en sangre, suero o plasma y es de suma importancia que el médico conozca la técnica a través de la cual se realiza, ya que actualmente los métodos que utilizan O-toluidina o que dependen de la detección de sustancias reducidas en la sangre han sido reemplazados por métodos enzimáticos más específicos, que utilizan, por ejemplo, de glucosa oxidasa, glucosa deshidrogenasa o hexocinasa (Islas, 2002).

se observe glucosa en la orina (glucosuria) y que la glucosa en sangre siga una curva típica a la largo del tiempo (Fig. 4) (Systems (Insert Package), 2007).

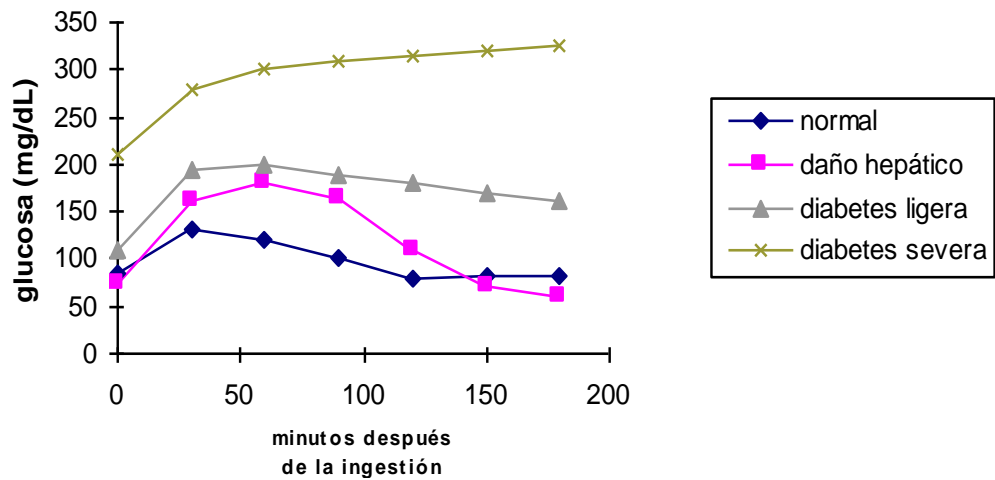


FIGURA 4. Curva de tolerancia promedio después de la ingestión de glucosa.

Preparación del paciente: El análisis se lleva a cabo por la mañana, después de tres días de dieta sin restricciones o dieta de al menos 150-200g de carbohidratos al día en 3 días previos a la prueba (Gardner, 2008), y ayuno previo de 10 a 14h e interrupción del consumo de medicamentos que puedan alterar los valores de la glucemia (mínimo 12h previas) (Islas, 2002).

Técnica para la realización de esta prueba:

El paciente debe ingerir 75g de glucosa anhidra (adultos) o bien 3 frascos de 25g cada uno de solución glucosada a 50%, diluida en 300 ml de agua, (en los niños se les administra 1.75g de glucosa por kg de peso), en un periodo de tiempo no mayor de 5 minutos, y se miden sus niveles de azúcar cada 30 minutos, siendo determinante el valor tomado a las 2 horas, ya que si excede los 200 mg/dl, se establece que padece diabetes. Cuando oscila entre los 140 y 200 mg/dl, se dice que es intolerante a la glucosa, que es la fase previa a la enfermedad (Alpizar, 2001; Islas, 2002; Gardner, 2008). En fechas recientes un comité internacional de diabetólogos recomendó simplificar la prueba de tolerancia a la glucosa para solicitar sólo una medición de ayuno nocturno y otra medición 2h después de la administración de una carga de glucosa oral

estándar de 75g (Tabla 5). Ya no se necesita la toma de muestras a los 30, 60 y 90 min (Gardner, 2008).

TABLA 5. CRITERIOS DEL COMITÉ EXPERTO EN DIABETES PARA LA VALORACIÓN DE LA PRUEBA ESTÁNDAR DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA ORAL.

	Tolerancia normal a la glucosa	Intolerancia a la glucosa	Diabetes mellitus
Glucosa plasmática en ayuno (mg/dL)	< 110	110 a 125	≥ 126
2h después de la administración de una carga de glucosa (mg/dL)	< 140	≥ 140 a 199	≥ 200

Tomado de Gardner 2008.

No debe realizarse esta prueba en las siguientes circunstancias:

1. Hiperglucemia en ayuno
2. Pacientes hospitalizados gravemente enfermos o en reposo prolongado
3. Estrés agudo

Esta prueba también ayuda a identificar a la población en riesgo para la enfermedad cardiovascular que no es identificada en la glucemia en ayuno (Figueroa, 2003).

La interpretación de la prueba de tolerancia a la glucosa puede alterarse por ciertos fármacos como los diuréticos, ácido nicotínico, agentes bloqueadores β -adrenérgicos, así como dosis elevadas de algunas hormonas. También otras condiciones clínicas que pueden estar asociadas con un resultado anormal de tolerancia a la glucosa fuera de la diabetes son las siguientes: ingestión de carbohidratos disminuida en los días anteriores a la prueba, insuficiencia hepática severa, enfermedades crónicas con desnutrición (alcoholismo, uremia), inactividad física prolongada (más de 72 horas en cama), estrés agudo (fiebre, trauma, cirugía mayor), enfermedades endocrinas (acromegalia, insulinoma, glucagonoma entre otras) y uso de drogas (Systems, 2007).

1.8.2 Otras determinaciones importantes

Las mediciones de glucosa en plasma o en sangre total en muestras obtenidas en ayuno y después de la administración de glucosa son muy importantes para valorar al paciente diabético, así como las pruebas de glucosa y cuerpos cetónicos en orina. Las pruebas de hemoglobina glicosilada han probado su utilidad en la valoración inicial y para establecer la eficacia del tratamiento. En ciertas circunstancias, la medición de las concentraciones de insulina o de péptido C y de otras hormonas que participan en la homeostasis de carbohidratos pueden ser útiles (Barrón, 2000; Islas, 2002; Méndez, 2005; Gardner, 2008). En vista del aumento de riesgo de aterosclerosis en diabéticos, puede ser de utilidad la medición de triglicéridos y colesterol sérico (incluyendo su fracción benéfica HDL) a partir de estas tres mediciones, puede estimarse la concentración de la fracción de colesterol LDL.

HEMOGLOBINA GLICOSILADA

La medición de la hemoglobina glicosilada resulta de gran importancia en la supervisión y control glucémico en el paciente con diabetes. La prueba revela el control a largo plazo de su glucosa.

EXAMEN GENERAL DE ORINA

Glucosuria

La magnitud de la glucosuria depende de la carga de glucosa filtrada en glomérulo, de la velocidad de filtración glomerular y de la máxima reabsorción tubular de glucosa en túbulo proximal. En condiciones de filtración glomerular normal, la concentración de glucosa sanguínea que corresponde al mínimo umbral de reabsorción (umbral renal de glucosa) es de 175 a 200 mg/ dL (9.7 a 11.1 mmol/L) (Barrón, 2000). La glucosuria se presenta cuando los niveles de glucosa en sangre exceden los 180 mg/dl y desde este rango las

concentraciones de glucosa en orina deben ser proporcionales a la hiperglucemia (Islas, 2002; Ceballos, 2005).

Actualmente se encuentran disponibles varios productos comerciales para establecer la presencia y la cantidad de glucosa en orina, los cuales son rápidos, convenientes y específicos para glucosa. Uno de los más conocidos son tiras de papel (Clinistix, TesTape) impregnado con enzimas (oxidasa de glucosa y peroxidasa de hidrógeno) y un colorante cromógeno que es incoloro en estado reducido, la Glc oxidada por la *Glucosa oxidasa* cataliza la formación de ácido glucurónico y de peróxido de hidrógeno, este último libera neocotipos de oxido bajo la función de peroxidasa y ésta oxida al yoduro de potasio provocando un cambio de coloración. Estas tiras reactivas son sensibles a concentraciones tan bajas de glucosa como 0.1 % (100 mg/dL), pero no reaccionan con las cantidades menores de glucosa que se encuentran en condiciones normales en la orina de personas no diabéticas (Islas, 2002; Gardner, 2008).

A pesar de ser una prueba barata hay aspectos que indican que la prueba en orina es poco confiable y conduce a conclusiones erróneas (Islas, 2002) debido a que el umbral renal es alto en algunos individuos diabéticos por largo tiempo y cambia en el mismo individuo a través del tiempo; la ingesta de líquidos y la concentración de orina afectan los resultados y que el resultado no refleja el nivel de glucosa en el momento de la toma sino el promedio en el tiempo en el cual se acumuló en la vejiga. Además pueden obtenerse resultados falsos negativos en presencia de agentes reductores potentes (ácido acetilsalicílico o ácido ascórbico) con oxidación de la sustancia cromógena (Islas, 2002; Gardner, 2008).

Cetonuria

Si bien la determinación de glucosa en orina ha sido totalmente sustituida por la determinación de glucosa en sangre, la determinación de cetonas en orina continúa aportando una información crítica de gran valor (Islas, 2002).

En ausencia de insulina adecuada, se forman y excretan en la orina tres principales cuerpos cetónicos, ácido β -hidroxibutírico, ácido acetoacético y acetona. Se dispone de productos comerciales para valorar la presencia de cetonas en orina. Las tabletas o tiras utilizan reacción de nitroprusiato, que mide sólo acetona y acetoacetato. Si bien, estas pruebas no detectan ácido β -hidroxibutírico, que cuantitativamente es el cuerpo cetónico más importante, la estimación semicuantitativa de los otros cuerpos suele ser adecuada para la valoración clínica de la cetonuria (Islas, 2002; Gardner, 2008).

Es importante señalar que se han comunicado falsos positivos con los reactivos de nitroprusiato cuando los pacientes reciben medicamentos con sulfhidrilos como captopril y la exposición al aire produce falsos negativos (Islas, 2002). Otros trastornos, que pueden causar la aparición de cuerpos cetónicos incluyen inanición, dietas con alto contenido en grasas, cetoacidosis alcohólica, fiebre, y otros trastornos en los que se incrementan las necesidades metabólicas.

Proteinuria y Microalbuminuria

La proteinuria se detecta en los exámenes sistemáticos de orina con tira reactiva, y con frecuencia es la señal de las complicaciones renales de la diabetes. Si se detecta proteinuria, debe analizarse una muestra de orina de 24h para cuantificar el grado de ésta, las personas sanas excretan < 30 mg de proteína por día (Gardner, 2008).

La proteinuria clínica se define como la excreción urinaria de proteínas totales en concentración mayor de 0.5g/24 horas, y se presenta con grandes variaciones étnicas en aproximadamente 35% de los pacientes con diabetes tipo 1 y en 10% de los de tipo 2. Su presencia puede significar insuficiencia renal en etapa terminal. En particular y desde el punto de vista de la cantidad de albúmina que se excreta por la orina se puede clasificar en normoalbuminuria (2.5 a 30 mg/24 horas), microalbuminuria (30 a 300 mg/24

horas) y albuminuria clínica (mayor de 300 mg/24 horas) (Barrón, 2000; Manual para el manejo de insulinas, 2001).

Microalbuminuria es un término acuñado para definir la cantidad de albúmina que se excreta por la orina, ligeramente por arriba de los valores normales, pero con cifras por debajo de las que se obtienen con métodos semicuantitativos y habituales del laboratorio. En pacientes con diabetes mellitus se considera como un signo de nefropatía la cual evoluciona por varias fases interconectadas: a) Una fase temprana de anomalías fisiológicas de la función renal conocida como de microalbuminuria b) una fase clínica con proteinuria persistente y c) una etapa final de insuficiencia renal (Barrón, 2000; Islas, 2002).

LIPOPROTEÍNAS EN DIABETES

Las concentraciones de lipoproteínas circulantes dependen de concentraciones y acción normales de insulina, al igual que de glucosa plasmática. En la diabetes tipo 1, el control en forma moderada deficiente de la hiperglucemia se asocia sólo con una ligera elevación de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) y triglicéridos séricos y poco o ningún cambio en colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidad).

Una vez que se corrige la hiperglucemia, las concentraciones de lipoproteínas por lo general son normales. Sin embargo, en pacientes obesos con diabetes tipo 2 con “dislipidemia diabética” es característico el síndrome de resistencia a la insulina. Sus características son concentración sérica elevada de triglicéridos (300 a 400 mg/dL), concentraciones de colesterol HDL bajas (menor de 30 mg/dL) y un cambio cualitativo en las partículas LDL que producen LDL menos densas, cuya membrana transporta cantidades supranormales de colesterol libre (Gardner, 2008).

CAPÍTULO 2. HEMOGLOBINA

2.1 GENERALIDADES.

La hemoglobina ha jugado un papel histórico en la química, la biología y la medicina. En 1849 se convirtió en la primera proteína en ser cristalizada y asociada con una función fisiológica específica. En 1862, Felix Seyler descubrió el espectro de color característico de la hemoglobina y probó que ésta era la sustancia que realmente daba el color a la sangre. Después de su descubrimiento, comenzó la investigación sobre la reacción de la hemoglobina con el oxígeno (Turgeon, 2006). En 1958 se convirtió en la primera proteína eucariota en ser sintetizada *in vitro*, y su estructura se estableció en 1960. El ARN mensajero de la globina fue el primer mensajero eucariota en ser aislado y en tener una secuencia nucleotídica determinada (Peñuela, 2005).

La hemoglobina tiene como peso molecular 68,000 daltons, comprende 4 cadenas de aminoácidos, cada una unida a un componente hemo. Son las moléculas del grupo hemo la que le imparten al eritrocito la característica de color rojo. La molécula de la hemoglobina se encuentra espacialmente organizada, como otras proteínas, en diferentes niveles estructurales de uniones moleculares (Fig. 5) (Carrillo, 2000).

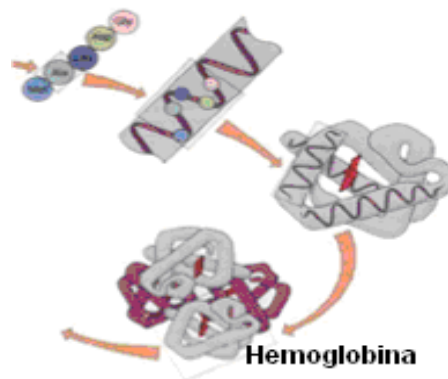


FIGURA 5. Diferentes niveles estructurales de uniones moleculares en la hemoglobina (estructura primaria, secundaria, terciaria, cuaternaria. Tomado de Hemoglobina glicada en <http://www2.ucg.br/cbb/downloads/LABIC/HemoglobinaGlicada.pdf> el día 13 de marzo de 2009.

2.2 FUNCIÓN

La hemoglobina (Hb) es una proteína globular, que esta presente en altas concentraciones en los glóbulos rojos y se encarga del transporte de O₂ del aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos, y el apoyo para la movilización de CO₂ y protones (H⁺) de los tejidos periféricos hasta los pulmones para ser excretados (Peñuela, 2005; Turgeon, 2006; Brandan, 2008), mientras que los eritrocitos a su vez tienen como función transportar a la hemoglobina. Un eritrocito maduro o adulto contendrá en su interior alrededor de 640 millones de tetrámeros de hemoglobina (Carrillo, 2000). Los valores normales en sangre son de 13-18 g/ dl en el hombre y 12-16 g/dl en la mujer (Brandan, 2008).

Los procesos metabólicos dentro del eritrocito aseguran un ambiente intracelular adecuado para la hemoglobina, que la protege de los cambios químicos que podrían derivar en la pérdida de su estructura nativa o su desnaturalización (Turgeon, 2006). La sangre necesita de un transportador de O₂ porque este gas no es suficientemente soluble en el plasma sanguíneo para satisfacer las necesidades corporales. A 37° C un litro de sangre sólo disuelve 2.3 ml de O₂. Se sabe que por cada litro de sangre hay 150 gramos de Hb, y que cada gramo de Hb disuelve 1.34 ml de O₂, en total se transportan 200 ml de O₂ por litro de sangre. Esto es, 87 veces más de lo que el plasma solo podría transportar. Sin un transportador de O₂ como la Hb, la sangre tendría que circular 87 veces más rápido para satisfacer las necesidades corporales (Peñuela, 2005; Henry, 2007; Brandan, 2008).

2.3 TIPOS DE HEMOGLOBINA

2.3.1 Tipos de hemoglobina normal

En individuos normales, 97% de la hemoglobina consiste en dos cadenas alfa y dos beta y es llamada Hb A; aproximadamente 2% de la hemoglobina contiene dos cadenas alfa y dos delta Hb A₂, una variante normal; otro tipo es 1% hemoglobina fetal (HbF) la cual esta compuesta por dos cadenas alfa y dos gama (Mayer, 1998), y antes del nacimiento también está la hemoglobina

embrionaria (Turgeon, 2006; Henry, 2007; Hemoglobina glicosilada en www.rochediagnostics.com.ar...). Cada una de estos tipos de hemoglobina tiene una composición distintiva de cadenas polipeptídicas (Tabla 6). Se han identificado muchos otros tipos de hemoglobina, de esta forma se altera la proporción de la normal, pero se conocen como hemoglobinas variantes o anormales (Turgeon, 2006).

TABLA 6. COMPOSICIÓN Y PROPORCIÓN DE LAS HEMOGLOBINAS HUMANAS.

Nominación	Composición	Proporción	
		adultos (%)	neonatos (%)
HbA	$\alpha_2\beta_2$	97	20
HbA ₂	$\alpha_2\delta_2$	2.5	0.5
HbF	$\alpha_2\gamma_2$	<1	80

Tomado de Peñuela, 2005.

Hemoglobinas embrionarias

Las hemoglobinas embrionarias son hemoglobinas primitivas formadas por eritrocitos inmaduros en el saco vitelino. Estas hemoglobinas incluyen los tipos Gower I ($\zeta_2\varepsilon_2$), Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) y Portland ($\zeta_2\gamma_2$) (Henry, 2007). Se encuentran en el embrión humano y persisten hasta alrededor de la duodécima semana de gestación (Turgeon, 2006; Brandan, 2008).

Hemoglobina fetal

La hemoglobina fetal (Hb F) es la variedad predominante en el feto y el recién nacido. Este tipo de hemoglobina tiene dos cadenas α y dos γ (Peñuela, 2005; Brandan, 2008). Las cadenas γ tienen 146 aminoácidos, al igual que las β ; no obstante, las cadenas γ difieren de las β . Existen dos tipos de cadenas γ que sólo se diferencian en un aminoácido. Puede haber alanina o glicina en la posición 136 de los aminoácidos (Turgeon, 2006).

Al momento del nacimiento, la Hb F representa del 60 al 80% del total de hemoglobina, el resto es Hb A de tipo adulto. La Hb A sustituye a la Hb F en

forma gradual en los eritrocitos circulantes hasta que se alcanza el nivel normal de Hb F en el adulto (menos del 2%). Este proceso ocurre hasta que predomina la hemoglobina normal del adulto, casi siempre alrededor de los seis meses de edad, aunque es posible que persistan elevaciones ligeras durante dos años. En los casos anormales, la retención de Hb F hasta la edad adulta (15 a 30% del total de Hb) se conoce como persistencia hereditaria de Hb F. La determinación de la HbF se utiliza para diagnosticar talasemia, anomalía hereditaria que se caracteriza por anemia microcítica hipocrómica (Fischbach, 1997; Turgeon, 2006).

Hemoglobina A

La hemoglobina A es la principal hemoglobina del adulto normal. Las cadenas de polipeptidos de la parte globínica de las moléculas son de dos tipos: dos cadenas alfa con 141 aminoácidos y dos cadenas beta con 146 aminoácidos cada una (Henry, 2007). En una separación electroforética de una hemoglobina normal en el adulto se evidenció que aproximadamente un 2% consiste en HbA₂, menos del 1% de HbF y el 97% restante HbA (Fig. 6) (Stanley, 1985).

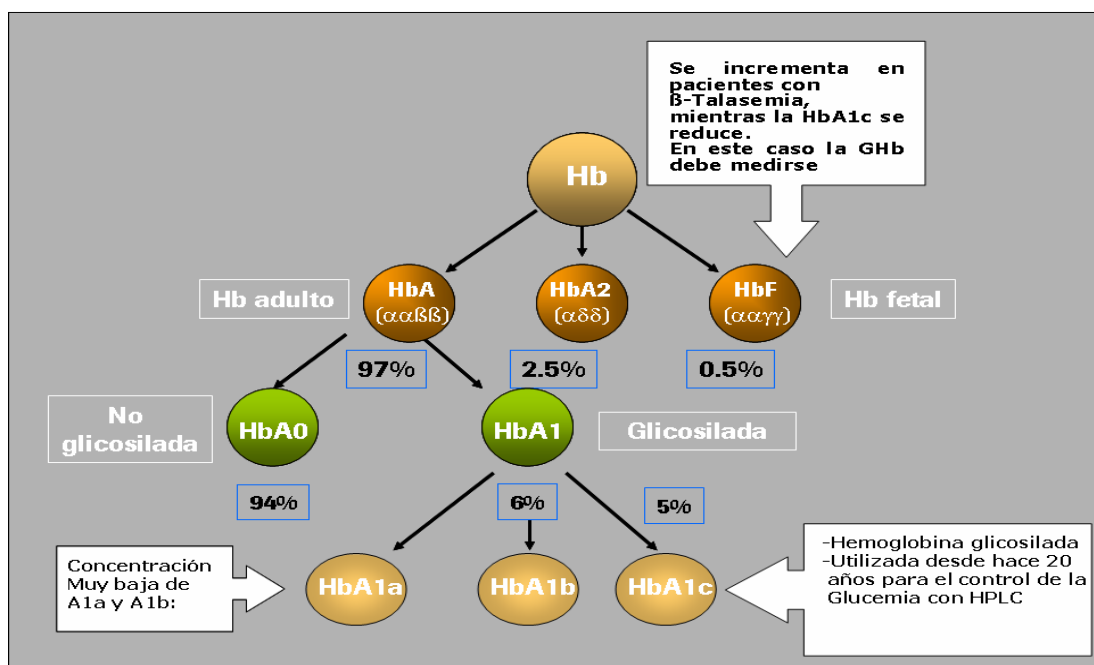


FIGURA 6. Hemoglobinas humanas. Tomado de Hemoglobina glicosilada en www.rochediagnostics.com.ar/.../Hemoglobina%20Glicosilada%20EL%20MAR%20CADOR%20DE%2... el día 17 de marzo de 2009

Hemoglobina A1

Una fracción de la hemoglobina A normal es la hemoglobina A1. Esta fracción puede denominarse hemoglobina glicosilada e incluye las fracciones separadas de hemoglobina A1a, A1b y A1c; esta última tiene la característica de tener una unión con la glucosa mucho más fija y específica (Antuña, 1995). Este tipo de hemoglobina se forma durante la maduración del eritrocito. Como las proteínas son vulnerables a la modificación después de su síntesis en los ribosomas, esta modificación adquiere la forma de glicosilación de la hemoglobina en las personas hiperglucémicas (Turgeon, 2006).

La hemoglobina glicosilada es una hemoglobina estable con estructura igual a la hemoglobina A, excepto por la adición de un grupo carbohidrato en la valina terminal de la cadena β . La concentración de hemoglobina A1 es de 3 a 6% en las personas normales y de 6 a 12% en los diabéticos dependientes y no dependientes de insulina (Turgeon, 2006). La evaluación de HbG tiene una clara ventaja sobre el análisis directo de la glucosa debido a que la medición de hemoglobina glicosilada está libre de las amplias fluctuaciones que se observan durante el análisis de glucosa en sangre. Estas variaciones dependen de diversos factores como el momento del día, el consumo de alimentos y la actividad física (Hemoglobina glicosilada www.rochediagnostics.com.ar...).

Hemoglobina A2

Aunque la hemoglobina predominante en el adulto es la variedad A (95 a 97%), el tipo A2 también se encuentra en pequeñas cantidades (2 a 3%). La hemoglobina A se compone de dos cadenas polipeptídicas α y dos β . La hemoglobina A2 se compone de dos cadenas α y dos cadenas δ . Las cadenas δ difieren de las β en ocho de los 146 aminoácidos. La síntesis de las cadenas δ comienza durante la etapa tardía del desarrollo fetal y el nivel de A2 aumenta durante el primer año de edad hasta alcanzar el nivel del adulto (Peñuela, 2005; Turgeon, 2006).

2.3.2 Formas derivadas de la hemoglobina

La diferencia de estas con respecto a la hemoglobina normal radica sólo en la molécula que sustituye al oxígeno (Turgeon, 2006).

Carboxihemoglobina

El monóxido de carbono, como es un gas estable a temperaturas fisiológicas, se difunde a través de la membrana capilar alveolar y se une a la hemoglobina y otras hemoproteínas como mioglobina y oxidasa de citocromo (Turgeon, 2006). La hemoglobina tiene la capacidad de combinarse con monóxido de carbono en la misma proporción que con el oxígeno, pero la afinidad de la molécula de hemoglobina por el monóxido de carbono es 210 veces mayor. Esta mayor afinidad determina que se una con la hemoglobina para formar carboxihemoglobina aún cuando la concentración de monóxido de carbono sea muy baja. La carboxihemoglobina al desplazar al oxígeno causa hipoxia tisular (Turgeon, 2006; Henry, 2007).

Sulfahemoglobina

Esta variante de la hemoglobina contiene azufre (Turgeon, 2006). Durante la oxidación de la Hb, el azufre que proviene de alguna fuente, se incorpora a los anillos hemo de la hemoglobina para formar un derivado hemocromo verde (Henry, 2007). La sulfahemoglobina no puede transportar oxígeno, pero sí combinarse con monóxido de carbono para formar carboxisulfahemoglobina. La concentración de sulfahemoglobina *in vivo* normal es menor del 1% y pocas veces rebasan el 10% del total de la hemoglobina. Las concentraciones altas causan cianosis, pero por lo demás suelen ser asintomáticas (Turgeon, 2006).

Metahemoglobina

La metahemoglobina se forma cuando el hierro en la porción Hem de la hemoglobina desoxigenada es oxidado hasta su forma férrica, en lugar de su forma ferrosa. En la forma férrica es incapaz de combinarse con oxígeno (Fischbach, 1997). Puede ser resultado de un defecto metabólico o puede

ocurrir porque la estructura de la hemoglobina es anormal a causa de un rasgo autosómico dominante (Turgeon, 2006; Brandan, 2008).

Lo normal es que se forme hasta 2% de metahemoglobina todos los días. La cianosis aparece si el nivel de metahemoglobina rebasa el 10%, la hipoxia aparece cuando los niveles son mayores de 60%. Los lactantes son más susceptibles a la producción de metahemoglobina porque la hemoglobina F es más fácil de convertir en metahemoglobina. Las cantidades elevadas de nitritos en los alimentos, el agua o fármacos pueden aumentar los niveles de metahemoglobina en los lactantes (Turgeon, 2006).

2.3.3 Formas variadas de la hemoglobina

En principio cualquier alteración de la hemoglobina podría decirse que es una hemoglobinopatía. Lo que ocurre es que se prefiere este termino para designar a aquellas situaciones en las que la alteración de la hemoglobina está producida por un simple cambio en un aminoácido de la cadena de globina, por lo tanto, es un cambio cualitativo mientras que las talasemias también incluidas en esta clasificación, se refieren a las situaciones en las que hay defecto total o parcial de la síntesis de una de las cadenas de globina (alteración cuantitativa).

La causa más común de las hemoglobinopatías es la mutación puntual, es decir, la sustitución de un nucleótido de ADN por otro, lo que modifica el código genético y puede inducir un cambio en un aminoácido de la globina resultante, por ejemplo, la anemia de células falciformes (HbS) (Peñuela 2005, Brandan 2008).

En la actualidad se conocen más de 800 hemoglobinopatías, aunque no todas producen problemas clínicos. Las hemoglobinopatías por afectación de la cadena beta son algo más frecuentes que las de la alfa (Brandan 2008).

2.4 GLICOSILACIÓN DE LA HEMOGLOBINA

La vida media de las células rojas o eritrocitos, es de aproximadamente 120 días y se originan en la médula ósea. La cantidad de eritrocitos que se producen diariamente es aproximadamente igual a la cantidad de eritrocitos que se retiran de circulación por parte del hígado y el bazo por lo que la cantidad de eritrocitos en una persona en cualquier momento es casi siempre la misma. Debido a la constante producción de eritrocitos, la cantidad de los recién producidos iguala al número de células que solo tienen dos días de antigüedad, iguala también al número de células que tienen tres días de antigüedad y así sucesivamente por lo que la edad promedio de los eritrocitos de una persona en cualquier momento es de 60 días (Antuña, 1995).

El término glicosilación de proteínas implica una asociación post-traduccional de carbohidratos con polipeptidos en una reacción biológica controlada por enzimas específicas (Stanley, 1985). La glicosilación enzimática proteica, es una modificación que consiste en la unión covalente de oligosacáridos (glicanos) a residuos de aminoácidos situados en secuencias particulares de glicoproteínas. Los glicanos participan en el plegamiento correcto, estabilidad, conformación, vida media circulatoria y función de las proteínas, esto último al formar parte del sitio activo de la proteína o bien como elemento regulador de la interacción glicoproteína-ligando. Se estima que más de la mitad de las proteínas humanas están glicosiladas (Martínez, 2008).

Con el paso de los años se ha descubierto que el carbohidrato reacciona con las proteínas *in vivo* por otra vía, a esta vía se le ha llamado reacción de glicosilación no enzimática (Stanley 1985). En 1978, el término hemoglobina glicosilada fue introducido para referir a una cetoamina que es un producto de Amadori; a su vez la Joint Commission on Biochemical Nomenclature recomienda que el término glicación sea usado en lugar de glicosilación para indicar la reacción de algún carbohidrato con una proteína (Mayer, 1998; Lapolla, 2005). Es así que la palabra Glicación refiere a la conexión carbohidrato proteína (Henry, 2007) sin tener en cuenta la estructura o método

de síntesis (Mayer, 1998), actualmente nos referimos a glicosilación lo cual significa adición solo de glucosa y referimos hemoglobina glicada a toda las especies de hemoglobina derivadas de la reacción de un carbohidrato con la valina o lisina terminal de la cadena alfa o beta de la globina (Lapolla, 2005). Aproximadamente un 5% de la Hb A sufre la glicosilación post-traduccional que origina una unión de azúcares a los residuos de serina, asparagina e hidroxilisina. Las hemoglobinas glicosiladas se han designado como HbA1a (<1%) HbA1b (<2%) y Hb A1c (3%) (Henry, 2007).

Haciendo un poco de historia, en 1955 Kunkel y Walenius separaron la hemoglobina humana en tres fracciones y de acuerdo a su velocidad de migración en una electroforesis denominaron a las fracciones obtenidas de la manera siguiente:

- Fracción mayor o lenta (HbA0)
- Fracción rápida (HbA2)
- Fracción más rápida (HbA1)

Las fracciones HbA1 y HbA2 se conocen desde entonces como hemoglobinas rápidas terminología utilizada hasta la actualidad. Kunkel también observó que a un pH neutro las fracciones tenían carga positiva por lo que al ser colocada en un campo eléctrico se desplazaba hacia el ánodo con mayor rapidez que la HbA. En una cromatografía de intercambio catiónico se ha demostrado que una fracción de la hemoglobina eluye antes que la fracción principal (A(HbA)), a pH neutro tiene carga positiva y que, al colocarse en un campo eléctrico se desplazo hacia el ánodo con mayor rapidez; estas características le adjudicaron el nombre de hemoglobina rápida, bioquímicamente tiene una composición de aminoácidos idéntica a la HbA, con la única diferencia de que detenta una glucosa unida, esta fracción esta a su vez compuesta por tres fracciones (1a, 1b, 1c) (Islas, 2002).

El parámetro de hemoglobina glicosilada fue descubierto por Allen en 1958, pero fue Huisman en 1966 quien observó que había algunas subfracciones de la hemoglobina elevadas en las personas diabéticas y en 1975 Tattersal

descubrió la correlación entre la Hgb A1c y las variaciones de los niveles de glucemia (Antuña, 1998; Manual manejo de insulinas, 2001; Lapolla, 2005).

La hemoglobina glicosilada fue observada por primera vez por Allen y colaboradores en 1958. Cuando buscaban los componentes heterogéneos de la oxihemoglobina por cromatografía intercambiadora de cationes con hemolizados de células rojas, ellos utilizaron desarrolladores a base de cianuro de potasio, sodio, fosfato de sodio y fosfato ácido de sodio y observaron que existía un componente menor que ocupaba cerca del 10% de la hemoglobina total, al cromatografiar nuevamente la zona A1, vieron otras tres zonas, las cuales denominaron por su orden de elución como HbA1a, HbA1b y HbA1c, mismas que se encontraban en proporciones de 1:1:3 (Fig. 7) (Allen, 1958). Sin embargo se conoce que la fracción HbA1a, se puede separar a la vez en subfracciones como la HbA 1a1 y la HbA1a2. Otros científicos han descubierto fracciones adicionales de la hemoglobina A y nombraron a estas fracciones HbA1d una forma *in vitro* de HbA1c formada en condiciones de almacenamiento prolongado (Synchron CX, 2007) y HbA1e de las cuales se desconoce los sitios en los cuales se une el azúcar para formar hemoglobina glicosilada.

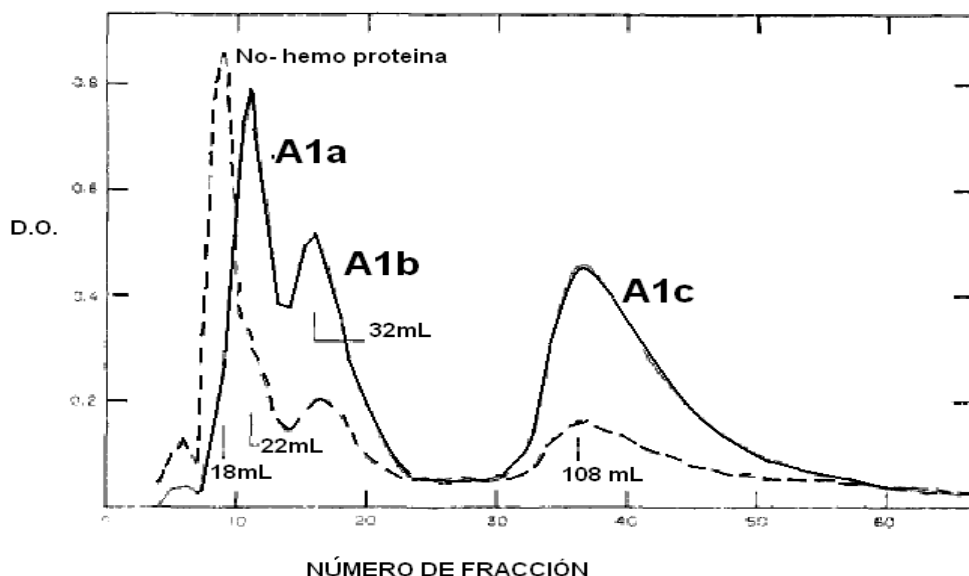


FIGURA 7. Recromatografía de la zona A1, obtenido en los trabajos de Allen y colaboradores. Modificado de Allen, 1958.

Las reacciones de cetamina entre la glucosa y otros azúcares y los grupos amino libres en la cadena α y β originan formas glucosadas de la hemoglobina. Sólo la glicosación de la valina N terminal de la cadena beta proporciona suficiente carga negativa a la molécula de la hemoglobina para permitir la separación por técnicas dependientes de la carga (Fluckiger, 1988; Gardner, 2008). Las hemoglobinas separadas por carga se refieren colectivamente como A1 (HbA1). La forma principal de HbA1 es la hemoglobina HbA1c, donde la glucosa es el carbohidrato (Manual para el manejo de insulinas, 2001; Islas, 2002; Gardner, 2008; <http://www2.ucg.br/cbb/downloads/LABIC/HemoglobinaGlicada.pdf>).

Esta forma comprende 4 a 6% de la hemoglobina total. La HbA1 restante contiene fructosa 1, 6-difosfato (HbA1a1), glucosa 6-fosfato (HbA1a2) y un cantidad de carbohidratos desconocidos (HbA1b) (Tabla 7) (Fluckiger, 1988; Islas, 2002; Gardner, 2008; <http://www2.ucg.br/cbb/downloads/LABIC/HemoglobinaGlicada.pdf>).

TABLA 7. ESTRUCTURA DE LAS HEMOGLOBINAS Y GLICOHEMOGLOBINAS.

Hemoglobina / glicohemoglobina	Estructura
Hemoglobina	
A	$\alpha_2\beta_2$
F	$\alpha_2\gamma_2$
A2	$\alpha_2\delta_2$
Formas glicadas de hemoglobina (glicohemoglobinas)	
A1a1	$\alpha_2(\beta\text{-N-fructosa-1,6-difosfato})_2$
A1a2	$\alpha_2(\beta\text{-N-Glucosa-6-fosfato})_2$
A1b	$\alpha_2(\beta\text{-N-carbohidrato no identificado})_2$
A1c (lábil)	$\alpha_2(\beta\text{-N=glucosa})_2$
A1c (estable)	$\alpha_2(\beta\text{-N-Glucosa})_2$ $\alpha_2(\beta\text{-LysN-glucosa})_2$ $(\alpha\text{-LysN-glucosa})_2\beta_2$ $(\alpha\text{-N-glucosa})_2\beta_2$
HbA-Glc	

Modificado de Fluckiger, 1988.

En 1968 Rahabar observó por primera vez que la hemoglobina glicosilada (HbG) en pacientes con diabetes mellitus e individuos sanos difería en concentración, advirtió que la concentración o valor de esta fracción proteica (A1c) se encuentra elevada de dos a tres veces en individuos diabéticos con respecto a los valores de los individuos sanos. Esta fracción se clasificó posteriormente como una glucoproteína formada por la reacción entre la glucosa y la hemoglobina (HbA) (Mayer 1998; Lapolla, 2005).

El porcentaje de hemoglobina glicosilada refleja las concentraciones de glucosa en los 2 a 3 meses previos. Por lo que es ampliamente aceptada como un indicador de largo tiempo en el control del diabético, sin embargo existe la posibilidad de encontrar la combinación en pacientes de diabetes y variantes en hemoglobina mismas que poseen la capacidad de glicosilarse y formar entonces variantes propias de hemoglobina glicosilada. Estas tendrán que ser cuantificadas para un correcto control de estos pacientes. Las variantes más comunes son: HbF, HbS, HbC y HbE (variantes estructurales genéticamente determinadas en la estructura primaria) todas ellas variaciones o mutaciones de la cadena beta de la hemoglobina HbA0 (Cas, 1993).

Virtualmente toda la hemoglobina en circulación está contenida en el eritrocito, el cual tiene un promedio de vida de 120 días. Durante la vida del eritrocito y debido a la permeabilidad de su membrana a la glucosa, la hemoglobina se incuba con la glucosa de la sangre y siendo ésta una sustancia reactiva el resultado es la glicosilación de los sitios receptivos de los aminoácidos de la hemoglobina (Fischbach, 1997; Barrón, 2000; Islas, 2002). Teniendo en cuenta el promedio de vida del eritrocito, aquellos que estén entre 30 y 90 días de vida son los que van a predominar y como la glicosilación depende de la concentración integrada de la glucosa en el tiempo, la información que proporciona la medición de la hemoglobina glicosilada es el valor, integrado de las ocho semanas precedentes a la toma de la muestra (Islas, 2002). Un numero de estudios ha demostrado que los niveles de Hb glicosilada son proporcionales a los valores de glucosa en el eritrocito (Mayer, 1998).

Hablando de manera más amplia la glicosilación no enzimática de las proteínas en las que se incluye la Hb es un proceso en el cual se da la conexión entre la hiperglucemia y una serie de alteraciones psicopatológicas consideradas importantes en el desarrollo de complicaciones crónicas de la diabetes (Lapolla, 2005).

La reacción esta subdividida en tres principales estadíos: temprano, intermedio y tardío (Fig. 9).

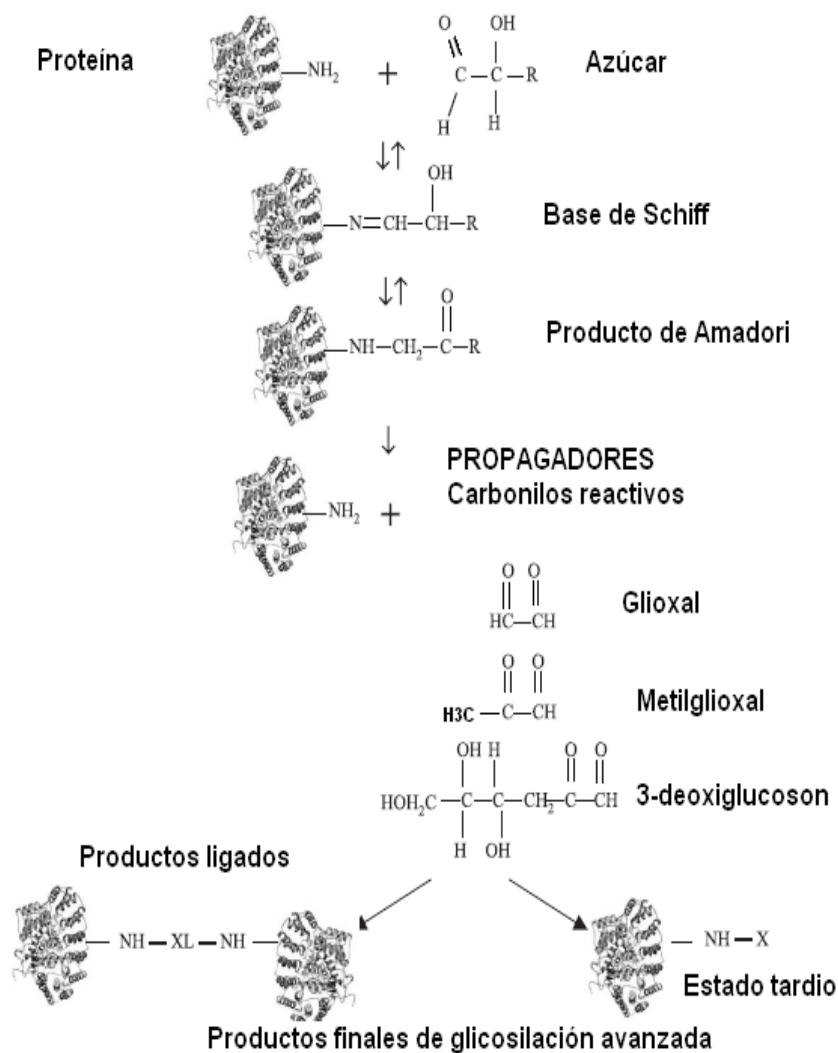


FIGURA 9. Los tres pasos de la reacción de glicación no enzimática. Modificado de Lapolla, 2005.

En el estado temprano la glucosa u otros azúcares como la fructosa, pentosa, galactosa, manosa, ascabarosa, xilosa reaccionan con el grupo amino libre de

algunas moléculas, incluyendo proteínas, ácidos nucleicos, lípidos para formar un compuesto inestable aldimina llamada base de Schiff. A través de un rearrreglo esta base proporciona una cetoamina estable el producto de Amadori.

Debido a que esta reacción no requiere la participación de enzimas, las variables por la cual se regula *in vivo* son la concentración de glucosa y proteínas, el tiempo medio de las proteínas, la reactividad en términos de grupos aminos libres y la permeabilidad celular a la glucosa. En condiciones *in vivo* el producto de Amadori alcanza su equilibrio después de aproximadamente 15-20 días, a través de enlaces irreversibles acumuladas tanto en proteínas de corta vida como de larga vida (Lapolla, 2005).

En el estado intermedio, a través de reacciones de oxidación y deshidratación, los productos de Amadori son degradados en una variedad de compuestos carbonilos (glioxal, metilglioxal, deoxiglucoson) los cuales, son muy reactivos y actúan como propagadores de reacción, reaccionando nuevamente con los grupos aminos libres de las proteínas. En particular el metilglioxal es un muy reactivo alfa-oxaldehído el cual puede formar ambas reacciones que dependen de los niveles de glucosa (glicosilación no enzimática y ruta del poliol) y de productos intermediarios de glicólisis, metabolismo de cuerpos cetónicos y catabolismo de treonina. La alta reactividad y elevadas concentraciones en plasma de metilglioxal indica que es uno de los compuestos más importantes *in vivo* (Lapolla, 2005).

En el estado final, los propagadores nuevamente reaccionan con los grupos amino libres y a través de oxidación, deshidratación y reacciones de ciclización forma compuestos irreversibles usualmente llamados productos finales de la glicosilación avanzada (AGE), los cuales se acumulan a lo largo de la vida de las proteínas y causan daño.

El proceso de adición de la glucosa a la hemoglobina, comienza cuando la glucosa traspasa la membrana celular del eritrocito y la glucosa por un choque físico se une a uno de los tetrámeros de la hemoglobina la formación de la

hemoglobina glicosilada como tal ocurre en dos pasos (Stanley, 1985; Barrón, 2000; Henry, 2007):

1.- El azúcar circulante en la sangre pasa a través de la membrana celular del eritrocito y reacciona con la hemoglobina. En este primer paso la unión a la hemoglobina ocurre rápidamente y esta unión azúcar-hemoglobina involucra una reacción rápida entre la glucosa y la valina terminal de una o ambas de las cadenas beta (Barrón, 2000) (Fig. 10) y es reversible por lo que si la concentración de glucosa decrece la unión reversible se rompe fácilmente (Barrón, 2000; Islas, 2002)

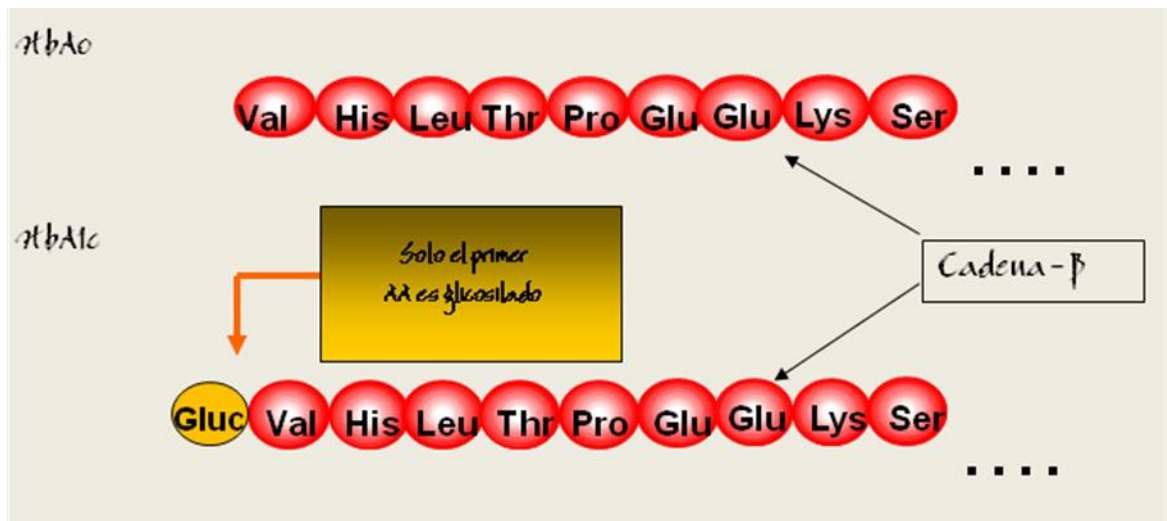


FIGURA 10. “HbA1c es la hemoglobina glicosilada en la porción N-Terminal de la cadena β ”. Tomado de Hemoglobina glicosilada en www.rochediagnostics.com.ar/.../Hemoglobina%20Glicosilada%20EL%20MARCADOR%20DE%2 el día 17 de marzo de 2009.

El producto del primer paso es un intermediario conocido por los nombres, base de Schiff, fracción lábil, pre-A1c o Aldimina (Stanley, 1985; Mayer, 1998; Barrón, 2000; Henry, 2007). El paso número uno es dependiente de la cantidad de glucosa en un momento particular. Si la concentración de glucosa decrece la unión reversible de la base de Schiff se romperá formando hemoglobina y azúcar. Si en los siguientes próximos minutos la concentración de glucosa se incrementa se formará más base de Schiff.

2.- La base de Schiff lentamente se rearrreglará molecularmente para formar una unión irreversible este producto es la hemoglobina glicosilada (Fig. 11) (Stanley, 1985; Barrón, 2000).

Si las altas concentraciones de glucosa persisten, la doble unión de la aldimina, que es sumamente inestable, se arregla a través de una reacción de transposición lenta (rearrreglo de Amadori) formándose un complejo glucosa-proteína de tipo cetamina estable que ya no se descompone y que subsiste durante la vida de la proteína y sólo desaparece por degradación.

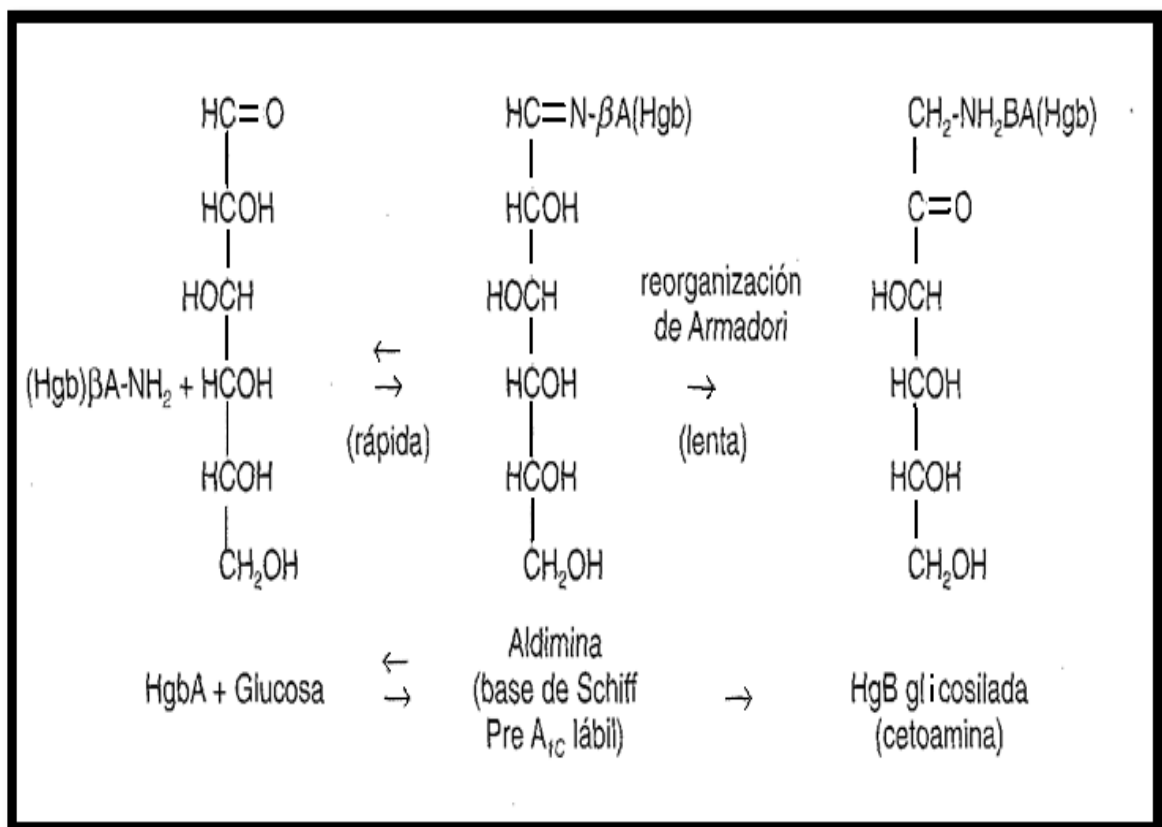


FIGURA 11. Reacción de glicosilación de la hemoglobina. Tomado de Henry, 2007.

La velocidad a la que ocurre la glicosilación está determinada por factores como temperatura, pH, concentración y tipo de proteína, concentración de glucosa y tiempo de exposición. La primera reacción ocurre *in vivo* de minutos a horas. La segunda en cambio, en una reacción que ocurre muy lentamente de días a semanas (Islas, 2002).

2.5 IMPORTANCIA CLÍNICA DE LA DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA

Durante mucho tiempo, las determinaciones de glucemia, bien sea venosa o capilar, fueron las únicas técnicas empleadas para el control del paciente diabético. La medición de la glucemia en ayunas demostró ser sensible a cambios rápidos de hábito, por ejemplo la dieta, porque el ayuno prolongado produce descenso en los valores de glucemia con gran rapidez y el valor obtenido nada dice, o más bien confunde al médico que pretende establecer un diagnóstico del control metabólico logrado con el tratamiento instaurado. Peor aún, por el riesgo de hipoglucemia, que puede ocurrir al ajustar la dosis de hipoglucemiantes orales de acuerdo con los valores elevados, pero poco confiables, de glucemia en el paciente diabético (López, 1997).

En las últimas dos décadas, la comprensión de la naturaleza e importancia clínica de la unión no enzimática entre carbohidratos y proteínas o glicosilación, se ha incrementado. La medición de las hemoglobinas glicosiladas o glicadas se ha convertido en la herramienta más importante para el monitoreo a largo plazo del control diabético (Barrón, 2000).

Las altas y prolongadas concentraciones de glucosa en la sangre, características de la diabetes provocan una modificación química de las proteínas tanto estructurales como de transporte, cambios que inicialmente originan alteraciones funcionales y posteriormente estructurales, que pueden observarse en los tejidos. Los tiempos en los que ocurren estos cambios son variables y dependen de factores como magnitud o gravedad de la reacción, duración de ésta, así como de la deficiencia de los mecanismos biológicos de reparación y la sensibilidad individual.

Son numerosas las sustancias que pueden reaccionar con la glucosa, pero son las proteínas de transporte las que han demostrado tener valor diagnóstico o pronóstico. Esto depende no sólo de su fácil obtención y por contar con tiempos de vida y conversión bien definidos que permiten calcular su cinética de formación, sino porque se conoce bien su cinética de desaparición. Entre

ellas las que hoy en día se utilizan para conocer el valor integrado del promedio de las concentraciones de glucosa en sangre en un lapso determinado de tiempo son la hemoglobina glicosilada y la albúmina glicosilada mejor conocida como fructosamina (Islas, 2002).

HEMOGLOBINA GLICOSILADA

La prueba de hemoglobina glicosilada cuantifica la cantidad de hemoglobina que tiene azúcar, ofrece un objetivo índice retrospectivo del nivel promedio de glucosa en sangre en los meses precedentes (hasta tres meses) (Islas, 2002; Gardner, 2008). Se trata de un marcador del control metabólico en los pacientes con diabetes mellitus, pero no sirve para diagnosticar la enfermedad (Barrón, 2000; Sánchez, 2000; Gardner, 2008; Análisis de la glucemia: www4.ujaen.es...pdf) ya que aunque una HbG elevada es indicativa de hiperglucemia es muy insensible para descartar intolerancia a la glucosa o diabetes moderada (Barrón, 2000; Gardner, 2008); y no puede sustituir al monitoreo de glucemias, ya que ésta no puede medir su control diario y por lo tanto no permite ajustar las dosis de insulina e ingesta de alimentos en el día a día (López, 1997; Hemoglobina glicosilada: www.rochediagnostics.com.ar...). Sin embargo, una cifra por arriba de lo normal en laboratorios certificados suele ser un indicador específico de diabetes mellitus (Gardner, 2000). Así que esta prueba complementa las pruebas de rutina del control diario hecho en casa por los pacientes diabéticos con pruebas de sangre u orina. No obstante la Hb glicosilada presenta mayor especificidad en detectar mal control metabólico de los pacientes (Fig. 12) (López, 1997).

Resulta especialmente útil en determinados grupos de pacientes como niños diabéticos, diabéticos con umbral renal anormal para glucosa, diabéticos insulino dependientes inestables cuya glicemia varía considerablemente cada día, diabéticos tipo 2 que se embarazan e individuos quienes, antes de sus citas, cambian sus hábitos para que su control metabólico se aparente mejor (Fischbach, 1997; Sánchez, 2000).

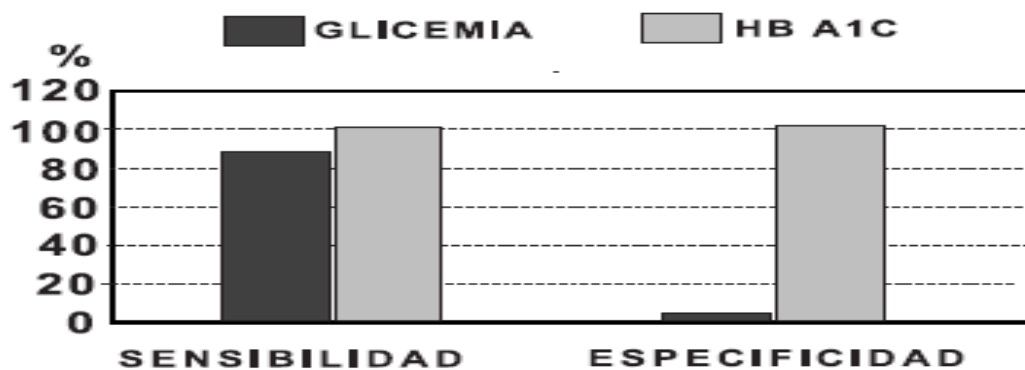


FIGURA 12. Sensibilidad y especificidad de la glicemia venosa en ayunas y la Hb A1c en detectar mal control metabólico. Tomado de López, 1997.

La importancia de la hemoglobina glicosilada en el control de la diabetes fue reconocida en el año 1986, cuando la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomendó el uso de dos medidas anuales de hemoglobina glicosilada para realizar el seguimiento de la patología. En el año 1993 se presentaron los resultados de un trabajo conocido como Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes (Diabetes Control and Complications Trial o DCCT). En esta investigación se observó por primera vez que la reducción en el valor de la hemoglobina glicosilada estaba asociada con una disminución en el riesgo de desarrollar complicaciones de la diabetes a largo plazo (Hemoglobina glicosilada: www.rochediagnostics.com.ar...).

La HbG es especialmente valiosa porque los valores de la prueba pueden ser relacionados con promedios específicos de niveles de azúcar en sangre, y puede ser usada para distinguir pacientes diabéticos de individuos sanos y para controlar los valores promedio de los niveles de glucosa en sangre de pacientes diabéticos. En la medida en como un paciente no responde a determinado tratamiento los niveles de HbG van en aumento, y si sobrepasa los límites normales indica que pueden presentar progresión hacia complicaciones crónicas de la enfermedad a diferentes niveles, ocular, renal y cardiovascular, en forma más rápida (Fig. 13) (López, 1997; Sánchez, 2000), de manera análoga se da el uso de las determinaciones de colesterol para predecir el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (Barrón, 2000).

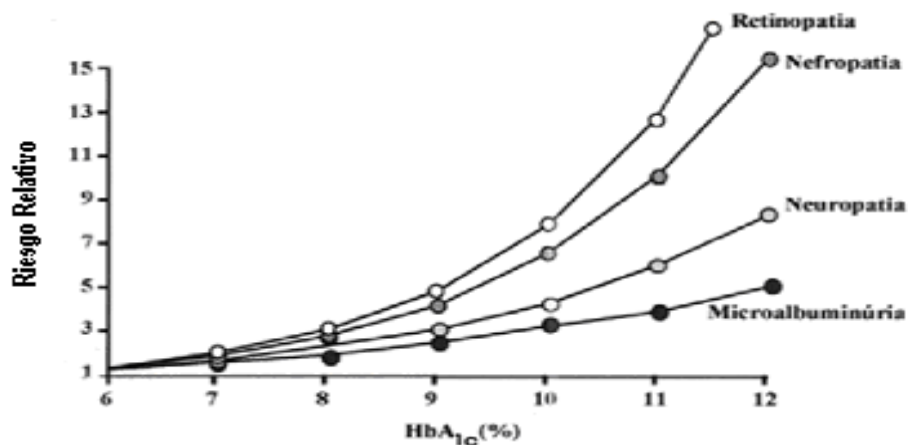


FIGURA 13. Relación de HbA1c y riesgo de complicaciones microvasculares. Tomado de Hemoglobina glicada en <http://www2.ucg.br/cbb/downloads/LABIC/HemoglobinaGlicada.pdf> el día 13 de marzo de 2009.

La HbA1c es la mejor prueba disponible que refleja el control glucémico del paciente diabético. Esta prueba ha permitido estratificar a los pacientes en categorías de riesgo para desarrollar complicaciones microvasculares, por lo que sirve para evaluar y pronosticar el futuro de los pacientes. También ayuda a intensificar a tiempo la terapia de control de la DM (control glucémico), así como a identificar los casos que requieran atención especial (enfoque de riesgo) (Lacé, 2004). Aunque no se ha podido encontrar un cierto nivel de HgbA1c que garantice una protección absoluta de las complicaciones tardías, existen varios trabajos que al menos, sugieren que existiría un “nivel crítico” que correspondería a una HgbA1c superior a 8%, a partir del cual, el riesgo sería inaceptablemente elevado (Fig. 14) (Antuña, 1995).



FIGURA 14. Medida de nivel de riesgo conforme al porcentaje de HbA1c. Tomado de Antuña, 2001.

La determinación de esta prueba es de gran importancia, lamentablemente su uso ha predominado a nivel hospitalario, en donde la mayoría de los pacientes ya tienen las complicaciones crónicas de la DM, por lo que un monitoreo de control con esta prueba, aunque es de utilidad, no produce el beneficio de prevención secundaria que podría darse en los diabéticos que se manejan en atención primaria (Laclé, 2004).

Es muy importante la educación sanitaria del paciente, la información y adiestramiento necesarios para responsabilizarse del control de su enfermedad y favorecer su autonomía, la reducción de comas diabéticos, amputaciones y días de hospitalización. Cambiar los hábitos alimentarios del diabético, y contribuir a prevenir y tratar las complicaciones, tanto agudas como crónicas, la realización de ejercicio físico son la base fundamental del plan terapéutico y darle una mejor calidad de vida, debido a que la causa de muerte no es debida a la DM2 en sí, sino su mal control que condiciona a enfermedades cardiovasculares con riesgo de insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, retinopatías, etc.

Esta especificidad permite a los médicos ayudar a sus pacientes a establecer metas diarias de cuidado en la dieta. Los resultados pueden diferir considerablemente de la historia médica o de los registros de niveles de concentración de glucosa en sangre y ayudar a aquellos pacientes que han tenido dificultades en controlar su diabetes (López, 1997).

Recientemente, se ha postulado que la hiperglucemia sostenida favorece la autooxidación de la glucosa por disminución del óxido nítrico, lo cual causaría desbalance en los mecanismos de oxidación y antioxidación que conllevaría a hiperproducción de radicales libres de oxígeno (RLO), ocasionando disturbios en la mecánica metabólica de muchos tejidos. La glucotoxicidad es responsable de manifestaciones tardías en la diabetes debido a la glicosilación no enzimática de proteínas y/o enzimas importantes en los procesos de eliminación de radicales libres (Lapolla 2005) tales como la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión

reductasa, a la generación exagerada de polioles y a la alteración del índice oxidación/antioxidación (producción excesiva de radicales libres). Los pacientes con diabetes mellitus no controlados exhiben actividad de SOD y de GPx y de antioxidantes totales menores que los pacientes controlados (Tabla 8) (Guerra, 2005).

TABLA 8. PROMEDIO Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD) U/gHb Y DE GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx) U/gHb DE PACIENTES SANOS, DIABÉTICOS TIPO 2 CONTROLADOS Y NO CONTROLADOS EN UN ESTUDIO REALIZADO EN BOGOTÁ D.C.

	SOD (U/L)		U/gHb		GPx (U/L)		U/gHb	
	X	S	X	S	X	S	X	S
Pacientes sanos	219,5	± 27,8	1453,9	±238,3	5871,6	±1572,6	39,2	± 8,8
Controlados	204,7	± 31,8	1393,5	±243,3	5649,9	±1474,1	38,6	± 10,6
No controlados	118,3	± 41,5	814,4	±332,0	3420,6	±1321,4	23,2	± 8,9
Valor de referencia	164 - 240		1092 - 1817		4171 - 10881		27,5 - 73,6	

Tomado de Guerra, 2005.

Algo que también se ha demostrado es que los cambios recientes contribuyen más que los distantes. El resultado de la Hgb A1c no es únicamente una simple media de los niveles de glucosa durante un periodo de tiempo sino que se trata de una media ponderada con lo que los resultados se ven mucho más influenciados por la mayor representación en la sangre de los hematíes más jóvenes y por eso se acepta que solamente el grado de control del último mes contribuye al 50% del resultado (Manual manejo de insulinas, 2001); mientras que el control de los 3 a 4 meses previos contribuye sólo con 10% (Antuña, 1995; Islas, 2002; <http://www2.ucg.br/cbb/downloads/LABIC/HemoglobinaGlicada.pdf>). Por ello la rápida mejoría inicial de los pacientes recién diagnosticados es acompañada por un rápido decremento de la hemoglobina glicosilada en los 2 primeros meses, seguida de un descenso gradual a los 4 meses (Islas, 2002).

Es recomendable realizar esta determinación cuatro veces al año en el paciente con DM1 y dos veces al año el paciente con DM2 en algunos casos particulares como las embarazadas diabéticas puede realizarse cada tres meses (Antuña, 1995; Barrón, 2000; Sánchez, 2000; Manual manejo de insulinas, 2001), y complementarla con el control periódico de glucosa sérica o sanguínea. Es útil para contribuir al control de largo plazo que constituye la base para poder realizar ajustes apropiados en el tratamiento, pero además se relaciona con el control de las complicaciones como un factor de riesgo en el desarrollo de complicaciones tisulares (Sánchez, 2000; Islas, 2002).

Con la determinación de HbG se confirman las coincidencias o discrepancias entre los resultados de la autovigilancia que realiza el paciente y el verdadero grado de control. La determinación de hemoglobina glicosilada es muy útil en pacientes con diabetes gestacional ya que contribuye a corroborar la autovigilancia de la glucosa sanguínea o las determinaciones realizadas en el laboratorio. En el embarazo temprano de mujeres con diabetes tipo 1 esta determinación ha demostrado ser un indicador de malformaciones congénitas, por lo que se recomienda su determinación cada 6 semanas.

El curso exacto de la glicosilación de la hemoglobina durante el embarazo todavía no ha sido completamente comprendida. El embarazo afecta la masa de glóbulos rojos, su tiempo de supervivencia, la reserva de hierro y la tolerancia a la glucosa. En el embarazo normal hay una caída progresiva en la glucemia de ayuno aunque los niveles postprandiales de glucosa son relativamente altos al final de la gestación. Los efectos combinados de estos cambios sobre la HbG parecen resultar en una caída inicial en la HbA1c de la décima a la 24^a semanas de gestación y a partir de entonces a una elevación durante el tercer trimestre. Además los valores postparto son significativamente mayores que los que tienen las mujeres normales embarazadas y no embarazadas (Barrón, 2000).

Miller y colaboradores del Centro Joslin de Diabetes estudiaron 116 mujeres diabéticas tipo 1 embarazadas para determinar si había correlación entre los

valores de HbG y la incidencia de anomalías congénitas en los productos y encontraron una fuerte correlación. Ninguna de las mujeres con HbA1c menor de 6.9% (n=19) y solo 3.4% (n=58) de las que tenían HbA1c menor de 8.5% tuvieron bebés con anomalías congénitas. En contraste 22.4% (n=58) de las mujeres con una HbA1c mayor de 8.5% tuvieron hijos con malformaciones congénitas mayores. Este estudio demostró que el valor de HbG es un importante parámetro para determinar retrospectivamente el grado de control glicémico (Barrón, 2000).

En un estudio similar realizado en México por Gómez Cruz y colaboradores se determinó la hemoglobina glucosilada y la glucosa en 160 mujeres que hubieran tenido un embarazo ≥ 28 semanas de gestación para demostrar la asociación entre factores de riesgo y hemoglobina glucosilada anormal detectada en mujeres en el puerperio inmediato (comprendió las primeras 24h posteriores al parto). No se incluyeron pacientes con diabetes mellitus tipos 1 y 2, embarazo múltiple con dos vías de canalización (recibieron solución glucosada) o quienes recibieron una transfusión sanguínea una semana previa al estudio.

Esta investigación mostró una frecuencia elevada de HbG anormal (HGA), primero (30.2%) en mujeres menores de 26 años lo que implicaría que mujeres relativamente jóvenes podrían padecer DMG en sus próximos embarazos. En las mujeres solteras, divorciadas y separadas mostraron una asociación significativa con HGA, lo cual sugeriría que probables condiciones emocionales de estrés u otras alteraciones en su conducta e incluso su dinámica.

Otro hallazgo de interés fue que la proporción de malformaciones congénitas resultó ser significativamente mayor en hijos de mujeres con HGA con riesgo epidemiológico elevado, estos hallazgos sugieren que la HGA es una afección subclínica que podría coincidir con cambios metabólicos o fisiopatológicos suficientes para producir mayor frecuencia de malformaciones congénitas en semejanza con lo que ocurre en mujeres diabéticas en quienes estas

malformaciones ocurren con una frecuencia 2 a 3 veces mayor que en mujeres normales (Gómez, 2005).

De aquí que emanen diversas ventajas referentes a esta determinación, que además de ayudar en el control de pacientes embarazadas también, es un criterio de calidad del control de la DM que evidencia la condición glucémica de las 6 a 8 semanas previas, proporcionando información objetiva que es accesible por otras fuentes, (historia clínica, pruebas de glucosa al azar y automonitoreo de Glc sanguínea). Puede ser usada para distinguir pacientes diabéticos de individuos sanos. Evalúa los efectos de cambios en la terapéutica y exactitud de la autovigilancia e identifica requerimientos de insulina en pacientes con riesgo de hipoglucemia. Es útil para discriminar el diagnóstico de intolerancia a la glucosa.

La determinación no se afecta por cambios agudos, tiene la ventaja de que la muestra se puede tomar a cualquier hora del día sin que se requiera la preparación previa del paciente, es decir no necesariamente debe tomarse en ayuno (Antuña, 1995; Barrón, 2000; Sánchez, 2000; Manual manejo de insulinas, 2001; Islas, 2002); la muestra de sangre total se puede conservar en refrigeración a 4°C hasta una semana antes de realizar la determinación o durante meses a -70°C. De acuerdo con el equipo con que se cuente, la determinación se realiza en una muestra de sangre obtenida con EDTA que posteriormente será hemolizada o en sangre capilar (Islas, 2002).

Varias técnicas analíticas de medición han sido descritas para medir esta fracción importante de la hemoglobina. A su vez como la fracción medida depende directamente de la técnica utilizada, esto ha resultado en que los laboratorios midan diversas fracciones de la hemoglobina HbA1, HbA1c, y la hemoglobina glicosilada total de acuerdo a la técnica utilizada (Hemoglobina glicosilada: www.rochediagnostics.com.ar...).

Se ha establecido que el valor normal de hemoglobina glicosilada A1c es de 3 a 6 % y 5 a 8% el de la HbA1 en términos absolutos, los valores de HbA1 son

1-2% superiores a las de HbA1c (Islas, 2002); otros interpretan que es de 2-4%, por tanto hay que asegurarse del tipo de prueba que se está utilizando (Sánchez, 2000) y también determinan que un 1% de cambio de los niveles de la HbA1c o de la HbA1 corresponde a un cambio en el promedio de la glucosa sanguínea de 35 mg/dl (Islas, 2002).

David E. Goldstein y colaboradores realizaron diversos estudios para correlacionar un valor particular de HbG con el nivel plasmático de glucosa correspondiente. Ellos establecieron que un cambio de 1% en la hemoglobina glicosilada significa un cambio en la concentración media de la glucosa en sangre de 30 a 35 mg/dL (Barrón, 2000) y establecieron que, independientemente de la metodología utilizada para la determinación, los valores de HbG mayores de 3% por arriba del límite superior indican un valor promedio de glucosa sanguínea mayor de 200mg/dl (Fig. 15) (Barrón, 2000; Islas, 2002).

**RELACION ENTRE HgbA1c
Y GLUCEMIAS EN EL DCCT**

% HgbA1c	GLUCEMIAS MEDIAS
4	60
5	90
6	120
7	150
8	180
9	210
10	240
11	270
12	300
13	330

FIGURA 15. Relación entre niveles de glucemia y hemoglobina glicosilada. Tomado de Antuña, 1995.

Si se considera que los niveles de glucosa sanguínea tienden a aumentar con la edad aún en los individuos no diabéticos, en los pacientes de edad avanzada valores de HbA1, de 8-9% pueden relacionarse con un nivel aceptable de control (Islas, 2002).

Los valores de hemoglobina A1c, considerados como normales, varían entre 4.50% y 6.20% según (UKPDS), un valor de Hemoglobina A1c de 6 %, por ejemplo, significa que el 6 % de la Hemoglobina A del paciente esta enlazada a glucosa. Para evaluar el control metabólico del paciente diabético se utilizan diversos criterios de clasificación de acuerdo al organismo o sistema que se utiliza, por tanto es un poco variable considerar un solo rango de fluctuación. De esta manera la OMS considera como “control metabólico bueno u optimo” una hemoglobina glicosilada en menor a 6.5 % y “control metabólico aceptable” de 6.5-7.5% y “deficiente” por encima del 7.5% (Antuña, 1998; Manual para el manejo de las insulinas, 2001). El rango de referencia de Hb A1c para una persona no diabética es de 4-6 %.

Los siguientes valores discriminantes (Tabla 9) han sido establecidos y aceptados en varios países para la población no diabética y para la evaluación del grado de control de la glucosa en sangre en pacientes diabéticos (Bio Systems, 2007).

TABLA 9. VALORES DE REFERENCIA ESTABLECIDOS POR ALGUNAS ORGANIZACIONES.

Glucemia en ayunas (mg/dl)	Glucemia a las 2 hs. post PTOG	Hemoglobina glicosilada		Grado de control
		DCCT / NGSP	IFCC	
<100	<140	4.0 – 6.0	2.0 – 4.2	No diabético
<126	<160	6.0-6.5	4.2-4.8	Objetivo Adecuado
126-140	<180	6.5-8.0	4.8-6.4	Admisible
>140	>180	> 8.0	>6.4	Precisa acción (inadecuado)

NGSP (programa Nacional en Estandarización de Glicohemoglobina); IFCC (Federación Internacional de Química Clínica), DCCT (Ensayos en Control y Complicaciones de Diabetes). Modificado de Bio Systems, 2007; y <http://www.biodiagnosics.com.mx/bc/216.php> el día 03 de junio de 2009.

De manera general se pueden encontrar pacientes con diabetes tipo 1 que tienen valores promedio de HbA1c, de 8-9% y de HbG de 10-11% que corresponden a valores promedio de glucosa de 200 mg/dl (11.1 mmol/L). Los adolescentes presentan valores 0.5-1.0% mayores, con glucosa sanguínea de 20-40 mg/dl por arriba de los valores de los adultos. El 95% de los pacientes tienen HbA1c de 5-13% y HbG de 6-15%.

Es importante señalar que una de las desventajas de la determinación de este parámetro bioquímico es que no exista una estandarización de la determinación de HgbA1c, y que los valores de referencia difieren sustancialmente de un laboratorio a otro y están en función de la metodología utilizada, por lo que carece de un estándar de oro como tal para la hemoglobina glicosilada, por lo que el paciente deberá conocer previamente los valores normales de su laboratorio (Antuña, 1995; López, 1997; Islas, 2002).

Es importante que el laboratorio utilice métodos que separen adecuadamente los productos glicosilados lábiles y que no incluyan otras proteínas glicosiladas. Debido a que las fracciones lábiles son reversibles y estarán aumentadas con las concentraciones elevadas de glucosa sin ser realmente indicadoras del estado glucémico a largo plazo (Islas, 2002). Existen diferentes métodos para cuantificar la proporción de la HbA1c, entre éstos están la cromatografía (HPLC, cromatografía de intercambio iónico, Cromatografía de afinidad, Métodos inmunológicos con lectura por turbidimetría y Electroforesis-Isoelectroenfoque (Sánchez, 2000; Hemoglobina glicosilada: www.rochediagnostics.com.ar...).

Existen además condiciones clínicas que modifican el recambio de glóbulos rojos y puede interferir en el resultado de la hemoglobina glicosilada, estas situaciones pueden acortar la supervivencia de los eritrocitos y por tanto alterar el resultado, como son esplenectomía, deficiencia de hierro, uremia, hiperbilirrubinemia, alcoholismo, intoxicación por plomo, adicción a opiáceos y dosis elevadas de salicilatos. Condiciones que pueden disminuir los valores de HbG son las anemias hemolíticas y el embarazo (Antuña, 1995; Mayer, 1998;

Barrón, 2000; Manual manejo de insulinas, 2001). Se reporta que la vitamina C y E disminuyen en forma falsa los resultados de la prueba, posiblemente al inhibir la glicación de la hemoglobina (Mayer, 1998; Gardner, 2008). Además de ciertas personas con hemoglobina variantes (HbS, HbC, o HbD) (Manual manejo de insulinas, 2001; <http://www2.ucg.br/cbb/downloads/LABIC/HemoglobinaGlicada.pdf>).

FRUCTOSAMINA, DETERMINACIÓN DEL CONTROL GLUCEMICO A CORTO PLAZO.

En los últimos años se ha incorporado el uso de otro ensayo auxiliar a la hemoglobina glucosilada en el control del paciente diabético este ensayo es la Fructosamina (Gardner, 2008).

Es una técnica que mide colorimétricamente las proteínas séricas glicosiladas, y que incluye a la albúmina, las inmunoglobulinas y las proteínas transportadoras, de esta manera la concentración de fructosamina está directamente relacionada con la concentración y composición de las proteínas sanguíneas.

Las proteínas séricas, entre las cuales la que se encuentra en mayor concentración es la albúmina, también reaccionarían con la glucosa para formar aldíminas, que por un rearrreglo de Amadori forman una cetoamina (Mayer, 1998; Barrón, 2000; Islas, 2002).

Debido a que la albúmina sérica tiene una vida media mucho más corta (14 a 21 días) que la hemoglobina, la fructosamina sérica por lo general refleja el estado de control glucémico durante las últimas dos semanas (Gardner, 2008; Análisis de glucemia: www4.ujaen.es...pdf). Un incremento o disminución prolongado de las concentraciones de proteínas plasmáticas va a inducir modificaciones en la concentración de fructosamina, (p. ej. estado nefrótico o enfermedad hepática) disminuyendo el valor de la determinación (Gardner, 2008).

La fructosamina correlaciona bien con HbG y sus niveles no son afectados por la hiperlipidemia, los opiáceos, la edad o las enfermedades crónicas (Barrón, 2000).

Debido a la vida relativamente corta de estas proteínas séricas la concentración media de la glucemia sólo puede valorarse durante un periodo más corto de aproximadamente 1 a 2 semanas retrospectivamente. Al contrario de la hemoglobina glicosilada que es considerada como “memoria a largo plazo” de glucemia ya que refleja el nivel medio de la glucemia de las 4 a 6 semanas pasadas, la fructosamina puede caracterizarse como “memoria a corto plazo” de la glucemia; de esta forma es ventajosa cuando es necesario comprobar cambios de la situación metabólica que se producen a corto plazo (Manual manejo de insulinas, 2001), en ciertas situaciones clínicas como el embarazo y posiblemente en el monitoreo de los pacientes en regímenes intensificados de terapia insulínica (Barrón, 2000).

Su empleo clínico actual aún no está muy generalizado y al igual que las hemoglobinas glicosiladas, las sustancias antioxidantes potentes como las vitaminas C y E parecen disminuir en forma global el proceso de glicosilación de todas las proteínas.

Entre las ventajas que tiene se encuentra que evidencia el nivel medio de glucemia en los 10 a 20 días anteriores a la toma de la muestra, responde rápidamente a los cambios en la terapéutica, es un criterio para establecer las condiciones del control de la glucemia y es clínicamente útil en la vigilancia de la diabetes gestacional (Islas, 2002).

Existen varios métodos para su determinación, los más empleados son:

- a) El colorimétrico con nitroazul de tetrazolio, ácido tiobarbitúrico, con fenilhidrazina o con furazina
- b) por afinidad cromatográfica

Los valores encontrados en individuos sanos y que se reportan en la literatura tienen un intervalo entre 204 y 289 mmol/L con una media de 247 mmol/L (Barrón, 2000).

El más utilizado es el método colorimétrico (espectrofotométrico) basado en la reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (nitro blue tetrazolium (NBT)) por acción de la fructosamina, produciendo un compuesto que absorbe a 525 nm (Lapolla, 2005; Análisis de glucemia: www4.ujaen.es...pdf).

Fructosamina + nitroazul de tetrazolio → reducción del colorante
Lectura en espectrofotómetro (530nm)

Desafortunadamente la reacción con NBT no es específico para la unión de esta cetoamina, también reduce otros agentes en el suero, como el ácido ascórbico, ácido urémico y el glutatión pueden interferir con la medición. Hay otras sustancias que también absorben a esa absorbancia, como bilirrubinas y triglicéridos, cuando presentan concentraciones elevadas en el suero pueden interferir con la medición y causar valores elevados de fructosamina.

Por tal motivo hay que contemplar las limitaciones de esta prueba y sólo ser usada en situaciones particulares por ejemplo, las ya mencionadas, indicaciones de cambio en el control de la glicemia a corto tiempo, en la vigilancia de diabéticas embarazadas y cuando los factores alteran la supervivencia de las células rojas e influyen en la interpretación de los niveles de HbA1c (hemoglobinopatías o anemias hemolíticas) (Lapolla, 2005).

Como conclusión se puede decir que el análisis de fructosamina y hemoglobina glicosilada es de gran utilidad en el seguimiento del control y tratamiento de personas con diabetes mellitus; si bien es importante conocer el historial clínico, así como el perfil hematológico y bioquímico del paciente. La elección de analizar la fructosamina o la hemoglobina glicosilada estará en función de las características y posibilidades analíticas del laboratorio, así como del número de muestras a analizar.

CAPÍTULO 3. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

3.1 GENERALIDADES

La medición de los productos surgidos de la reacción de glicosilación no enzimática tiene un doble significado, por un lado medir los productos tempranos de glicación dependientes de la vida media de las proteínas glicosiladas, las cuales son medidas y proporcionan una estimación de su exposición a la glucosa y de alguna manera el control metabólico previo; por otro lado también, medir los intermediarios y productos finales de esta reacción el cual es un instrumento importante en la verificación y relación entre los productos de glicación y las modificaciones tisulares, aclarando la patogénesis de las complicaciones crónicas y la asociación de la exposición a la glucosa y su desarrollo.

La medición del estado temprano de los productos de glicosilación (producto de Amadori) es normalmente utilizada en la evaluación del control metabólico en pacientes con diabetes. Los dos parámetros comúnmente usados son HbA1c y proteínas del suero glicadas como la fructosamina. La medición de los productos intermedios de la glicosilación así como los productos finales (AGE) tienen una importancia especial. Los primeros son medidos por métodos específicos como HPLC, cromatografía de gas y espectrometría de masas. Los AGE son medidos por métodos espectroscópicos y fluorimétricos y actualmente por RIA y ELISA utilizando anticuerpos policlonales (Lapolla, 2005).

La importancia de la hemoglobina glicosilada en el control de la diabetes fue reconocida en el año 1986, cuando la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomendó el uso de dos medidas anuales de hemoglobina glicosilada para realizar el seguimiento de la patología. En el año de 1993 se presentaron los resultados de un trabajo conocido como Estudio de Control y Complicaciones de la Diabetes (Diabetes Control and Complications Trial o DCCT) (Hemoglobina glicosilada: www.rochediagnostics.com.ar...).

En esta investigación, se demostró que las complicaciones diabéticas pueden ser prevenidas en muchos de los casos, y cuando ya están presentes, su evolución y consecuencias pueden ser influenciadas positivamente con un mejor control glucémico (Manual para el manejo de insulinas, 2001); sin embargo la evaluación precisa del control de la glucosa es una de las mayores dificultades en el mantenimiento de personas diabéticas, dependientes de la calidad de vida y condiciones de ésta (Glyco-Tek en www.helena.com).

Se sabe que tanto el pronóstico como la calidad de vida de las personas con diabetes van a depender en gran parte de las complicaciones crónicas que se asocian a esta enfermedad metabólica. Las buenas noticias del DCCT y otros estudios son que el curso y la severidad de estas complicaciones pueden mejorar si se logra un buen control metabólico. La hemoglobina glicosilada es una herramienta fundamental y muy eficaz para valorar el grado de control (Manual para el manejo de insulinas, 2001).

Lamentablemente el uso de diferentes metodologías y la fracción que se determine hacen imposible la comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. Con respecto a lo anterior en un estudio realizado por Méndez y colaboradores compara los resultados de varios laboratorios para la misma muestra biológica. Encuentran una alta estabilidad, medida por el coeficiente de variación, para casi todas las pruebas, sin embargo se observan diferencias significativas en los promedios en los laboratorios, es decir existen sesgos en la medición de biomarcadores especialmente para hemoglobina glicosilada. Las diferencias observadas entre los distintos laboratorios refuerzan el concepto de la variabilidad dependiente tanto 1) del paciente, como 2) del analito y 3) del método de análisis (Méndez, 2007).

En cuanto a la dependencia del paciente, esto se refiere más que nada a la condición en la que se encuentre, es decir que tanto tiempo lleva de progresión en la enfermedad y su condición de vida, raza, si se encuentra en un hospital o no, si la diabetes cruza con alguna otra enfermedad que altere la vida media de los eritrocitos, esto es debido a que actualmente vivimos en un mundo en

donde la mayoría de la población se mueve para lugares que satisfagan su calidad de vida, es así que podemos encontrar combinación de culturas, grupos sociales y personas de otro país que viven muy cerca del lugar de trabajo donde se llevan a cabo las determinaciones, y como cualquier persona todos ellos pueden llegar en algún momento a solicitar una determinación de hemoglobina glicosilada.

Es en estas condiciones cuando nos enfrentamos a la variabilidad de muestras sobre todo si existe la posibilidad de encontrar la combinación en pacientes de diabetes y variantes en hemoglobina, mismas que poseen la capacidad de glicosilarse y formar entonces variantes propias de hemoglobina glicosilada. Se han identificado muchos otros tipos de hemoglobina, de esta forma se altera la proporción de la normal, pero se conocen como hemoglobinas variantes o anormales (Turgeon, 2006). Estas tendrán que ser cuantificadas para un correcto control de estos pacientes. Las variantes más comunes son: HbF, HbS, HbC y HbE (variantes estructurales genéticamente determinadas en la estructura primaria) todas ellas variaciones o mutaciones de la cadena beta de la hemoglobina HbA0 (Weykamp, 1993).

Una segunda variable y que está muy ligada a la calidad de vida del paciente así como su herencia es el analito, es decir la muestra a analizar se ha visto además que existe interferencia con otras sustancias que no son glucosa, en particular la carbamiloación en la uremia con penicilina o aspirina en grandes cantidades y con los metabolitos en el alcoholismo (se forma HbAA, producida por la adición de acetaldehído a la hemoglobina) se produce coelución con la HbA1a+b (www.diabetesjuvenil.com).

De igual forma en pacientes con anemia hemolítica, pérdida aguda de sangre, esplenectomía y embarazo; procesos en los que hay un mayor recambio eritrocitario y por lo tanto una disminución en la edad promedio de los eritrocitos, se dan interferencias en las determinaciones de este parámetro bioquímico ya que provoca una falsa disminución de los valores de la HbG a pesar de que ésta se encuentre elevada (Synchron, 2007).

La hipertrigliceridemia elevada y la ictericia pueden aumentar estos valores alterando la carga de la molécula (Barrón, 2000; Islas, 2002), estos son casos muy comunes en pacientes que son obesos y presentan muestras demasiado lipemicas, para resolver este problema antes del procesamiento de muestra, ésta debe ser centrifugada y separada de las células rojas del plasma y remplazar este por una cantidad igual de solución salina (Eagle Diagnostics, 2008) y/o el agente hemolizador (dependiendo el tipo de técnica usado) para que posteriormente sea trabajado de forma similar a las demás muestras. Varias técnicas (Bio-Rad, 2003; Vogeser, 2008; Eagle Diagnostics, 2008), proponen que sus equipos pueden procesar muestras provenientes de sangre venosa o capilar, es en esta última donde puede verse afectado y por tanto buscar otro tipo de método o equipo para su correcta determinación. Todas estas condiciones deben ser corroboradas en el historial clínico del paciente o cuestionarlo personalmente, de esta forma no sería necesario realizar medidas que conlleven a la alteración del problema.

En este aspecto también se suele considerar a la temperatura a la que se determina, sobre todo en metodologías de cromatografía. Para resultados óptimos, los componentes del kit de determinación deben estar acondicionados para su uso en un cuarto a temperatura entre 15-30° C (Helena Glyco-Tek, www.helena.com, Bio-Rad, 2003). A bajas temperaturas causan tiempos de flujo más lento; por ejemplo en métodos de columna de intercambio iónico (Helena Glyco-Tek, www.helena.com). Algunas técnicas (Bio System, 2007- cromatografía) dentro del Inserto (Insert Package) indican si debe multiplicarse por algún factor dependiendo de la temperatura a la que se esta determinando. En métodos de afinidad la elución de la hemoglobina glicosilada en la etapa final se realiza por un cambio en el pH, esto produce un gradiente en el perfil de elución (la hemoglobina glicosilada concentrada eluye primero, seguida del remanente del buffer) que si no es adecuadamente mezclado puede proporcionar inestabilidad en la señal y resultados erróneos (Bio-Rad, 2003).

En esta dependencia al analito, la fracción lábil es de suma importancia ya que es un estado no estable de la glicosilación, es decir que si los niveles de azúcar

decrecen esta fracción regresa a ser solamente Hb. Muchas de las técnicas recomiendan incubar los eritrocitos con solución salina a 37°C o simplemente hemolisis a pH 5, para su eliminación y no interferencia en el ensayo (Fluckiger, 1988), sin embargo cada una indica la forma de realizarlo.

La tercera variable a considerar es el uso de diferentes metodologías y la fracción que se determine hacen imposible la comparación de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios. Las determinaciones están sujetas en cuanto al equipo debido a precisión, el número de muestras trabajadas, el nivel de automatización, los costos por prueba; en fin todos estos métodos tienen como objetivo cuantificar la hemoglobina glicosilada presente en una muestra, sólo que cada uno de ellos detecta o cuantifica de diferente forma, diferentes fracciones o grupos específicos de la hemoglobina que es capaz de unirse a glucosa.

De esta simple diferencia surge la necesidad de realizar una comparación entre los métodos existentes hasta el momento para poder discernir en que momento, tipo de muestra y condiciones de un método es más útil a un laboratorio o investigador. Una de las desventajas de la determinación de la hemoglobina glicosilada es que no existe una estandarización de la determinación de HgbA1c, y que los valores de referencia difieren sustancialmente de un laboratorio a otro y están en función de la metodología utilizada.

3.2 ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS

El uso óptimo de las pruebas para hemoglobina glicosilada requiere de la estandarización de los ensayos que se usan para medirla. Esta estandarización beneficia a los médicos y a los pacientes, y permite la comparación de resultados entre laboratorios. Por otra parte, facilita la evaluación del riesgo del paciente al comparar los resultados de su análisis con los datos que brinda el estudio DCCT (Babic, 2003).

La interpretación adecuada de los resultados de las pruebas de HbA1c requiere que el profesional de la salud comprenda la relación entre los resultados del análisis y los valores medios de la glucosa en sangre, la cinética de la hemoglobina glicosilada y las limitaciones específicas del ensayo (Hemoglobina glicosilada en www.rochediagnostics.com.ar...).

Poco después de la introducción de HbG en la práctica clínica rutinaria se verificó que había una diferencia significativa en resultados producidos por diferentes laboratorios. Era evidente que los resultados dispares obtenidos se originaban debido a la amplia gama de métodos utilizados y a la falta de un material primario de referencia.

Las comparaciones de los resultados de diferentes laboratorios era, por lo tanto, difícil, y muchas veces imposible. La estandarización con calibraciones comunes fue el primer propósito en 1984; sin embargo, sólo después de la publicación del ensayo del control y complicaciones en diabetes en 1993 (DCCT) es que el tema de la estandarización internacional de medidas de la GHb llegó a ser un objetivo importante para científicos y clínicos.

En los Estados Unidos se implementó un programa en 1996 (NGSP National Glycohemoglobin Standardization Program) para que todos los laboratorios informaran en forma trazable con DCCT y confiable (Agratti, 2008; NGSP, 2009). También se realiza una evaluación de la precisión y una comparación de muestras con estimación del error sistemático. El Collage of American Pathologists (CAP) tiene también un programa de ensayo de aptitud que utiliza sangre total y muestras liofilizadas (Agratti, 2008)

Para el año de 1998 se decía que al medir distintas fracciones con los distintos métodos, los resultados a menos que hayan sido estandarizados al método de referencia interino, (DCCT BioRex 70) no se pueden comparar. Además cada método tiene ciertas ventajas e inconvenientes que debemos conocer para interpretar adecuadamente los resultados (Antuña, 1998; Manual manejo de insulinas, 2001).

A través de los esfuerzos del NGSP, los resultados de la hemoglobina glicosilada pueden ser expresados en gran sentido que proporcione las respuestas esenciales sin tomar en cuenta el método utilizado. Este esquema no elimina los problemas de interferencia que existen con varios métodos, pero ayuda a dar resultados de evaluación en un acuerdo común (Glycated hemoglobin, www.primusdiagnostics.com).

El comité de estandarización NGSP, planteo los siguientes objetivos:

- Establecer si el método interino de referencia propuesto, utilizado en el DCCT, BioRex 70, es aplicable como sistema primario de referencia.
- Establecer si el método de referencia se puede transferir a otros métodos. Un objetivo es lograr la estandarización de la mayoría de los métodos de determinación actuales y futuros con respecto al DCCT.
- Estudiar si se puede preparar y evaluar un estándar de calibración primario.

Se propuso que cada fabricante llevase acabo la estandarización, verificándola posteriormente en una “muestra fresca” del método de referencia interino DCCT/Goldstein BioRex 70.

Para 1998 se dio una lista con los 10 métodos (Tabla 10) que habían recibido la certificación de estandarización con respecto al método de referencia interno (Antuña, 1998).

TABLA 10. MÉTODOS QUE HAN RECIBIDO LA CERTIFICACIÓN DE ESTANDARIZACIÓN CON RESPECTO AL MÉTODO DE DCCT/Goldstein BioRex 70, EN 1998.

Abbott IMX	Bio-Rad Hb A1c micro
Bayer DCA 2000	Bio-Rad Variant A1c
Bio-Rad diamat	Helena Glyco-Tek
Bio-Rad Diastat	Primus HPLC
Beckman Diatrac	BMC Tina Quant

Tomado de Antuña, 1998.

Las reuniones realizadas anualmente por las instituciones encargadas de esta estandarización (NGSP, DCCT, IFCC, etc.) han tomado el tema con gran responsabilidad, y evalúan el método estudiado con respecto a laboratorios secundarios de referencia; igualmente cambian el método de referencia dependiendo los estudios y avances que se realizan continuamente (NGSP, 2009).

Existen recomendaciones respecto a la etapa analítica que incluyen utilizar ensayos cuyo Coeficiente de Variación Interensayo (CVi) sea inferior a 5% (idealmente 3%); deberán incluirse al menos dos niveles control con diferentes concentraciones en rangos bajos y altos. Todos los resultados obtenidos que estén por debajo del límite inferior del intervalo de referencia, así como los que superen una concentración de 15% de HbA1C, deberán ser reensayados (Agratti, 2008; NGSP, 2009).

El límite de 15% utilizado en 2007 fue bajado hasta 12% durante el año 2008 y actualmente se han anunciado reducciones en un futuro programando:

En estudios 2009: reducir a +/- 10%

En estudios 2010: reducir a +/- 08%

En estudios 2011: reducir a +/- 06%

Recientemente la IFCC (Internacional Federation of Clinical Chemistry) formó un grupo para la determinación del método de referencia y del patrón primario para HbA1c. Los métodos evaluados son HPLC cuantificados por dos métodos distintos, electroforesis capilar y espectrometría de masa. Fueron aprobados como métodos de referencia en el año 2002, ambos métodos han arrojado resultados comparables y específicos para la molécula de HbA1c. Estos métodos no tienen interferencia por hemoglobinas anormales, HbS y HbC, ni hemoglobinas carbamiladas o acetiladas (Lapolla, 2005; NGSP, 2009; Hemoglobina glicosilada en www.rochediagnostics.com.ar...). Los dos métodos de referencia miden específicamente el residuo glicado del N-terminal de la cadena beta (NGSP, 2009). Aunque en alguna bibliografía (Thevarajah, 2009) ya se considera a la espectrometría de masa como una categoría mas, la gran

mayoría se encuentra sólo en grandes laboratorios donde se realizan investigaciones y aún no están al alcance de los laboratorios de menor nivel, por tanto se consideran solo tres principios, métodos por separación de carga, métodos por afinidad e inmunoensayos.

Actualmente se espera que sea capaz de usarse este procedimiento específico de estandarización, y se espera que todos los laboratorios tomen en consideración algunos puntos fundamentales, cómo el coeficiente de variación del método es más bajo del 3%, los resultados analíticos serán expresados como %HbA1c, el método usado para la medición es calibrado con materiales de calibración que poseen una concentración asignada por los laboratorios de referencia, y el control de calidad será ejecutado sistemáticamente por todos los laboratorios. Por esta razón es útil para los laboratorios la participación en el programa Externo de Evaluación de la Calidad, el cual consiste en examinar calibradores distribuidos por los organizadores del programa y transmitir sus resultados para verificación de la confiabilidad de medición (Lapolla, 2005).

En la reunión del comité asesor clínico (CAC) del NGSP en junio del año 2008, discutieron sobre las variantes de hemoglobina, la variabilidad entre laboratorios y métodos, los resultados de estudios de la relación entre HbA1c y la glucosa promedio, la posible diferencia racial en valores HbA1c y el uso de HbA1c para el diagnóstico de diabetes (NGSP, 2009).

Las variables discutidas fueron:

1. Las hemoglobinas variantes ya que estos efectos varían dependiendo de las variantes y derivados de Hb y el método específico para HbA1c (Tabla 11). También se habló sobre el uso de Roche Integra Gen. 2 (método de inmunoensayo), el cual no muestra interferencia por esas variables. Además hablaron sobre las interferencias de HbE y HbD.
2. La variabilidad en HbA1c, los métodos más específicos tienen un CV < 5%.
3. La IFCC grupo de trabajo en la estandarización de HbA1c, discute sobre que en todos los instrumentos vendidos después del 1 de enero de 2011, los

resultados serán reportados en unidades IFCC (mmol/mol) y unidades NGSP (%).

4. Estudios de instituciones como ADA/EASD/IDF, en la relación entre HbA1c y el promedio de glucosa en la sangre. Desafortunadamente la diferencia de grupos étnicos es de representación baja en este estudio.
5. La HbA1c es una medición válida de glucemia en grupos étnicos. En no hispanos la HbA1c es menor que en mexicanos- americanos, los cuales son más bajos que en negros.
6. HbA1c para diagnóstico, esto ha sido repetido otros años para determinar que este examen es mejor técnica en el laboratorio que la glucosa.

Al parecer la American Diabetes Association y el Expert Committee on the Diagnosis of Diabetes, oficialmente recomendará el uso de HbA1c para el diagnóstico, en alguna fecha del 2009. De acuerdo a la ADA (American Diabetes Association) se recomienda en las prácticas clínicas lo siguiente:

“Este comité de junta de la ADA, la Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes y la Federación Internacional de Diabetes, recomendará que la A1c llegue a ser el examen de diagnóstico preferido para diabetes”. Algunos puntos para el diagnóstico se empezaron a discutir al tiempo de la publicación de este acuerdo. Las recomendaciones actualizadas serán publicadas en *Diabetes Care* y disponibles en Diabetes.org (NGSP, 2009).

Los cambios en los criterios de certificación de NGSP comenzarán en enero del año 2010, estos cambios serán para manufactura y certificación de laboratorios. Los laboratorios se certifican de acuerdo al criterio de aceptación establecido para Laboratorios Nivel II, el cual establece que la diferencia entre los métodos de referencia y el método en estudio, no debe ser mayor a +/- 1,0% de HbA1C; así mismo, el porcentaje de imprecisión no debe superar el 4% (NGSP, 2009).

TABLA 11: EFECTOS DE FRECUENCIA ENCONTRADOS EN LAS VARIANTES DE Hb Y LOS DERIVADOS DE LA HEMOGLOBINA, EN LA MEDICIÓN DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA.

Métodos (listado en orden alfabético de manufactura)	Interferencia (Si/No)					
	Hb C	Hb S	Hb E	Hb D	Hb F elevada	Hb Carbamilada
*Abbott Architect (Seradyn Reagents)	Si	Si	-		-	-
*Axis-Shield Nycocard (Primus Nycocard)	No	No	-		-	-
*Axis-Shield Afinion	No	No	No	No	-	-
*Siemens (previously Bayer) Advia	Si	Si	-		-	-
*Siemens (previously Bayer) DCA 2000	Si/No	No	No	No	Si	No
Beckman Diatrac	Si	Si	-		Si	Si
*Beckman Synchron	No	No	No	No	-	-
*Bio-Rad D-10 (short Program)	Si/No	No	No	No	-	-
*Bio-Rad D-10 (extended program)	No	No	No	No	-	-
*Bio-Rad DiaSTAT	No	Si	-		-	-
*Bio-Rad Variant A1c	No	Si/No	No	No	-	Si
*Bio-Rad Variant GHb	No	No	-	-	-	-
*Bio-Rad Variant II A1c	Si/No	Si/No	No	No	No	No
*Bio-Rad Variant II Turbo	No	No	Si	Si	-	-
*Dade Dimension	No	No	No	No	-	-
Diazyme Direct Enzymatic HbA1c	No	No	No	No	-	-
Drew Scientific DS5	No	Si	-	-	-	-
*Helena Glyco-Tek	Si	No	-	-	-	-
*Menarini HA8140	No	Si	Si	Si	No	Si/No
*Menarini HA8160 (Diabetes Mode)	No	No	Si	Si	-	-
*Menarini HA8160 (Thalassemia Mode)	-	-	No	Si		
Microgenics	No	No	-	-	-	-
*Bayer (previously Metrika) A1c Now	Si	Si	No	No	-	-
*Olympus	Si	Si	No	No	Si (>10%)	-
Ortho-Clinical Vitros	No	No	No	No	-	-
Pointe Scientific Hemoglobin A1c	No	No	No	No	-	-
*Primus Boronate Affinity HPLC	No	No	No	No	Si	No
*Bio-Rad Deeside (previously Provalis)	Si	No	-		-	-

*Roche Cobas Integra	Si	Si	-	-	-	-
*Roche Cobas Integra Gen2	No	No	No	No	-	-
*Roche Tina-quant II	No	No	No	No	No ($\leq 30\%$ HbF)	No
*Roche Unimate	Si	Si	-	--	-	No
*Tosoh A1c 2.2 Plus	No	No	Si	No	Si	Si/ No
*Tosoh G7	No	No	Si	No	No	-
*Tosoh G8	-	-	Si	No	-	-

* indica la certificación de NGSP hasta el tiempo de actualización (Abril 1, 2008, www.ngsp.org). Si/No indica que es un dato encontrado en la literatura. El indicador en negrita es la opinión de NGSP. Para el método de HPLC por intercambio iónico, la interferencia de las variantes, y de los aductos pueden ser dependientes de los muchos reactivos usados. Modificada de NGSP, 2009 y consultada el día 05 de mayo de 2009.

3.3 METODOLOGÍA

Existen diferentes métodos para realizar la determinación de hemoglobina glicosilada como se vera mas adelante. A su vez como la fracción medida depende directamente de la técnica utilizada, esto ha resultado en que los laboratorios midan diversas fracciones de la hemoglobina, HbA1, HbA1c y la hemoglobina glicosilada total de acuerdo a la técnica utilizada (HbG) (Hemoglobina glicosilada en www.rochediagnostics.com). Los diferentes métodos pueden medir HbA1 (hemoglobina rápida total) ó HbA1c. La HbA1c constituye 3% a 6% de la hemoglobina total y es la hemoglobina glicosilada más específica, refleja las concentraciones de glucemia promedio de las cuatro a ocho semanas precedentes (Barrón, 2000).

La interpretación de las determinaciones de hemoglobina glicosilada depende de la caracterización de las fracciones que se van a cuantificar. Los métodos más adecuados son aquellos que cuantifican específicamente la A1c (Islas, 2002).

Algunas de las técnicas presentan fluctuaciones, las cuales son causadas por la base de Schiff o fracción lábil, las estrategias para la eliminación de ésta comprende, el incubar los eritrocitos con solución salina a 37°C por cuatro horas, diálisis del hemolizado y reconcentración del hemolizado por ultrafiltración, uso de reactivos de hemólisis que contienen el eliminador los cuales son trampas que aceleran la disociación o simplemente hemólisis a pH 5 (Fluckiger, 1988).

Los métodos más comunes de cuantificación de hemoglobina glicosilada en el laboratorio clínico se han clasificado en tres grupos principales:

I Métodos por Separación de Carga

II Métodos de Afinidad

III Métodos de Inmunoensayo

Todos estos métodos tienen como objetivo cuantificar la hemoglobina glicosilada presente en una muestra, sólo que cada uno de ellos detecta o cuantifica de diferente forma diversas fracciones o grupos específicos de la hemoglobina que es capaz de unirse a glucosa. De esta simple diferencia surge la necesidad de realizar una comparación entre los métodos existentes hasta el momento para poder discernir en que momento, tipo de muestra y condiciones, un método es más útil a un laboratorio o investigador.

Es preciso conocer bien el método que estamos utilizando, el primero separa las hemoglobinas por la diferencia de carga y así identifican la hemoglobina que al glucosilarse ha sufrido una variación en su carga (Hgb A1 y HgbA1c) (Guntiñas, 2003).

La cromatografía por afinidad al boronato separa la hemoglobina glucosilada del resto de la hemoglobina midiendo de esta forma la hemoglobina glicosilada total (Manual manejo de insulinas, 2001).

Los métodos de inmunoensayo separan la hemoglobina glicosilada de la no glicosilada por diferencias en la estructura química, tras el reconocimiento con un anticuerpo específico (Mayer, 1998; Guntiñas, 2003).

3.3.1 Procesamiento de la muestra

El almacenaje y la preparación de la muestra son aspectos importantes en la determinación de la hemoglobina glicosilada. La determinación se suele hacer con hemolizado de eritrocitos (Fluckiger, 1988) para ello:

1. Se toma sangre venosa fresca colectada asépticamente en un tubo estéril para venipuntura que contenga etilen diamino tetra acetato (EDTA) como anticoagulante (Glyco-Tek en www.helena.com).

La HbA1C en sangre es estable 3 días a 15-25°C, 7 días a 2-8°C y 6 meses a -20°C (López 1997; Bio-rad, 2003; Byo-systems, 2007). Las muestras congeladas permanecen estables varios meses y se deben descongelar sólo una vez. Puede haber deterioro del compuesto en muestras congeladas y descongeladas repetidamente (Sychron, 2007).

2. Se centrifuga 5 min a 3000 rpm

3. Cuidadosamente se remueve el tapón y se aspira todo el plasma (Glyco-Tek www.helena.com). El sedimento (pellet) se resuspende en solución salina (NaCl 0.9%) y se vuelve a centrifugar. Este paso se repite varias veces.

4. Se lisan los eritrocitos (cada técnica tiene su forma de hacerlo). El sobrenadante es el hemolizado de eritrocitos. (Análisis de glucemia en www4.ujaen.es...pdf)

Cada laboratorio debe evaluar sus procedimientos de manipulación de muestras para prevenir los resultados variables. Algunos de ellos utilizan muestras en sangre entera, es decir que no requieren que sea separada del plasma, así también en los reactivos a utilizar para la hemolisis y demás procesos, provocando así diferencias al momento de poder comparar los métodos.

Precaución

Debido a que ninguna prueba puede ofrecer completa seguridad de la ausencia de VIH, virus de la Hepatitis B y otros agentes infecciosos, las muestras y soluciones deben manejarse como capaces de transmitir enfermedades infecciosas. La Food and Drug Administration recomienda que este material sea manejado a Nivel 2 de Bioseguridad (BSL2). BSL2 está referido en los manuales de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de Institutos Nacionales de Salud, Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos (Stanbio, 2000; Bio-rad, 2003; Synchron, 2007).

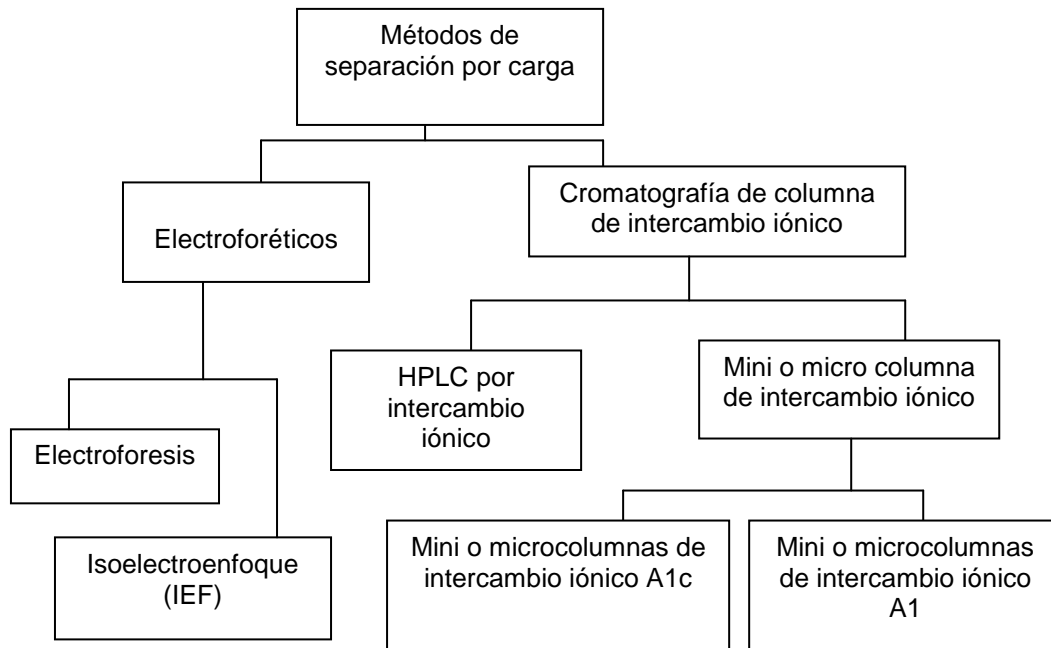
3.3.2 Métodos por separación de carga

Estos métodos se basan en la capacidad de poder separar una muestra en sus componentes mediante sus diferencias de carga eléctrica y luego cuantificar cada una de estas fracciones (Wilson, 1993).

Este tipo de proceso separa los componentes menores de la hemoglobina de la HbA0 y mide cualquiera de estos componentes HbA1 (HbA1a +HbA1b + HbA1c) o solo la HbA1c. Si una muestra contiene partículas con diferentes fuerzas de carga positiva o negativa, la muestra puede ser separada en grupos de partículas mediante técnicas basadas en la carga eléctrica (Little, 1991).

Las hemoglobinas glicosiladas y las hemoglobinas no glicosiladas son partículas cargadas positivamente de diferentes fuerzas eléctricas. Por lo que las técnicas basadas en el intercambio iónico pueden ser usadas para medir la hemoglobina glicosilada y conocer su porcentaje respecto a la hemoglobina total de la muestra (Diatrac, 1995).

Los métodos de separación por carga suelen subdividirse dependiendo de las características de cada uno de ellos de la manera siguiente:



A.- Electroforesis

Este método se basa en que las hemoglobinas cargadas positivamente migran hacia una carga negativa generada en el sistema a diferentes velocidades debido principalmente a la fuerza de su carga positiva y a la intensidad de corriente. Este desplazamiento es a través de un gel soportado en un amortiguador de pH neutro y capaz de conducir la corriente eléctrica. Cada tipo de hemoglobina posee una carga positiva total diferente, razón por la cual se separan del resto de las hemoglobinas y migran a diferentes distancias en un periodo de tiempo (Mathews, 2002). La electroforesis puede realizarse en geles de agarosa, de agar o geles de acetato de celulosa (Fluckiger, 1988).

En el ensayo de hemoglobina glucosilada las fracciones positivas migrarán a diferentes velocidades hacia la carga negativa o polo negativo del sistema. La fracción HbA0 posee la carga positiva más fuerte y migra más rápido que las fracciones de la HbA1, las cuales tienen una carga positiva más débil (Diatrac, 1995).

Para la interpretación de este ensayo se utiliza un equipo llamado densitómetro, mismo que por medio del grosor de cada banda formada, determina la densidad óptica de cada una de las bandas obtenidas en la separación de las fracciones de la hemoglobina. Finalmente realiza el cálculo porcentual de la relación hemoglobinas HbA1 entre la HbA0 (Diatrac, 1995). El densitómetro mide el área bajo el pico de la fracción HbA1 o de sus subfracciones y el área bajo el pico de la HbA0 y calcula los resultados

La mayoría de los métodos por electroforesis separa a la hemoglobina en 2 fracciones, A0 y A1, sin embargo existe una metodología capaz de separar e interpretar las sub fracciones de la A1; A1a1, A1a2, A1b, A1c (Little, 1991). Según el fabricante o ensayo electroforético utilizado se podrá disponer de un resultado porcentual de %HbA1 o % de HbA1c (Diatrac, 1995).

Ventajas

- Este método es altamente referido en la bibliografía.
- El método es capaz separar todos los componentes de la hemoglobina glucosilada.
- Es más rápido que el de isoelectroenfoque (Stanley, 1985).
- El método puede identificar cada fracción presente en la muestra y permite realizar un cálculo directo del porcentaje de la hemoglobina glicosilada total o la fracción A1c (Diatrac, 1995).

Desventajas:

- Resultados influenciados por las condiciones bajo las cuales fueron colectadas, transportadas y mantenidas las muestras (Mayer, 1998).
- Las muestras que no hayan sido adecuadamente conservadas a una temperatura de 2 - 8 °C, pueden dar una HbA1c falsamente elevada, debido a la continua absorción de glucosa de los glóbulos rojos (Fluckiger, 1988).
- Variantes de hemoglobina pueden presentar picos que interfieran, y necesitan ser interpretados por otros métodos (Fluckiger, 1988; Wilson, 1993; Diatrac, 1995).

- Es inapropiado para la medición de HbA1c en la muestra de sujetos con hemoglobinopatías homocigota (Weykamp, 1993).
- Puede estar midiendo pre-A1c. Si la glucohemoglobina lábil es causa de preocupación, ésta puede ser eliminada por incubación a un pH de 5, a 37°C (Little, 1991; Weykamp, 1993; Mayer, 1998; Glyco-Tek www.helena.com)
- No separa Hb A0 de HbE0 o HbA1c de HbE1c (Weykamp, 1993; Diatrac, 1995)
- Es muy sensible a cambios de pH y de temperatura (Mayer, 1998).
- Está sujeto a interferencias de hemoglobina fetal y base de Shiff (Fluckiger, 1988; Wilson, 1993).
- Suelen correr otras variantes de menor porcentaje a la par de la HbA o HbS, dependiendo el pH (Thevarajah, 2009).

B.- Enfoque isoeléctrico (IEF)

El enfoque isoeléctrico es una versión de la electroforesis en gel que permite separar los anfólitos de una forma casi pura en función de sus puntos isoeléctricos (Mathews, 2002).

De esta forma esta técnica involucra la separación de los componentes de la hemoglobina en una superficie de gradientes de pH (6-8) formada con gel de poliacrilamida (Stanley, 1985; Fluckiger, 1988), después se aplica un campo eléctrico y cada anfólito migra hasta llegar al pH que corresponde a su punto isoeléctrico y en este punto deja de tener una carga eléctrica neta, por lo que se detiene y se acumula (Mathews, 2002); posteriormente de la separación, las bandas son cortadas del gel y eluidas en un buffer. Finalmente las concentraciones de hemoglobina son medidas a una absorbancia de 415nm por un espectrofotómetro o un densitómetro (Stanley, 1985; Fluckiger, 1988).

Los puntos isoeléctricos de las hemoglobinas glicosiladas HbA1a (pI = 6.88), HbA1b (pI=6.92) y HbA1c (pI=6.85) son menores que el pI de HbA (6.95) y

pueden ser resueltos por esta técnica. La concentración de HbA1a+b en el ánodo de un aducto de hemoglobina (HbASSG; HbA3) y la HbF hacia el cátodo hacen que la HbA1c sea específicamente determinada (Fig. 16) (Fluckiger, 1988).

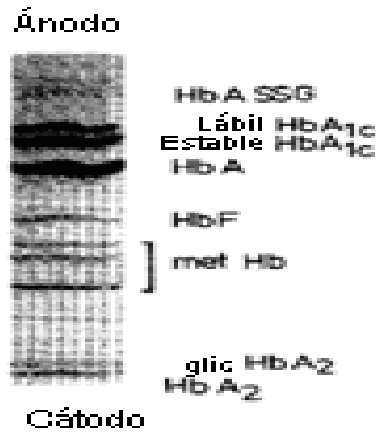


FIGURA 16. Modelo de un Isoelectroenfoque de un hemolizado normal. HbASSG y metahemoglobina son incrementados en hemolizados viejos. Modificado de Fluckiger, 1988.

La resolución mejora por adición de separadores o modificación del gradiente de pH, tal como β - alanina, la cual iguala los gradientes en la proximidad del pI del separador. Aún se mejora la resolución con preparados hechos cercanos al rango de pH (6.8-7.3) en geles de poliácridamida. La separación entre HbA y HbA1c es de 2mm usando β - alanina y 3mm con los preparados cercanos a los rangos de pH.

La resolución por IEF (Isoelectric focusing) es alto para la fracción lábil de HbA1c y la fase estable de ésta, sin embargo esta resolución es insuficiente para la cuantificación de micro densitómetros, así que para la determinación de rutina de HbA1c la eliminación de la fracción lábil es necesaria. Esta eliminación puede realizarse por incubación de los eritrocitos en solución salina a pH 5 (Fluckiger, 1988).

Ventajas

- Específico para medir HbA1c (Stanley, 1985; Lapolla, 2005).
- No hay interferencia por fracción lábil o Hb anormales (Lapolla, 2005).
- Alta capacidad (60 muestras diariamente)
- No depende de la temperatura, ya que usa un control termostático (Stanley, 1985).

Desventajas

- Requiere equipo caro y especial (Fluckiger, 1988; Lapolla, 2005).
- Requiere alta habilidad técnica.
- Requiere mayor tiempo para tener el resultado (Stanley, 1985).
- Las variantes de hemoglobina (Hbs,C,D, etc) y la modificación de la glicación (carbamilación, acetilación) pueden causar interferencias.
- Las muestras que no hayan sido adecuadamente conservadas a una temperatura de 2 - 8 °C, pueden dar una HbA1c falsamente elevada, debido a la continua absorción de glucosa por los glóbulos rojos (Fluckiger, 1988).

C.- Cromatografía de columna de intercambio iónico

De manera general en todas las separaciones cromatográficas la muestra que se desea separar se disuelve en la fase móvil que es aquella en la cual están los solutos que se van a separar. La fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria, la cual se mantiene fija en una columna o en una superficie sólida que actúa como soporte. Los componentes fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Los componentes con baja afinidad por la fase estacionaria se desplazan con más rapidez al ser arrastrados por la fase móvil. Una vez que todos los componentes han atravesado la fase estacionaria, salen separados unos de otros lo que permite utilizar las fracciones en procesos de identificación o cuantificación (Mathews, 2002, Análisis de glucemia, en www4.ujaen.es).

La cromatografía agrupa un importante grupo de técnicas que permiten separar componentes de mezclas complejas. El clásico método para la determinación rápida de HbA1a-c por cromatografía en la resina de intercambio catiónico BioRex 70 fue introducido por Trivelli en 1971 (Fluckiger, 1988).

Varios enfoques incluyendo el uso de minicolumnas o equipo automatizado por HPLC son usados para las cromatografías de intercambio iónico y son aceptables para la rutina clínica del laboratorio. Estos métodos miden HbA1 o HbA1c, usualmente incluyen HbF (Fluckiger, 1988).

Los métodos dependientes de carga miden $\alpha_2(\beta\text{-N-glucosa})_2$ la más abundante de las cuatro especies estables. Esta fracción ha sido designada A1c basado en este sistema de migración en el sistema de carga. La fracción lábil también migra en esta región y es usualmente removida por un simple pre-tratamiento donde se usa el método de intercambio iónico. La hemoglobina sin glucosa unida migra a la región llamada A0. Las otras tres especies estables de A1c (Tabla 7) también migran con la hemoglobina A0 donde la glucosa unida no resulta en un cambio de su carga neta. El término Total A1 es usado en los términos relacionados con la carga para describir las condiciones medidas de A1a1, A1a2, A1b y A1c y que no incluye las especies localizadas en la fracción A0 (www.primusdiagnostics.com).

La presencia de las variantes de hemoglobina (HbS, C, F, etc) y la modificación de la glicación (carbamilación, acetilación) limita la precisión de estos métodos. Mejoramientos en métodos de intercambio iónico por HPLC han reportado que proporciona identificación de muchas de las interferencias potenciales de las variantes de la hemoglobina y sus derivados.

Los resultados usando métodos de intercambio iónico son expresados como porcentajes. En algunos casos (ej. Diamat A1c), la señal de la fracción A1c es comparada con las señales de combinación de las fracciones A0 y A1c y reportado como %A1c (Fig. 17) (Glycated hemoglobin: www.primusdiagnostics.com)

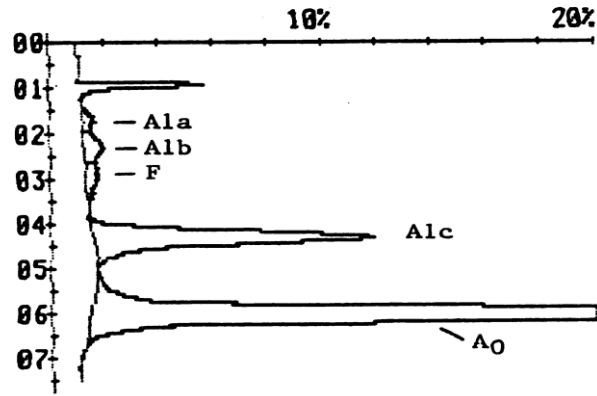


FIGURA 17. Cromatograma de HPLC Diamat. Muestra de una persona con diabetes. Muestra los picos de separación de HbA1a, HbA1b, HbF, HbA1c. Tomada de Little 1991.

C.1- Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por Intercambio Catiónico

La HPLC (*High-performance liquid chromatography*) es un sistema de cromatografía en columna con un sistema inyector de la muestra y un impulsor de la fase móvil que acelera el proceso (Análisis de glucemia en www4.ujaen.es..pdf).

Aunque una buena resolución puede ser obtenida con Biorex 70, esta resina no tolera presiones por encima de 20 bares y la vida de la columna es por lo tanto corta. Este retroceso ha requerido del desarrollo de resinas no comprensibles y columnas fuertes, estimulando así el uso de varias resinas de intercambio iónico por HPLC (Fluckiger, 1988; Mathews, 2002).

Este método utiliza columnas empacadas con resinas denominadas de intercambio catiónico en las que las partículas con la mayor carga positiva se unen fuertemente a la resina (la hemoglobina no glicosilada (HbA0)) y las partículas con menor fuerza positiva (HbA1) se unen de manera menos fuerte a la resina (Stanbio, 2000; Mathews, 2002). Las sub-especies de HbA1 pueden ser separadas de ella misma y de otros componentes de un hemolizado por

cromatografía a pH 6.7, a este pH se producen las bandas de HbA1a, HbA1b, HbA1c las cuales son rápidamente eluidas (Stanley, 1985). Las partículas de uniones más fuertes eluirán en fracciones posteriores. El porcentaje de HbA1, se determina midiendo los valores de absorbancia a 415 nm de la fracción HbA1 y de la fracción de Hb total, calculando la proporción de absorbancias (Stanbio, 2000; Mathews, 2002).

La determinación de la HbG o sus fracciones en este método se realiza en un sistema casi automatizado, el cual utiliza los principios de la Cromatografía líquida de intercambio iónico, este tipo de sistema puede utilizar una bomba de un sólo pistón con una válvula de pasos por gradiente, la cual permite que amortiguadores de fosfatos de fuerza iónica cada vez mayor pasen a través de la columna analítica utilizando programas de elución de hasta 8 minutos. La columna analítica contiene partículas esféricas de gelatina de intercambio catiónico (Bio-Rad, 1990).

Su absorbancia es medida por un instrumento denominado cromatógrafo líquido de alta resolución (415nm) (Stanley, 1985), mismo que interpreta y realiza gráficos de los resultados o porcentajes de hemoglobina glicosilada y sus fracciones de interés. La lectura en el espectrofotómetro es medida a 415 nm para muchos de los métodos utilizados, debido a que a esta longitud de onda se da la mayor absorbancia de la Hb. Sin embargo cada metodología puede utilizar variaciones, como en el caso de los inmunoensayos.

Ventajas

- Es una metodología semi automatizada o automatizada.
- Es una técnica rápida y reproducible (Lapolla, 2005).
- Las variantes anormales de la hemoglobina no necesariamente tienen que afectar el resultado HbS1c y HbC1c (si la HbF es menor de 5 % no afecta el resultado, pero puede llegar a hacerlo) (Weykamp, 1993; Manual manejo de insulinas, 2001; Wiwanitkit, 2007).
- Es la técnica más ampliamente utilizada (Stanley, 1985; Barrón, 2000).

- Es más cara que las minicolumnas (ya que puede estar libre de interferencias por variantes de hemoglobina) pero ofrece una alta precisión (Fluckiger, 1988; Glycated hemoglobin www.primusdiagnostics.com)
- Para sujetos con hemoglobinopatías heterocigotas (HbAS, HbAC) y síntesis variantes de Hb, el método debe satisfacer tres condiciones: la variante de Hb deben ser reconocidas HbA1c, HbA0 y las variantes de Hb deben ser separadas y cuantificadas, y HbA1c debe ser expresada en % de HbA0 +HbA1c (Weykamp, 1993).
- Excelente precisión con coeficientes de variación en el rango del 3% o cercano a él en los aparatos más actuales (NGSP, 2009).
- Es posible determinar valores estandarizados de % HbA1c

Desventajas

- La fracción lábil produce interferencias, si las muestras no son previamente tratadas (Mayer, 1998; Guntiñas, 2003; Glyco-Tek).
- Resultados influenciados por las condiciones bajo las cuales fueron colectadas, transportadas y mantenidas las muestras (Mayer, 1998).
- Variantes de hemoglobina pueden o no presentar picos que interfieran, y necesitan ser interpretados por otros métodos (Fluckiger, 1988; Wilson, 1993; Guntiñas, 2003).
- Es inapropiado para la medición de HbA1c en la muestra de sujetos con hemoglobinopatías homocigota (HbSS y HbCC) (Weykamp, 1993).
- Otras hemoglobinas, como la HbF, la Hb carbamilada y la Hb acetilada, pueden interferir (Weykamp, 1993; Glyco-Tek www.helena.com).
- Se reporto que algunas variantes de bajo % no pueden ser detectadas por algunos equipos ya que corren a la par con cualquiera de las Hb (normal o variante) (Thevarajah, 2009; Higgins, 2005).
- Es necesaria experiencia técnica para interpretar resultados, dar mantenimiento al sistema y manejarlo adecuadamente.
- Este sistema es un equipo delicado que no podrá ser utilizado en otro tipo de ensayo.

C. 2- Mini o micro columna de intercambio iónico

Los métodos por mini o microcolumnas de intercambio iónico se pueden sub clasificar según su capacidad de poder o no cuantificar la fracción HbA1c de la hemoglobina glucosilada. Estos instrumentos reciben el nombre dependiendo del tamaño, usualmente las mini columnas son del tamaño de una pipeta Pasteur, y las microcolumnas aún más pequeñas. El principio fisicoquímico en los dos tipos de columnas es el mismo pero la capacidad de separar las fracciones de la HbA1 hace la diferencia (Stanley, 1985).

En general las mini o micro columnas por intercambio iónico que son capaces de separar HbA1c se basan en hacer pasar por una columna empacada de resina catiónica ligeramente acidifica una alícuota de muestra hemolizada para luego aplicar un buffer de fosfatos de fuerza iónica baja a través de la columna. Este buffer hace eluir de forma específica la hemoglobina A1c (HbA1c) previa eliminación por lavado de la Hemoglobina A1a+b (HbA1a+b), la base de Schiff, interferencias ictericas o lipémicas. La HbA1c se mantiene capturada en la resina catiónica, hasta que se hace pasar un segundo reactivo de elución de mayor fuerza catiónica mismo que libera a la HbA1c que será interpretada en el método como fracción de la hemoglobina total. La estimación del porcentaje de la Hb A1c se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm. La absorbancia es estable durante al menos una hora (Bio Systems para cromatografía, 2007). El tanto por ciento de HbA1c en la muestra se calcula a partir de una fórmula general.

$$\% \text{ Hb glicosilada} = \frac{\text{Concentración Hb glicosilada}}{\text{Concentración Hb total}} \times 100$$

Las mini o micro columnas por intercambio iónico que son capaces sólo de separar HbA1 se basan en emplear una resina de intercambio catiónico de fuerza baja que hace eluir todas las hemoglobinas y componentes de la muestra con excepción de las fracciones componentes de la HbA1 es decir que logran la separación de la glicohemoglobina o fracción rápida de la hemoglobina total (Stanley, 1985).

La separación en este tipo de columnas son ampliamente sensibles en condiciones de ensayo como pH, fuerza iónica y temperatura, la precisión es mejor si la temperatura es controlada. Los kits para las columnas comerciales han sido evaluados y encontrados con un alto estándar (Fluckiger, 1988).

Ventajas

- No requiere de equipo especializado (Stanley 1985; Fluckiger, 1988).
- Las microcolumnas son rápidas (Lapolla, 2005).
- Son de bajo costo.
- Son de uso fácil.
- Se realiza en corto tiempo.

Desventajas

- No específico para medir HbA1c (Lapolla, 2005).
- Mide la fracción lábil, si las muestras no son previamente tratadas y por lo tanto sufrir variaciones (Stanley, 1985; Lapolla, 2005).
- Puede sufrir interferencias por presencia de hemoglobina C o S pero las diferencias no son clínicamente significativas (Bio Systems para cromatografía, 2007).
- Otras variantes de hemoglobina, como la HbF (aumentada), la Hb carbamylada y la Hb acetilada, pueden interferir al igual que medicamentos (Weykamp, 1993; Bio Systems para cromatografía, 2007).
- Es dependiente de la temperatura a la que se lleva a cabo (Stanley, 1985; Lapolla, 2005).
- Es muy sensible a cambios de pH y de temperatura (Mayer, 1998).
- Tiene interferencias por hiperlipemia y anemia hemolítica (Lapolla, 2005; Bio Systems para cromatografía, 2007).
- Las variaciones en las condiciones de ensayo no pueden evitarse del todo y por lo tanto las fracciones de hemoglobina eluida no son siempre cuantitativamente colectadas dependiendo del equipo (Fluckiger, 1988).

3.3.3 Métodos por afinidad

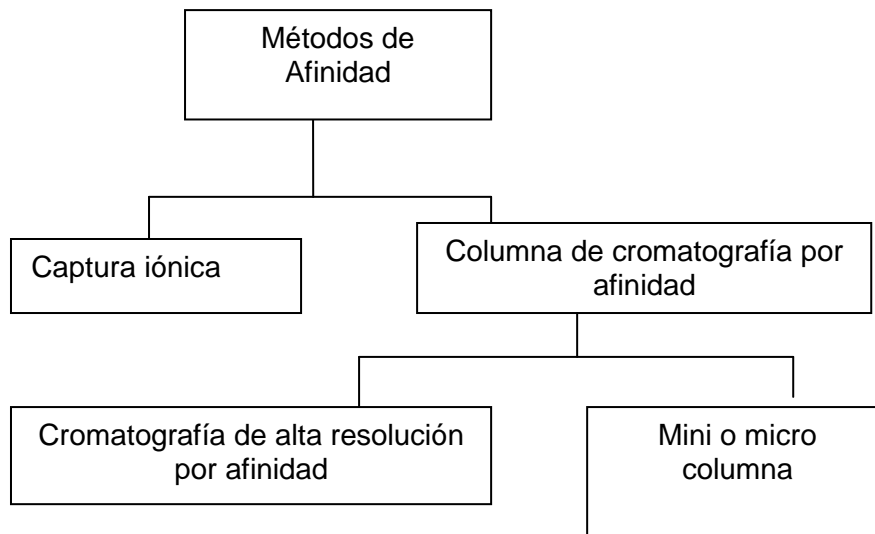
La característica principal de los métodos por afinidad es que todos los métodos miden todas las hemoglobinas glicosiladas en la muestra, es decir la hemoglobina glicosilada total (Wilson, 1993; Guntiñas, 2003; Glyco-Tek www.helena.com)

La cromatografía por afinidad separa no solo HbA1c, sino también otras glicohemoglobinas que no pueden ser separadas por diferencia de carga (HbG total) (Little, 1991; Glycated hemoglobin en www.primusdiagnostics.com). Todos los métodos de Afinidad miden en global la HbA glicosilada, la HbF glicosilada, la HbS, la HbC glicosilada, la HbE glicosilada y cualquier otra variante de hemoglobina capaz de glicosilarse. Los resultados de estos métodos generalmente se reportan como % de GHb (Barrón, 2000).

Todos los métodos de Afinidad coinciden en ser métodos por afinidad a boronatos (ácido m-aminofenil bórico) (Little, 1991); por esta razón son denominados usualmente como métodos de Afinidad por Boronato (Wilson, 1993).

La cetoamida forma una configuración química específica que causa que este compuesto se una a la resina con boronato (Mayer, 1998). Los boronatos tienen una fuerte afinidad por los azúcares en la hemoglobina glicosilada, por lo que se unen a la hemoglobina glicosilada y todas aquellas hemoglobinas no glicosiladas se retiran mediante lavados. Posteriormente una solución de sorbitol se adiciona y los Boronatos que tienen una mayor afinidad por el sorbitol se unen a éste y liberan a las moléculas de hemoglobina glicosilada cuya concentración podrá ser leída según el método utilizado y comparada frente a una lectura de la hemoglobina total de la muestra para determinar el % que representa la hemoglobina glicosilada de la hemoglobina total (Fluckiger, 1988; Wilson, 1993).

Los métodos por afinidad pueden dividirse a su vez en:



A.- Captura iónica

En esta técnica la matriz de fibra de vidrio de la célula de captura es pre tratada con amonio cuaternario de alto peso molecular. Durante la prueba, las moléculas afines se unen específicamente a la hemoglobina glicosilada por medio de la interacción entre di-hidroxiboronato y las moléculas de glucosa de la hemoglobina glicosilada. Esta última es, por lo tanto, separada de la hemoglobina no glicosilada merced a la interacción electrostática entre la hemoglobina glicosilada polianiónica y la superficie catiónica de la matriz (captura del ion). Posteriormente, la hemoglobina glicosilada es cuantificada por un método fluoresceínico. Los resultados son presentados en porcentaje, procediendo de la formula general utilizada en muchos aparatos (Little, 1991; López, 1997):

$$\% \text{ Hb glicosilada} = \frac{\text{Concentración Hb glicosilada}}{\text{Concentración Hb total}} \times 100$$

Un estudio de correlación entre la hemoglobina glicosilada de los Laboratorios Abbott y la cromatografía de intercambio iónico, estableció y confirmó la relación lineal entre estos dos métodos. Basándose en esta relación fue

definida la ecuación usada para convertir la hemoglobina glicosilada en % de hemoglobina A1C:

$$\% \text{ HbA1C} = \frac{\% \text{ de hemoglobina glicosilada} + 1,76}{1,49}$$

Ventajas

- Los métodos que miden la afinidad del boronato para la hemoglobina glicosilada muestran una mínima interferencia con las formas variantes de la Hb (Wilson, 1993). Las hemoglobinas F (fetal), S y C, no interfieren significativamente con la prueba. Excepto por las Hbs S y C homocigotas (HbSS, HbCC) (Weykamp, 1993).
- Para fines diagnósticos, la prueba de hemoglobina glicosilada debería ser usada en forma conjunta con otros datos, tales como síntomas, impresiones clínicas, etc.
- Los niveles clínicos de la hemoglobina glicosilada con la fracción aldimina (pre-A1C) son relativamente bajos y pueden ser eliminados con previo tratamiento (Weykamp, 1993).

Desventajas

- Las muestras de sangre pueden contener cantidades importantes de materiales insolubles. Si el material insoluble es transferido a la matriz de fibra de vidrio, durante la realización de la prueba, se puede producir alteración importante de los resultados. Para evitar esto, antes de iniciar la prueba, las muestras deben ser mezcladas vigorosamente para garantizar su homogeneización (López, 1997).
- La HbF corre cromatográficamente junto con HbA1 en algunos métodos de electroforesis e intercambio iónico (Islas 2002).
- La enfermedad obstructiva crónica, el asma bronquial y los pacientes con bronquitis crónica, pueden tener hipoxia y esto producir una poliglobulia reactiva y por tanto, afectar los resultados de la determinación de las hemoglobinas glicosiladas y A1c (López, 1997).

B.- Cromatografía por afinidad

La cromatografía por afinidad tiene ciertas características que incrementan la precisión, especificidad y linealidad de las determinaciones de hemoglobina glicosilada (Glyco-Tek www.helena.com).

El principio de este método es que emplea una columna de afinidad utilizando un grupo dihidroxiboril unido a una resina insoluble de celulosa. La única propiedad de los grupos dihidroxiboril incluye una afinidad a los grupos cis-diol presentes en muchos azúcares simples incluyendo la glucosa, así permite la separación de la hemoglobina glicada de las hemoglobinas no glicadas (Wilson, 1993; Glyco-Tek www.helena.com). La elución con reactivo básico pH 8.1-8.6 remueve las hemoglobinas no glicadas, la hemoglobina carbamylada y la forma lábil de HbA1c, mientras que retiene las formas glicadas. Posteriormente estas hemoglobinas retenidas son eluidas con otro reactivo de sorbitol, buffer y 0.1% ácido de sodio pH 6.0.

Los valores de hemoglobina glicosilada es determinada por comparación de dos soluciones utilizadas por un espectrofotómetro operado a 415 nm. La longitud de onda es seleccionada cercana a la de máxima absorción de la hemoglobina para ampliar el intervalo de concentración de trabajo del instrumento (Bio Rad, 2003; Glyco-Tek www.helena.com).

El algoritmo para calcular la HbA1c es una ecuación de regresión lineal derivada de una estandarización con la referencia de laboratorio del Diabetes Control and Complications Trial (DCCT).

La muestra de sangre es colectada en un tubo estéril para venipuntura que contenga EDTA, heparina o citrato como anticoagulante, se centrifuga, se le aspira el plasma y se coloca la solución de hemólisis (Glyco-Tek www.helena.com).

Los resultados son calculados por la fórmula general

$$\frac{\text{Abs de HbG} \times 100\%}{(\text{Abs de HbG}) + (\text{Abs de no HbG})} = \% \text{ HbG}$$

Después del cálculo del %HbG, la siguiente ecuación puede ser usada para determinar el % HbA1c (Wilson 1993)

$$\% \text{ A1c} = \frac{\% \text{HbG} + 1.76}{1.49}$$

Ventajas

- No sufre interferencia de hemoglobinas anormales (Little, 1991; Wilson, 1993; Bio Rad, 2003). Excepto por las Hbs S y C homocigotas (HbSS, HbCC) (Weykamp, 1993).
- No interfieren cambios de temperatura o pH (Glyco-Tek).
- Si se guarda en la obscuridad el gel de afinidad puede ser usado más de 10 veces (Fluckiger, 1988).
- No existe interferencia de la fracción lábil, ni de hemoglobina carbamylada en pacientes urémicos.
- Usa solamente controles HbA1c que sean designados para uso de cada una de las pruebas (Bio Rad 2003).
- Fue escogido como método de referencia por el DCCT (Wilson 1993).

Desventajas

- Puede ser afectado el resultado por anemia hemolítica.
- Bajas temperaturas pueden generar bajos tiempos de flujo.
- Algunos medicamentos interfieren con la determinación dependiente de la concentración (Glyco-Tek, www.helena.com).
- Experiencia técnica requerida para procesar muestras.
- Mide todas las hemoglobinas glicosiladas (Wilson, 1993).
- Las concentraciones elevadas de lípidos pueden interferir causando resultados bajos (Bio Rad, 2003).

B.1- Cromatografía líquida de alta resolución por columnas de afinidad

La matriz de fibra de vidrio está precubierta con un compuesto de amonio cuaternario de alta masa molecular, esto imparte una carga positiva neta a la matriz, la cual permite la captura electrostática anionica del complejo analito-muestra (Wilson, 1993). En el ensayo de hemoglobina glicosilada el complejo anionico esta formado entre moléculas de glicohemoglobina y un reactivo de afinidad polianionico de acido poliacrílico y dihidroxiboronato.

La especificidad de este ensayo está basada en la habilidad del dihidroxiboronato o ácido borónico de formar esteres cíclicos en interacción con 1,2-cis-diol de la glicohemoglobina y utilizar el agente de afinidad polianionico 3 (Fig. 18) como componente crucial (Wilson, 1993; Rajarathnam, 2005). Este agente polimerico de 225 kDa es preparado de poli (ácido acrílico) PACA 1 (Fig.18) y ácido 3-aminofenilboronico APBA, 2 (Fig. 18); la presencia tanto de los grupos del ácido borónico como del ácido carboxílico en el reactivo es de gran importancia para la efectividad de captura. Los estudios de Rajarathnam y colaboradores encontraron que el peso molecular de 225KDa es especifico para la medición de HbG (Rajarathnam, 2005).

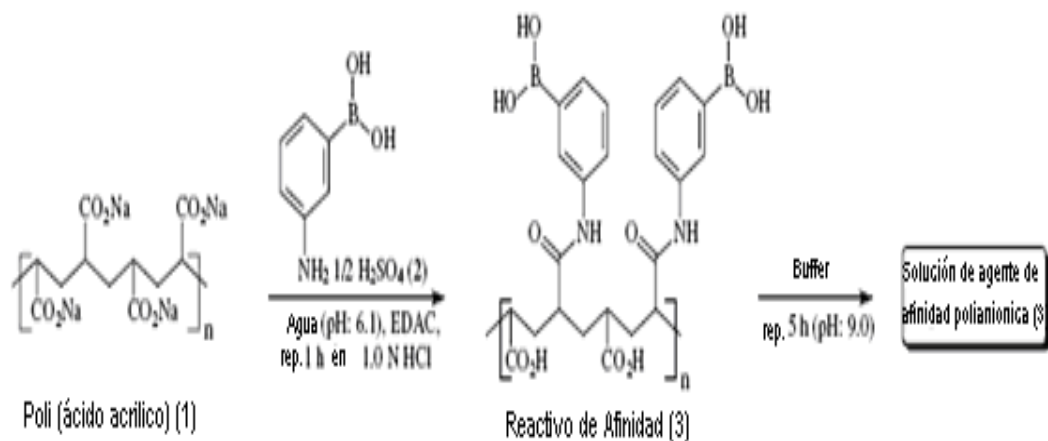


FIGURA 18. Esquema de preparación del agente de afinidad polianionica. Modificado de Rajarathnam, 2005.

La glicohemoglobina es separada de la no glicosilada a través de la interacción electrostática entre el componente de poliacrílico del reactivo de afinidad y la fase solida catiónica (Fig. 19), la glicohemoglobina es cuantificada por medición de disminución de fluorescencia, una propiedad que ocurre naturalmente en la hemoglobina (Wilson, 1993; www.primusdiagnostics.com)

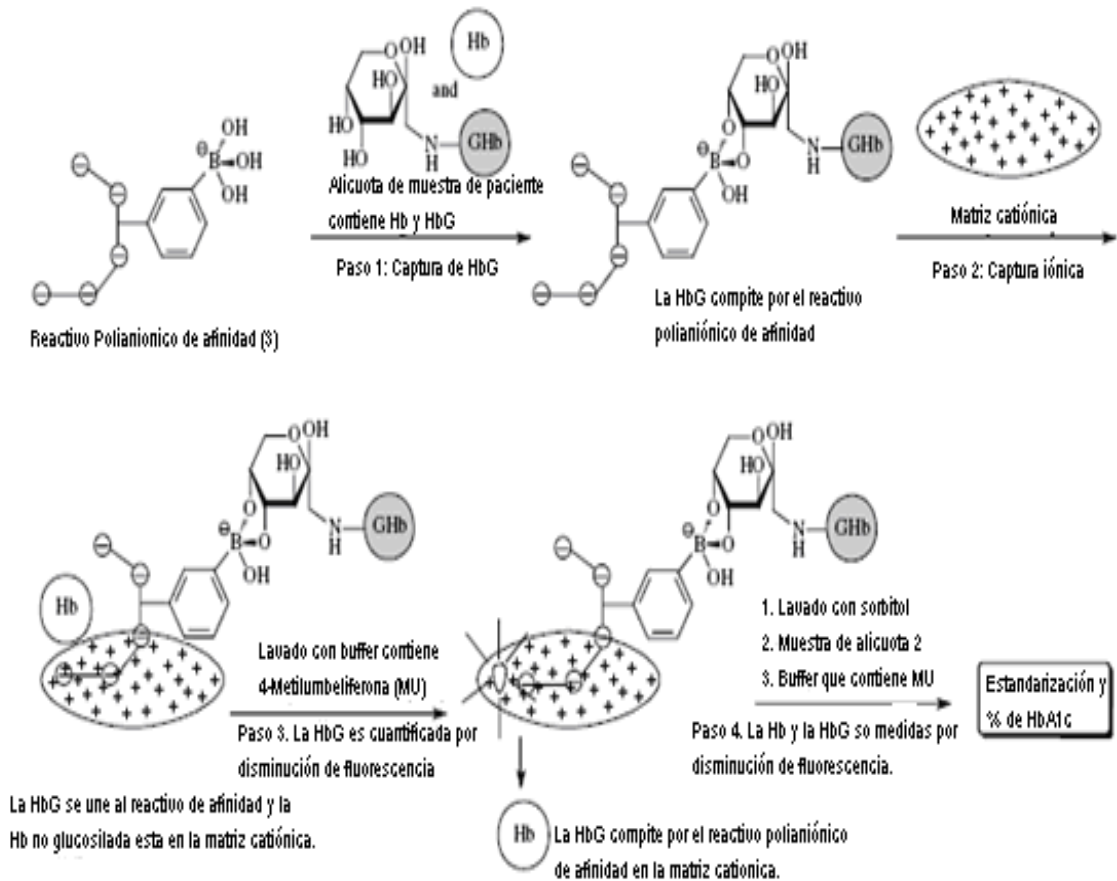
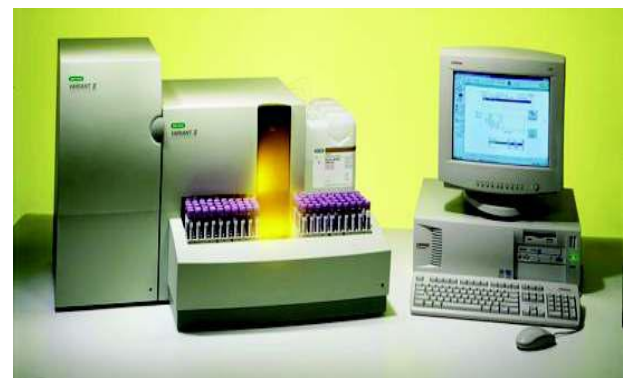
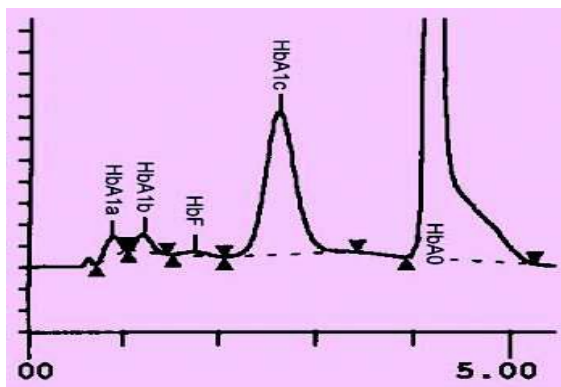


FIGURA 19. Principio de separación del ensayo de Hemoglobina glicosilada. El dihidroxiboronato del reactivo de afinidad polianiónica con partes del azúcar de la HbG produce un complejo soluble de afinidad aniónica. Posteriormente el complejo aniónico es capturado por las fibras cationicas de la matriz de captura y las hemoglobinas no glicosiladas son lavadas de la matriz. Modificado de Rajarathnam 2005.

El aparato o sistema utiliza un inyector que junta la muestra sanguínea anticuagulada con EDTA o heparina con un reactivo lizador el cual contiene 4-metilumbeliferona (MU) para la fluorescencia; esto se coloca en la columna de afinidad y se dan dos lavados con buffer el cual contiene también MU para

remover las hemoglobinas no glicosiladas. Posteriormente la matriz es lavada con sorbitol, este compete con la hemoglobina glicosilada por la unión del reactivo de afinidad, así que la glicohemoglobina es removida, después de esto, tanto la hemoglobina glicosilada como la no glicosilada son medidas. La fluorescencia medida a través de la MU es convertida en concentración de glicohemoglobina y hemoglobina no glicosilada a través del uso de curvas de calibración separadas y el porcentaje de hemoglobina glicosilada es calculado (Fig. 20) (Wilson, 1993; Rajarathnam, 2005).



(a)

(b)

FIGURA 20. (a) cromatograma en tiempo real (gráfico de tiempo vs. Absorbancia); (b) software y equipo utilizado en HPLC de afinidad. Tomado de Agratti 2008.

Los resultados son expresados en unidades de porcentaje, para esto dos fracciones son presentadas (la hemoglobina glicosilada y la no glicosilada), la porción glicada con el total y el resultado es expresado como %HbG (Wilson, 1993; Rajarathnam, 2005). Los resultados de la muestra son impresos como % HbG y/o % estandarizado de HbA1c. Las concentraciones de hemoglobina y hemoglobina glicosilada no son impresas (Wilson, 1993).

Ventajas

- No sufre interferencia de variantes de la hemoglobina (Wilson, 1993; Fluckiger, 1988).
- No interfieren cambios de temperatura o pH.
- No existe interferencia de la fracción lábil si ésta es tratada previamente (Glycated haemoglobin en, www.primusdiagnostics.com).
- No se ve afectada por el ejercicio físico realizado por el paciente (glyco-tek).
- HPLC técnica de referencia para NGSP (Agratti, 2008).
- Fue escogido como método de referencia por el DCCT (Wilson, 1993).
- No se ve afectado por la presencia de hemoglobinas anormales ni derivados de hemoglobina en pacientes urémicos, o por acetato ni por acetaldehído ni penicilina.
- Algunos métodos de IMx muestran interferencias con hemoglobinas anormales.
- Es menos vulnerable a efectos de temperatura

Desventajas

- Existen pocos sistemas disponibles en el mercado con esta metodología.
- Sufre interferencia de HbE, una hemoglobinopatía común en el sureste de Asia (Wiwanitkit, 2007).
- Requiere experiencia técnica requerida para procesar muestras (Wilson, 1993).

B.2- Mini o microcolumnas de afinidad

Dentro de una Columna plástica de pequeño tamaño de lo que recibe el nombre de Mini o de aún menor tamaño Micro se empaca una de resina celulosa con boronatos la cual tiene una fuerte afinidad por los azúcares de la hemoglobina glicosilada, por lo que al depositarse una muestra de hemolizado en la columna los boronatos se unen a la hemoglobina glucosilada de la muestra y todas aquellas hemoglobinas no glicosiladas se retiran mediante

lavados de un buffer. Posteriormente una solución de sorbitol por la que los boronatos tienen mayor afinidad, se adiciona y la hemoglobina glicosilada se libera y eluye por la columna su absorbancia podrá ser leída según el método utilizado y comparada frente a una lectura total de la hemoglobina de la muestra para determinar el % que representa la hemoglobina glicosilada de la hemoglobina total de la muestra (Fluckiger, 1988; Wilson, 1993; López, 1997).

Se utiliza cualquier espectrofotómetro para realizar la lectura de absorbancia tanto de la fracción no glicosilada como de la fracción glicosilada a una longitud de onda de 415 nm para realizar el cálculo del % de hemoglobina glicosilada de acuerdo a la fórmula general.

Ventajas

- No reciben interferencia de hemoglobinas anormales o variantes de hemoglobina (Wilson, 1993; Islas, 2002).
- No reciben interferencia de cambios de pH o Temperatura.
- No reciben interferencia de la fracción lábil de la hemoglobina.
- Se refieren como relativamente bajos en costo (Wilson, 1993).

Desventajas

- Reciben interferencias de muestras lipémicas, las cuales requieren de un tratamiento especial (lavado de eritrocitos previo a correr el ensayo).
- Los resultados que se reportan son solo % de HbG solamente y típicamente no se convierte a % de A1c estandarizado según el método de referencia (López, 1997).
- Experiencia técnica requerida para procesar muestras (Wilson, 1993).
- Cálculos manuales y falta de reporte impreso (depende del equipó).

3.3.4 Inmunoensayos

Estos métodos de inmunoensayo separan la hemoglobina glicosilada de la no glicosilada por diferencias en la estructura química (Gutiñas, 2003; Glycated hemoglobin en, www.primusdiagnostics.com). Los llamados métodos

inmunológicos o inmunoensayos se basan principalmente en la capacidad que tiene un anticuerpo específico para reconocer un antígeno o analito que se desea cuantificar o reconocer de una muestra biológica o fluido corporal.

El anticuerpo es obtenido del suero de un animal de laboratorio (oveja, cabra, conejo o cuyo) al cual se le ha inoculado el analito o antígeno y como respuesta de su sistema inmunológico se obtiene un anticuerpo específico para este antígeno en particular. Los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos pueden ser de tipo monoclonal o policlonal.

Los métodos por inmunoensayo han sido ideados con anticuerpos específicos para la fracción A1c. Esta fracción es entonces comparada con la hemoglobina total y el resultado es reportado como porcentaje (Fig. 21).

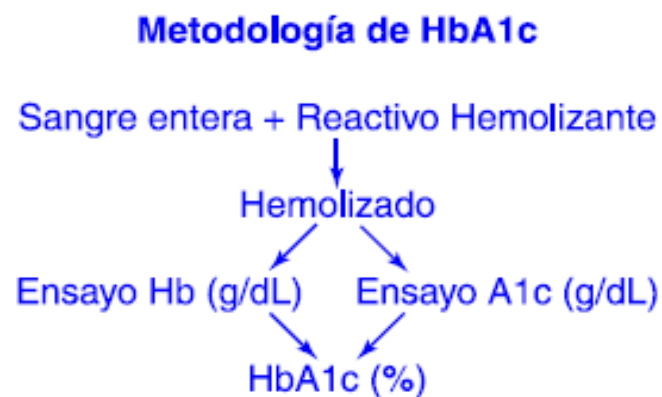


FIGURA 21. Esquema que muestra la metodología por inmunoensayo. Tomado de Synchron, 2007.

Otros métodos de inmunoensayo reconocen la glucosa unida al N-terminal de la cadena β (Weykamp, 1993; Glycated hemoglobin en, www.primusdiagnostics.com). Si el método es específico para A1c el ensayo fallará en detectar la glucosa unida a variantes de hemoglobina. Por lo tanto en casos donde son heterocigotos (HbAS, Ac, AF, etc) los resultados serán falsos bajos. Si las condición son homocigotas (HbSS,CC, etc) no será detectada la glicación (Wiwanitkit, 2007; Glycated hemoglobin en, www.primusdiagnostics.com).

Donde el anticuerpo específico es directamente hacia la unión glucosa N-terminal de la cadena beta y requiere que los primeros cuatro aminoácidos sean normales, así que las hemoglobinas variantes conteniendo alteraciones en algunos de los primeros cuatro a.a. no serán reconocidos y serán obtenidos resultados imprecisos.

Variaciones del tiempo de supervivencia normal en glóbulos rojos posee un problema potencial. El decremento del tiempo de vida de glóbulos rojos resulta en decrementos del nivel de glicosilación. Así las variaciones metabólicas son asociadas con las variantes de la hemoglobina del tipo homocigoto (Glycated hemoglobin en, www.primusdiagnostics.com).

El sistema controla el cambio de absorbancia a 410 nanómetros (que a diferencia de algunos otros métodos que leen la absorbancia en una longitud cercana a la de hemoglobina). Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina total en la muestra y es usado por el sistema para calcular y expresar la concentración de hemoglobina total (Synchron, 2007).

A.- Inmunoaglutinación en látex

La hemoglobina total y la HbA1c en hemolizado se unen con la misma afinidad a partículas de látex. El grado de unión es proporcional a la concentración relativa de ambas sustancias en la sangre.

El anticuerpo monoclonal HbA1c anti-humano de ratón se une a la HbA1c unida por partículas (Diasys 2007; Vogeser, 2008). El anticuerpo policlonal IgG anti-ratón de cabra reacciona con el anticuerpo monoclonal HbA1c anti-humano, produciéndose una aglutinación. La extinción medida es proporcional a la HbA1c unida por partículas que, a su vez, es proporcional al porcentaje de HbA1c en la muestra (Diasys, 2007).

B.- Turbidimétrico de inmunoinhibición.

Después de preparar un hemolizado, la concentración de la hemoglobina A1c (HbA1c) se cuantifica mediante un procedimiento inmunoturbidimétrico de inhibición (Bio Systems turbidimetria, 2007).

En primer lugar, mediante la adición de la muestra a un reactivo formado por anticuerpos dirigidos contra un sitio específico de la HbA1c, se forman complejos solubles formados por la unión de ambas moléculas. Tras la adición a la mezcla de reacción de un segundo reactivo compuesto por polihaptenos (un hapteno es un componente no proteico de bajo peso molecular), los anticuerpos anti-HbA1c excedentes forman complejos insolubles, anticuerpo-polihapteno y el complejo aglutinado resultante se mide turbidimétricamente (Fig.22) (Bio Systems, 2007; Synchron, 2007). La estimación del porcentaje de la Hb A1c se realiza por medición de la concentración de la hemoglobina total por espectrometría (Bio Systems turbidimetria, 2007).

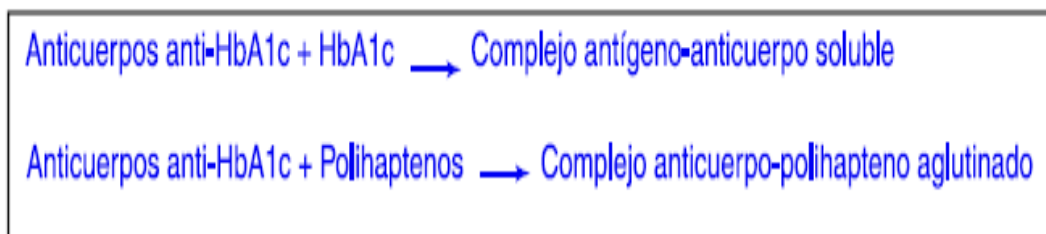


FIGURA 22. Esquema de la reacción química de inmunoinhibición.
Tomado de Synchron 2007.

El tanto por ciento de HbA1c en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general. Los valores obtenidos son trazables al método de referencia descrito por la IFCC (Bio Systems turbidimetria, 2007):

$$\% \text{ HbA1c} = \frac{\text{A1c (g/dL)}}{\text{Hb (g/dL)}} \times 100$$

Los valores trazables al método de referencia descrito por el NGSP se obtienen mediante la siguiente fórmula, convirtiendo el resultado IFCC al resultado equivalente NGSP (Bio Systems turbidimetria, 2007; Synchron, 2007).

$$\% \text{ HbA1c (NGSP)} = \frac{\text{A1c (g/dL)}}{\text{Hb (g/dL)}} \times 91,48 + 2,152$$

Ventajas.

- Especifico para HbA1c (Lapolla, 2005).
- No muestra diferencias sistemáticas significativas al ser comparados con el método de referencia descrito por la IFCC y con el método de referencia descrito por el NGSP (Bio Systems, 2007).
- Los resultados no se ven afectados por condiciones en la recolección de sangre, en su transporte o almacenamiento (Mayer, 1998).
- La hemoglobina F la cual no contiene cadena beta, no es detectada por métodos de inmunoensayo (Glycated hemoglobin, <http://www.primusdiagnostics.com>).
- No se observa ningún efecto de HbF hasta el 10% (rango normal <0,5%) (Synchron, 2007).
- La prueba de HbA1c no muestra reactividad cruzada con HbA0, HbA1a, HbA1b, hemoglobina acetilada, hemoglobina carbamilada, albúmina glicada, ni con el complejo de inclusión de hemoglobina acetaldehído (Weykamp, 1993; Bio Systems, 2007; Synchron, 2007).
- No se observa ningún efecto de HbS y HbC en muestras conteniendo estas variantes (Bio Systems, 2007; Synchron 2007; Wiwanitkit, 2007).
- Recientemente estandarizado (uso de anticuerpos) (Lapolla, 2005).
- The Roche Cobas Integra Gen 2 se estandariza ya que no presenta interferencia de variantes, una vez completado el proceso de estandarización solo el 5% de los laboratorios usaran métodos que muestren interferencia significativa para HbAS y/o HbAC (NGSP, 2009).
- No se ve alterado por HbE en técnica con anticuerpos (Wiwanitkit, 2007; NGSP, 2009).

- Algunos métodos siguen que es ideal para evaluar a pacientes con variantes de hemoglobina de menor % en el mundo (Higgins, 2005; Thevarajah, 2009).

Desventajas

- Alto costo.
- Valores bajos con respecto a HPLC (Lapolla, 2005).
- Sufre interferencia por muestras de pacientes con anemia hemolítica (Bio Systems, 2007; Synchron, 2007).
- Concentraciones muy elevadas de HbF pueden provocar valores de HbA1C inferiores a los esperados (Bio Systems, 2007).
- En el método por aglutinación puede haber interferencias debidas por muestras con altas concentraciones de lípidos, bilirrubinas o de derivados de la hemoglobina (Diasys, 2007).

3.3.5 Otros métodos utilizados

Con los avances de la tecnología en los últimos años han sido usados dispositivos portátiles para la medición del %HbA1c en un método de sentido óptico; sin embargo el tiempo de procesamiento toma algunos minutos comparados con algunos segundos en los convencionales dispositivos de medición de glucosa (Sang, 2006).

En este aspecto en Corea se creó un biochip desechable para medir el % de HbA1c en tiempo real usando un método de sentido electroquímico fue fabricado en el cual un par de electrodos interdigitales (IDA), un microbombeo y un microcanal son integrados en un chip por unión de un vidrio muy fino y una capa de polidimetilsiloxano (PDMS).

Principio del método

Para la medición del % HbA1c se usa un método de sentido electroquímico a través de un proceso sucesivo de oxidación y desoxidación (Fig. 23). Cuando el Fe^{2+} en la hemoglobina es oxidado a Fe^{3+} en un reparto de electrón mediado de

ferricianuro ($K_3Fe^{3+}(CN)_6$), el ferricianuro pasa a ($K_4Fe^{2+}(CN)_6$), y la corriente de flujo como un resultado aplicado a un potencial eléctrico.

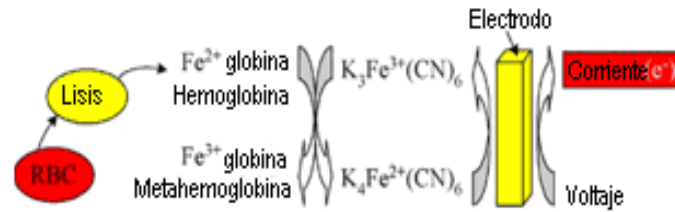


FIGURA 23. Mecanismo de la señal electroquímica en la hemoglobina.

Modificado de Sang, 2006.

La figura 24 muestra la visión esquemática de la medición del % HbA1c y los componentes del chip, un par de electrodos (IDA), una cámara de unión a HbA1c, una cámara de lisis de la muestra, un filtro, una micro bomba y un micro canal. La medición del proceso consiste en los siguientes pasos sucesivos: (1) una suspensión de sangre inyectada es transportada vía micro bombeo produciendo oxígeno por descomposición de peróxido de hidrogeno con un microcalefactor hacia el filtro y separadas en glóbulos rojos y plasma; (2) los glóbulos rojos en la cámara de lisis son rotos y se obtiene una mezcla de suspensión de HbA1c y hemoglobina, los cuales son separados en dos ramas de flujo; (3) la HbA1c en el flujo bajo es inmovilizada en la cabina de unión compactada con ácido m-amino-fenilborónico (m-APBA) en agarosa y la hemoglobina es liberada hacia la corriente de flujo superior; (4) consecuentemente la señal 1 y la 2 se incrementan cuando ambos flujos pasan por los IDA, resultando en una señal eléctrica vía reacción electroquímica. El % es calculado por ambas señales (Sang, 2006).

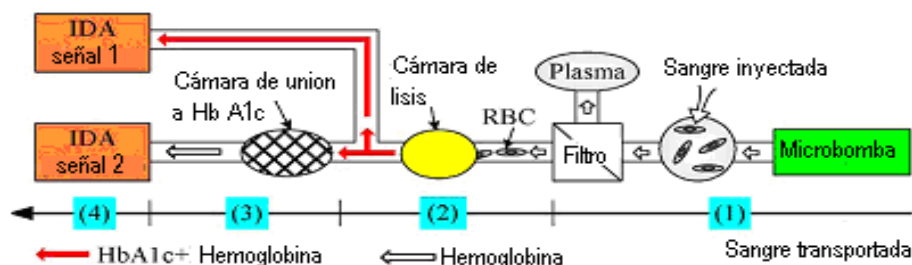


FIGURA 24. Esquema del proceso de medición del %HbA1c en el trabajo de Sang. Modificado de Sang, 2006.

En otro estudio realizado por Tsuyoshi Tanaka y colaboradores se desarrolló un chip mediante un sistema de inmunoensayo de flujo electroquímico para la detección de HbA1c. Se utilizaron anticuerpos (IgG) etiquetados con ácido ferroceno monocarboxílico (Fc-COOH) contra la Hb (HbA1c y no glicosilada), esta muestra fue pasada por una columna de cromatografía de afinidad a boronatos la cual utiliza el mismo principio ya antes visto, el complejo anticuerpo-HbA1c son retenidos en la columna por la afinidad de la HbA1c por el ácido borónico. Subsecuentemente la elución del buffer que contiene sorbitol se aplica para la elución del complejo anticuerpo-HbA1c. La corriente de oxidación electroquímica del complejo HbA1c-Fc-IgG en la elución es medida usando tres electrodos de célula de flujo (Tanaka, 2007). El diseño del sistema de inmunoensayo de flujo electroquímico se muestra en la figura 25.

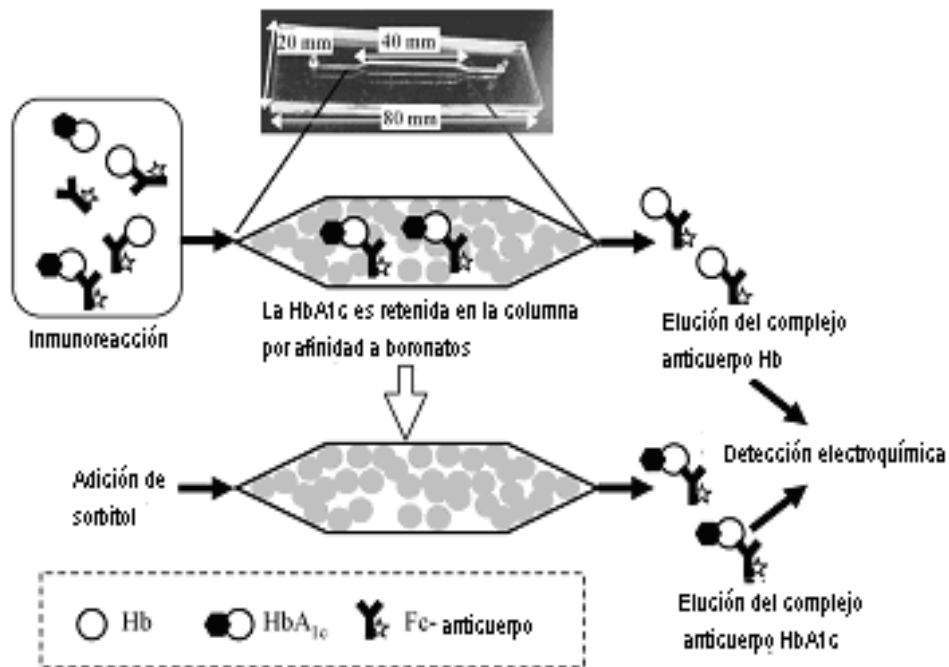


FIGURA 25. Diagrama esquemático de un chip en sistema de inmunoensayo de flujo electroquímico. Las especies eluidas pasan a través de células de flujo y la corriente asociada con el complejo HbA1c-Fc-IgG es monitoreada. Modificado de Tanaka, 2007.

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

Uno de los grandes problemas que enfrenta actualmente la humanidad, es el hecho de que la evolución biológica no va a la par con la evolución cultural. La maquinaria biológica (estructura tisular-orgánica-corporal, procesos metabólicos, etc.) es la misma de los antecesores de hace algunos años atrás. Pero las costumbres y estilos de vida cambian vertiginosamente. Con los siglos, las ocupaciones manuales y de alta actividad física disminuyeron, a favor de profesiones y oficios de mayor actividad intelectual, pero por ende más sedentarios. Simultáneamente la disponibilidad de alimentos es cada vez mayor para buena parte de la población y casi sin ningún esfuerzo físico. Las consecuencias de lo anteriormente descrito se ven en las enfermedades que mayor carga de morbimortalidad producen en el mundo entero como es el caso de la Diabetes Mellitus.

La población en México de personas con diabetes fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones (prevalencia nacional de 10.7% en personas entre 20 y 69 años). De este gran total, una gran cantidad de personas no han sido diagnosticadas (www.fmdiabetes.org). Por su magnitud y trascendencia, la diabetes mellitus tipo 1 y 2, son las más importantes, principalmente la tipo 2, que representa aproximadamente 90% de todas las formas clínicas y constituye un importante problema de salud pública, tanto a nivel internacional como nacional e institucional (Alpízar, 2008).

La diabetes mellitus es en México la primera causa de mortalidad en la población y se calcula que uno de cada diez mexicanos muere a consecuencia de este padecimiento, por desconocimiento, negligencia y desidia en su tratamiento y prevención de complicaciones (Secretaría de Salud, 2008). Por consiguiente, todo tratamiento para la diabetes (para cualquiera de sus tipos) deberá incluir una educación que permita al paciente tomar las riendas del padecimiento y junto con el equipo al cuidado de la salud, trazar estrategias y planes de cuidado para evitar a toda costa las complicaciones ocasionadas por este mal y para tener una vida totalmente saludable. Esto facilita alcanzar los

objetivos de control metabólico, que incluyen la prevención de las complicaciones a largo plazo, y permite detectar la presencia de la enfermedad en el núcleo familiar o en la población en riesgo. De las personas que han recibido educación con respecto a la enfermedad, pocas se involucran activamente en su tratamiento y puede definir los objetivos y medios para lograrlos de común acuerdo con el equipo de salud.

La difusión de la enfermedad entre la población debe hacer énfasis en la importancia de controlar los factores de riesgo asociados que hacen de la diabetes una enfermedad grave. Dichos factores son la obesidad, el sedentarismo, la dislipidemia, la hipertensión arterial y el tabaquismo. En 1988, Reaven observó que varios factores de riesgo tendían a estar juntos. A este conjunto lo llamó síndrome X, y posteriormente que la resistencia de insulina es la base del síndrome X por tanto el síndrome también se ha denominado como síndrome de resistencia de insulina. Actualmente es conocido como Síndrome Metabólico y es así que estas anormalidades antropométricas, fisiológicas y bioquímicas que ocurren simultáneamente, pueden dar oportunidad o estar ligadas a la resistencia a la insulina y, por ende, incrementar el riesgo de desarrollar diabetes mellitus, enfermedad cardiovascular o ambas (Alpízar, 2008; Pineda, 2008).

De tal forma que la difusión de estos factores de riesgo debe ser introducida en la población lo más pronto posible, la mayoría de personas que tienen el síndrome metabólico se sienten saludables y es posible que no tengan síntomas. Sin embargo, están a riesgo de desarrollar enfermedades graves. El descubrir si tiene el síndrome metabólico le permite ver su salud futura y determinar si está encaminándose hacia una enfermedad como la DM. También le dará tiempo de hacer importantes cambios en su estilo de vida antes de que se desarrollen complicaciones serias.

A pesar de que aún existe confusión respecto a la definición más apropiada para el síndrome metabólico y respecto a la fisiopatología fundamental que da lugar al mismo, se ha encontrado que más allá de discutir acerca de estas

cuestiones, la importancia de establecer el diagnóstico es alertar a los médicos respecto al riesgo elevado que tienen los pacientes de desarrollar una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus, pero también otras condiciones clínicas que pudieran estar relacionadas con la resistencia a la insulina (hipertensión arterial, poliquistosis ovárica, esteatosis hepática no alcohólica, apnea del sueño, etc.), por lo que el papel como médico no será sólo establecer el diagnóstico de SM, sino evaluar de forma integral al paciente a fin de establecer un manejo preventivo de las enfermedades cronicodegenerativas y con ello disminuir su prevalencia, ahorrando costos a las instituciones de salud y, sobre todo, para mejorar de forma general la salud de la población del país.

La educación diabetológica se considera hoy, por tanto, la piedra angular en todo programa de tratamiento. Sin ella, difícilmente se pueden obtener objetivos adecuados y razonables que no sean la mera subsistencia en espera de las inevitables consecuencias a medio y largo plazo (Cano, 1999).

Todos los pacientes tienen derecho a ser educados por personal capacitado, por lo tanto es necesario formar educadores en el campo de la diabetes. Esta formación se debe impartir preferiblemente a personas que pertenezcan al área de la salud. El médico es y debe ser un educador, el mensaje que da en el momento de la consulta es de gran importancia, por esto se recomienda que dedique de tres a cinco minutos de la consulta a los aspectos más importantes a la educación del paciente.

Los conocimientos básicos sobre la diabetes, no sólo los relacionados con la patología sino aquéllos referentes a la prevención y a la educación en diabetes, deben ser incorporados a los currículos de las facultades de medicina y ciencias de la salud.

El bioquímico que asume plenamente su participación en la terapia del paciente diabético también debe saber cual es su participación dentro del equipo de salud que pretende ayudar al diabético. Por ser el laboratorio una de

las partes más importantes dentro del monitoreo del paciente y tras la obtención y análisis de los parámetros de seguimiento se da la pauta a seguir para comprender si el éxito o fracaso de una terapia se debe al tipo de esquema terapéutico al estado socioeconómico del paciente, a la no adecuada selección de los medicamentos o a la transgresión directa de la terapia por parte del paciente; esto mediante la observación de alteraciones en los valores de referencia de las pruebas evaluadas.

Una de las actividades de la salud pública y de la medicina preventiva que despierta mayores expectativas entre profesionales y la población es la educación para la salud, esta implica la transmisión de un mensaje de un emisor a un receptor. Los elementos clave de este proceso de comunicación son el educador o sea toda aquella persona que contribuye de forma consciente o inconsciente a que los individuos adopten una conducta en beneficio de la salud, además el mensaje y las personas o grupos a los que éste se dirige.

Actualmente en México existe una amplia difusión acerca de la enfermedad para ello el sector salud se ha auxiliado de boletines informativos, carteles y propaganda variada, campañas de salud, información en las aulas académicas, existen también programas de salud en donde la población necesitada puede acudir y en donde se hará un seguimiento más detallado de su estado de salud.

Paradójicamente, en algunos grupos en que la necesidad de capacitación es mayor, la escasa accesibilidad a los servicios de salud y educativos impide que se puedan realizar actividades efectivas. Por lo que se considera de gran importancia e impacto la labor educativa que se puede realizar a través de otros medios de comunicación como el radio y la televisión; así se llega a un mayor número de personas, y la facilidad económica para su adquisición les permiten estar disponible en todos los círculos sociales, y en el caso de la radio es el medio de comunicación al que puede tener acceso otro sector de la sociedad como son los automovilistas y jornaleros, quienes no tienen

necesariamente que dejar sus actividades cotidianas para escuchar los mensajes que en ella se manejan.

De la forma en que se lleve a cabo la difusión lo que se busca es crear esa conciencia entre la población de mejorar su estilo de vida de esta forma si se ataca el problema de raíz se evitan muchos problemas tanto físicos como económicos a nivel gobierno como familiar y principalmente personal. Lamentablemente la población mexicana solo hace uso de esta información cuando ya es demasiado tarde y se ha desarrollado la enfermedad o se tiene alguna complicación.

Algo que hay que resaltar aquí y que es de gran importancia es que al igual que muchos pacientes no acuden al médico en etapas tempranas de la enfermedad, muchos de los que lo hacen no llevan a cabo una adecuada terapia, esto es que muchos de ellos no cambian sus hábitos de vida o lo hacen solo cuando se vuelven a sentir mal, y de aquellos que lo hacen un mínimo porcentaje administra los medicamentos en el tiempo o forma correcta, generando así que al visitar al médico los resultados clínicos pertinentes se encuentren alterados con respecto al valor real, ya sea que se evidencie un adecuado control cuando no lo hay o en su defecto se tome un tratamiento más agresivo cuando no es necesario.

Cerca del 50 % pierde el control adecuado después de cinco a diez años de tratamiento, por lo que es necesario evaluar a mediano plazo la administración de la insulina para su control. Los expertos señalan que es muy difícil que la diabetes desaparezca, no obstante, se podrá retardar su aparición e impedir las complicaciones que genera lo que constituirá un valioso logro para el futuro (Kuri, 2001). Es conveniente analizar los factores relacionados con la atención que se brinda a los enfermos por parte de la familia y de los servicios de salud, ya que el tratamiento de la diabetes constituye una condición permanente, lo que tiene implicaciones de costo económico considerable, así como de desgaste en las relaciones familiares.

La forma de diagnosticar si un paciente tiene diabetes, es a través de los signos y síntomas (hiperglucemia, hipertensión arterial, polidipsia, poliuria, polifagia, etc.) y para confirmar o descartar la presencia de esta enfermedad, se han desarrollado pruebas del tipo estímulo-respuesta. La glucemia en ayunas es la prueba más sencilla para el tamizaje oportunísimo de DM en personas asintomáticas que por algún motivo acuden a un servicio de salud. Sin embargo, para la detección de diabetes en estudios poblacionales la medición de la glucemia 2 horas post carga de glucosa, es de gran importancia. Es muy importante tener en cuenta que una prueba de tamizaje solo indica una alta probabilidad de tener DM y debe ser confirmada con una prueba diagnóstica.

La Curva de Tolerancia a la Glucosa Oral (CTGO) es una prueba que mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa, de manera que en los sujetos con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, esta capacidad se encuentra alterada, y en el caso particular de los sujetos con DM2, esta capacidad se encuentra disminuida. Este tipo de prueba se debe practicar en personas con alteración previa de la glucosa, diagnóstico de síndrome metabólico hipertenso con otro factor de riesgo asociado, triglicéridos mayores de 150 mg/dl con HDL menor de 35 mg/dl, familiares diabéticos en primer grado de consanguinidad, antecedentes obstétricos de DMG y/o de hijos macrosómicos (Aschner, 2006).

En la actualidad esta prueba ya no es realizada en muchos de los laboratorios ya que han encontrado algunas circunstancias como hiperglucemia en ayuno, pacientes hospitalizados gravemente enfermos o en reposo prolongado y personas con estrés agudo en los cuales puede provocarse una complicación mayor, por tal razón se realiza casi siempre una prueba de glucosa común, esto también es debido a la gran demanda de pacientes diabéticos y por tanto sólo suele hacerse cuando es indicado por el médico o en laboratorios particulares con una prueba de glucosa sencilla con anterioridad o datos de automonitoreo reciente.

La morbimortalidad tan elevada que presenta la DM, obliga a la búsqueda de nuevos enfoques diagnósticos en relación con el control metabólico (López, 1997). Entre ellos destaca por su importancia el valor de la hemoglobina glicosilada.

Las ventajas que ofrece esta determinación son varias, es una determinación objetiva, independiente de la cooperación del paciente ya que puede estar influido negativamente por una serie de factores que tienen que ver con la adherencia del paciente y la calidad de su control por los equipos de salud (Laclé, 2004); de esta forma se puede decir que sirve para confirmar diabetes si se sospecha que existe ya que da una imagen real del control metabólico de la persona, si miente sobre sus hábitos alimenticios, o tratamiento terapéutico como los que acostumbran tomar el medicamento cuando van a ir con su médico. Esta prueba no es similar a la determinación de la glucosa que solo representa la condición del paciente en ese lapso, ésta a su vez evidencia el control del paciente a lo largo de la vida de los eritrocitos. El análisis de las glucemias supone el conocimiento puntual de cómo se encuentra nuestro organismo y como reacciona ante las inyecciones de insulina, la comida, etc., pero no basta por sí solo para saber si se está realizando un buen control de la diabetes, sobre todo si el número de determinaciones de glucemia capilar es escaso, nada nos dice sobre el control metabólico medio ni sobre la corrección metabólica conseguida con los cambios efectuados al interpretar las glucemias (www.diabetesjuvenil.com).

De esta forma la medición de hemoglobina glicosilada sirve como control de calidad de las determinaciones de glucemia, detectando datos fraudulentos o erróneos e indicando la necesidad de revisar el programa de tratamiento y educación del paciente diabético.

También tiene ventajas sobre las condiciones de la muestra, como ya se vio, una determinación de glucosa en orina se realiza principalmente a aquellas personas que tienen problemas mayores y muchas veces esta determinación no es del todo confiable; ahora bien cuando se solicita una muestra de glucosa

sérica, está condicionada al tipo de determinación que se haga, por ejemplo ya que la diabetes no distingue edades ni condición y por tal razón se tienen pacientes que es difícil obtener la muestra, y si ésta es muy poca, o está hemolizada, en determinaciones que leen la absorbancia de la reacción, se encuentra con una alteración. En tanto en la hemoglobina glicosilada se puede determinar usando la sangre entera (hasta muy pequeñas cantidades, normalmente 100 microlitros – 0.1mL) para luego hemolizarla, y solo se obtienen algunas interferencias con muestras de concentraciones lipémicas elevadas.

Otra ventaja que ofrece con respecto a la glucosa normal es en relación de la ingesta u hora del día que se tome. La determinación de glucosa se ve alterada por el consumo de alimento de unas cuantas horas, ya sea que se ha adquirido o no alimento, habrá una fluctuación en el valor de ésta; no así en la determinación de la hemoglobina glicosilada en donde lo que se cuantifica es la glucosa unida a la hemoglobina que está contenida en el interior del eritrocito y como esta unión se realiza reversiblemente, lo que realmente se mide es el control objetivo y verdadero que posee el paciente.

Como no son necesarias las determinaciones continuas se reduce también el control a un único número, esto es que como la vida del eritrocito promedio es de cerca de 120 días, para considerar un seguimiento del control se necesitarían cerca de 4 determinaciones anuales. Así que esta prueba complementa las pruebas de rutina del control diario hecho en casa por los pacientes diabéticos con pruebas de sangre u orina (López, 1997).

Al método de determinación de hemoglobina glicosilada también pueden considerársele ciertas desventajas no obstante estas son inferiores a todo lo aportado. Entre ellas se encuentra que documentan si el control metabólico es bueno o malo, pero no dicen qué hay que hacer para mejorarlo; a su vez cifras buenas pueden ocultar oscilaciones inaceptables y, especialmente, hipoglucemias asintomáticas, es en este punto donde entran las determinaciones de glucosa que comúnmente se realizan. Como es una

metodología que se esta integrando al sector salud de forma creciente no existe una estandarización adecuada y requieren una tecnología avanzada y personal especializado y que actualmente llega a ser deficiente para algunos laboratorios y debido a la mínima difusión de este tipo de prueba los pacientes que acuden a realizarse un estudio como este se encuentran con precios ligeramente elevados. Sin embargo se espera que en los siguientes años sea mayor la cantidad de pacientes que decidan tener un control mas especifico de su enfermedad o solo por precauciones para no llegar a presentarla.

Con todo lo anterior se puede decir que su importancia está en aumento, porque mantener sus valores dentro de la normalidad constituye un objetivo a alcanzar en el tratamiento del paciente diabético. En este sentido, los niveles de hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) representa hasta el momento la mejor prueba de laboratorio que determina si la diabetes se tiene bajo control. Mantener la HbA1c, por debajo del 7%, representa actualmente, uno de los principales objetivos de lograr y sostener por toda persona con diabetes.

Hay que tener en cuenta que la determinación de hemoglobina glicosilada se realiza para un control a largo plazo en los pacientes con diabetes mellitus, pero no sirve para diagnosticar la enfermedad (Barrón, 2000; Sánchez, 2000; Gardner, 2008, Análisis de la glucemia en, www4.ujaen.es), ya que aunque una HbG elevada es indicativa de hiperglucemia es muy insensible para descartar intolerancia a la glucosa o diabetes moderada y de tal manera que no sustituye a las determinaciones cuantitativas o semi-cuantitativas de glucosa sanguínea cuando se pretende establecer el grado de control metabólico en pacientes con diabetes mellitus, sino que debe emplearse en forma adicional ya que cada uno nos da información diferente (López, 1997). El monitoreo de glucemia nos informa de la concentración de glucosa en el momento de la extracción de la muestra y nos permite hacer las modificaciones pertinentes inmediatas en la dieta, ejercicio, hipoglucemiantes o insulina. La HbG nos informa del pasado, la glucemia prevalente de las últimas ocho a 12 semanas.

La mayoría de los diabetólogos considera más importante el nivel de HbG que una determinación aislada de glucosa plasmática en el laboratorio, porque esta última es sólo un punto en una línea fluctuante y la primera un índice del promedio, debido a esta cualidad, la HbG se ha convertido en el estándar de oro para evaluar la calidad del control crónico en la diabetes mellitus (Barrón, 2000). El porcentaje de glicosilación es proporcional al tiempo y a la concentración de glucosa, en otras palabras, los glóbulos sanguíneos más viejos tendrán un mayor porcentaje de hemoglobina glicosilada y aquellas personas mal controladas (con períodos de altas concentraciones de glucosa sanguínea) tendrán un mayor porcentaje en su resultado. Por el contrario, aquellas personas que han mantenido un buen control metabólico, vigilado y controlado tendrán un porcentaje de hemoglobina glicosilada en valores más cerca a los normales. Esto es especialmente cierto para la hiperglucemia, comparado con la hipoglucemia, dando lugar al aforismo de que la hemoglobina glicosilada es «más sensible al pecado que a la penitencia», posiblemente debido a la irreversibilidad relativa del reajuste de Amadori para formar la cetoamina (Mato, 2008).

El mes previo a la determinación de la HbA1c es fundamental y contribuye al 50% del resultado. La razón es que el recambio celular de nuestros glóbulos rojos es un proceso continuo, por lo que siempre predominarán los glóbulos rojos más jóvenes y esto hace que el último mes de glucemias tenga una mayor representación en el resultado de la HbA1c que los 2 anteriores. Esto explica por ejemplo, que si durante el último trimestre se ha tenido un excelente control, excepto el último mes, entonces el valor de HbA1c sería más elevado de lo esperable, y por el contrario, si solamente el último mes se han conseguido buenas glucemias, sucedería lo inverso. Una consecuencia positiva de lo expuesto anteriormente es que si nos proponemos mejorar nuestro control podemos ver cambios positivos en la HbA1c en un plazo tan corto como 3 a 4 semanas (Antuña, 1998).

Los resultados permiten concluir que la hemoglobina glicosilada es el patrón de oro para el control del paciente diabético. Si ésta fuera determinada en todo el

Sistema de Salud, sus niveles reflejarían la calidad del sistema, y permitirían establecer comparaciones entre pacientes y la severidad de la condición entre las diferentes regiones geográficas y áreas de salud. Los valores superiores al 7-8% probarían la insuficiencia de la intervención en los grupos estudiados al igual que el estatus de cada paciente. Su implementación, tanto en disponibilidad como con una técnica única o similares, debe ser obligatoria en todas las áreas de salud, y la meta debe ser que todos los pacientes diabéticos tengan un nivel de HbA1c menor al 6.5%.

Actualmente en nuestro país la determinación de este parámetro se considera como una medida relativa que requiere utilizar una metodología reproducible y llevar a cabo todas las determinaciones en un aparato confiable y preciso.

En el presente trabajo se trató de complementar la información de una manera muy general, debido a que existen muy diversos y variados equipos para la determinación de la hemoglobina glicosilada, los cuales cada uno de ellos se agrupa en la clasificación propuesta aquí. La bibliografía ya sea de artículos e insertos (Insert Package) consultada refiere los mismos principios, de tal forma que se utilizó sólo aquella que brindaba la información para complementar y así poder entender un poco más acerca de esta determinación tan importante en el control adecuado de pacientes con Diabetes Mellitus. Comúnmente el método usado para la medición son calibrados con materiales de calibración que poseen una concentración asignada por los laboratorios de referencia, y el control de calidad será ejecutado sistemáticamente por todos los laboratorios (Lapolla, 2005), no obstante existen muchos laboratorios que trabajan con métodos (equipo) no estandarizados o controlados, sin embargo hay que tener presente que cada laboratorio debe establecer su propio programa de control de calidad interno, así como procedimientos de corrección en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias aceptables; deben establecer sus propios rangos normales y utilizar sólo el equipo, refacciones y reactivos brindados por su proveedor.

Hoy en día se han diseñado nuevas formas para la evaluación de la hemoglobina glicosilada como la fabricación de un biochip en Corea (Sang, 2006), el cual combina tecnología más avanzada con similares principios de determinación (afinidad a boronatos). Estudios similares fueron realizados en Japón (Tanaka, 2007), combinando también procesos electroquímicos y tecnología avanzada con principios de cromatografía de afinidad, inmunoensayo y técnicas electroforéticas para evidenciar sus resultados. Son estos avances en donde se ponen a prueba diversos materiales que mejoren la evaluación de esta determinación, y se espera que para estos años se pongan a prueba en la evaluación a la eficiencia para enfrentarse a desventajas que presentan las demás metodologías.

Es así que con estos avances la metodología para la determinación de hemoglobina glicosilada pretende llegar a la población presentándose como una prueba que ayuda evidentemente al adecuado control de pacientes con DM y que a través de la amplia difusión de ésta se tenga una mayor accesibilidad propiciando que el costo de las pruebas disminuya con el evidente adelanto en el adecuado control antes de que lleguen a desarrollar complicaciones mayores que alteren su integridad, la de las familias y la del país.

CONCLUSIONES

- ✓ La Diabetes Mellitus es una enfermedad que la padecen miles de personas, presentándose en muchas ocasiones de una forma silenciosa, hasta que se hace evidente a través de otras complicaciones fisiológicas y metabólicas, que afectan en gran medida la integridad de las personas.
- ✓ Existen factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de la enfermedad por tanto es de gran importancia el ampliar la calidad de difusión para disminuir esta problemática desde el principio, creando esa conciencia entre la población de mejorar su estilo de vida evitando así mayores problemas.
- ✓ La determinación de hemoglobina glicosilada, es un marcador más sensible y específico que una determinación de glucosa y permite tomar medidas de control adecuadas para mejorar la calidad de vida del paciente diabético.
- ✓ Se trata de un marcador del control metabólico en los pacientes con diabetes mellitus, pero no sirve para diagnosticar la enfermedad ya que es muy insensible para descartar intolerancia a la glucosa o diabetes moderada, y no puede sustituir al monitoreo de glucémias.
- ✓ La determinación de hemoglobina glicosilada ofrece varias ventajas, es una determinación objetiva, independiente de la cooperación del paciente, se puede determinar usando la sangre entera en muy pequeñas cantidades, no hay fluctuaciones con respecto a la relación de ingesta u hora del día que se tome, reduce el control a un único número.
- ✓ Existen diversas metodologías en el mercado, las cuales son similares en el fundamento de la técnica sin embargo cada una detecta o cuantifica de diferente forma, diferentes fracciones o grupos específicos de la hemoglobina que es capaz de unirse a glucosa.

BIBLIOGRAFÍA

- Agratti, G. (2008). Hemoglobina Glicosilada por HPLC. Laboratorio de Análisis Clínicos Dr. Stamboulían. Extraído el 05 de mayo de 2009 desde http://www.revistabioanalisis.com/arxius/Nota2_23.pdf.
- Allen, D., Schroeder, W. y Balog, J. (1958). Observations on the Chromatographic Heterogeneity of Normal Adult and Fetal Human Hemoglobin: A Study of the Effects of Crystallization and Chromatography on the Heterogeneity and Isoleucine Content. *Journal of the American Chemical Society* **80(7)**:1628-1634.
- Alpizar Salazar, M. (2001). “Guía para el manejo integral del paciente diabético”. Editorial. El Manual Moderno, México, D.F.
- Alpizar Salazar, M. (2008). “Guía para el manejo integral del paciente diabético”. Tercera edición. Editorial. Alfil, México, D.F.
- Antuña de Alaiz, R. (1995). Folleto informativo: La hemoglobina glicosilada ¿Qué debe saber el paciente? Clínica diabetológica. Extraído el 09 de abril de 2009 desde <http://www.clinidiabet.com/files/hgba1es.pdf>
- Antuña de Alaiz, R. (1998). Hemoglobina glicosilada. Extraído el 05 de mayo de 2009 desde www.diabetes.bayer.es/pdf/micro.pdf
- Antuña de Alaiz, R. (2001). Folleto informativo: Todo sobre hemoglobina glicosilada [Hgb A1c] para pacientes con diabetes tipo 2 Clínica diabetológica. Extraído el 05 de mayo de 2009 desde <http://www.clinidiabet.com/files/hgbat2es.pdf>
- Aschner, P. (2006). “Guías ALAD de diagnóstico control y tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo 2”. Asociación Latinoamericana de Diabetes 2007.

- Babic, A. y Sacks, D. (2003). Glycated hemoglobin. The marker for long-term glycemic control of diabetes mellitus. *Clinical Laboratory News*. Extraído el 09 de abril de 2009 desde [www.google.com](http://www.aacc.org/publications/cln/series/2003/Documents/glycated_hemoglobin_Feb2003.pdf) en http://www.aacc.org/publications/cln/series/2003/Documents/glycated_hemoglobin_Feb2003.pdf
- Barrón Uribe, C. (2000). Sistema de actualización médica en diabetes (SAM). Primer libro. Sociedad mexicana de nutrición y endocrinología.
- Brandan, N. y Aguirre, M. (2008). Hemoglobina- Cátedra de Bioquímica. Facultad de Medicina UNNE. Extraído el día 03 de marzo de 2009 desde [www.google.com](http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/hemoglobina.pdf) en <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/hemoglobina.pdf>
- Carrillo Farga, J. y Pérez Vega, S. (2000). “El Atlas de Hematología”. Editorial CyberCell, México, DF.
- Ceballos Alienza, R. (2005). “Novedades en Diabetes: Atención Integral y Tratamiento”. Editorial Formación Alcalá, España.
- Díaz Hernández, D. y Burgos Herrera, L. (2002). ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? *IATREIA* **15(3)**:179-189.
- Fernández Mejía, C. (1996). Biología molecular de la diabetes mellitus. *Revista de endocrinología y nutrición* **4(3)**: 55-62.
- Figueroa, D. (2003). “Diabetes”. Cuarta edición. Ed. Masson, Barcelona España.
- Fischbach Talaska, F. (1997). “Manual de Pruebas Diagnosticas”. Quinta edición. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, D.F.
- Fluckiger, R. y Mortensen, B. (1988). Glycated Haemoglobins. *Journal of chromatography* **429**: 279-292.

- Gardner, D. y Shobank, D. (2008). “Endocrinología básica y clínica de Greenspan”. Séptima edición, Ed. El Manual Moderno, México, D.F.
- Gómez Cruz, Z. y Pérez Molina, J. (2005). Factores relacionados con la hemoglobina glucosilada anormal en el puerperio inmediato. *Ginecol Obstet México* **73(11)**:591-595.
- Guerra, M., Alvarado, M., Librado, D. y Torres, A. (2005). Relación entre la hemoglobina glicosilada, antioxidantes totales y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 controlados y no controlados en Bogotá. *Universitas Scientiarum Revista de la Facultad de Ciencias* **10**:91-97.
- Guntiñas de la Calle, M. y Wissiack, R. (2003). Determination of haemoglobin A1c by liquid chromatography using a new cation-exchange column. *Journal of Chromatography B* **791**:73–83.
- Henry, B. (2007). “El laboratorio en el Diagnostico Clínico”. Vigésima edición. Ed. Marban Libros S. L. Madrid, España.
- Hernández Valencia, M. (2005). Conceptos recientes en la etiopatogenia de la diabetes gestacional. *Ginecol. Obstet. México* **73(7)**: 371-377.
- Higgins Trefor, N. y Bernice R. (2005) Tentative identification of hemoglobin variants in the Bio-Rad VARIANT II Hb A1C method. *Clinical Biochemistry* **38**:272– 277.
- Insert Package Bio Systems. (2007). Hemoglobina A1c determinación cromatográfica espectrofotométrica de Intercambio Iónico. Extraído el día 03 de marzo de 2009 desde www.google.com en <http://www.biosimex.com.mx/pdf/insertos/CROMATOGRAFIA/11044%2011045.pdf>

- Insert Package Bio Systems. (2007). Hemoglobina A1c determinación por turbidimetria. Extraído el día 17 de marzo de 2009 desde www.google.com en <http://www.biosystems-sa.com/Methods/13044c.pdf>
- Insert Package DiaSys. (2007). Reactivo para la determinación cuantitativa *in vitro* de hemoglobina A1c en sangre entera en equipos fotométricos en general. DiaSys Diagnostic Systems Holzheim Alemania. Extraído el día 07 de mayo de 2009 desde www.google.com en www.abdiagnostics.com.mx/tecnicas%20del%20reactivo/diasys/PI-s-HbA1c.pdf
- Insert Package DIATRAC HbA1c. (1995). Electroforesis Sistem for glycated haemoglobin. BECKMAN INSTRUMENTS, BREA, CALIFORNIA.
- Insert package EAGLE DIAGNOSTICS (2008). Método para la determinación de hemoglobina glicosilada por intercambio iónico de afinidad.
- Insert Package Helena Glyco-Tek Affinity Column Method. Helena Laboratories Beaumont Texas. Cat No. 5351. Extraído el día 02 de abril de 2009 desde www.google.com en www.helena.com/Procedures/Pro025Rev9.pdf
- Insert Package. Sistemas Synchron. (2007). Hemoglobina A1c para uso diagnostico in vitro. *Beckman Coulter*.
- Insert Package. Stanbio. (2000). Stanbio Glicohemoglobina (Pre-Fil) Para la Determinación Cuantitativa Colorimétrica de la Glicohemoglobina en sangre total. Laboratorios Licon. Extraído el día 07 de mayo de 2009 desde www.google.com en <http://www.licon.com.mx/insertos/stanbio/glycohemoglobina%20MAS-23.pdf>

- Inset Package. Systems. (2007) Determinación cuantitativa *in vitro* de glucosa y triglicéridos en suero o plasma en sistemas fotométricos. Laboratorios Diagnostic Systems International. Alemania.
- Islas Andrade, S. y Lifshitz Guinzberg, A. (2002). “Diabetes mellitus”. Vigésima novena edición. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, México D.F.
- Kuri Morales, P. (2001). La Diabetes en México. *Periodismo de Ciencia y tecnología*. Extraído el día 05 de junio de 2009 desde www.google.com en <http://www.invdes.com.mx/antiores/junio2001/htm/diabem.html>
- Laclé-Murray, A. y Jiménez Navarrete, F. (2004). Calidad del control glicémico según la hemoglobina glicosilada vs la glicemia en ayunas: Análisis en una población urbana y otra rural de diabéticos costarricenses. *Acta Médica Costarricense* **46(3)**:139-144.
- Lapolla, A., Traldib, P. y Fedele, D. (2005). Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clinical Biochemistry* **38**:103– 115.
- Little, R., Hsiao-Mei, W., Jack, D., Herbert, K. y David, E. (1991). Interlaboratory Comparison of Glycohemoglobin Results: College of American Pathologists Survey Data. *Clinical Chemistry* **37(10)**:1725-1729.
- López, J. y López Salazar, Y. (1997). Evaluación metabólica de diabéticos no insulino dependientes hospitalizados mediante glicemia, hemoglobina glicosilada y hemoglobina A1c. *Gaceta Médica Caracas* **105(3)**:319-334.
- Manual de operación. Bio Rad. (1990). Analyzer Sistem Fort he quantitative Measurement of Hemoglobin A1c and/or Hemoglobin A1 (a+b+c), Bio-Rad Clinical División.

- Manual de operación. Bio Rad. Micromat II. (2003). “Instrumento para Hemoglobina A1c”. Extraído el día 02 de abril de 2009 desde http://www.caravanas.salud.gob.mx/descargas/capacitacion/abril2008oaxaca/EQS_HB_Glucosilada_Instructivo.pdf
- Manual para el manejo de las insulinas. (2001). Segunda edición. Ed. Secretaria de Prevención y protección de la salud. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica, México, DF. Extraído el día 04 de marzo de 2009 desde www.google.com en www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL&250.pdf
- Martínez-Duncker, I., Palomares, L., Sánchez, D., Mollicone, R. e Ibarra, I. (2008). Trastornos congénitos de la glicosilación: abordaje clínico y de laboratorio. *Acta Pediatr Mex* **29(2)**:78-88
- Mathews, C., Van Holde, K. y Ahern, K. (2002). “Bioquímica”. Tercera edición. Ed Addison Wesley, Madrid, España.
- Mato Felix, Efrain (2008). Glicosilación de las proteínas sanguíneas. *SIRIVS*. Curso Investigación II.
- Mayer, B. (1998). “Diabetes mellitus: Diagnosis and Treatment”. Cuarta edición. Ed. WB Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Méndez Chacón, E. y Rosero Bixly, L. (2007). Comparación de los resultados de pruebas de laboratorio seleccionados de un estudio poblacional de adultos en Costa Rica. *Revista electrónica Población y Salud Mesoamericana* **5(1)**: 15.
- Méndez Pérez, P., Hernández Domenecha, R. (2005). Epidemiología de la Diabetes mellitus tipo 1 en el Hospital Materno Infantil de Badajoz. *Vox Paediatrica* **13(2)**: 31-38.

- Ministerio de salud. (2005). Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 1. Santiago Minsan. Basado en protocolo AUGE presentado en 2004.
- Molina Ayala, M. (2005). Sistema de actualización médica en diabetes (SAM). Tercer libro. Vigésima novena edición. Ed. Sistema internacional editores.
- NGSP, 2009 Actualización noticias. Extraído el día 05 de mayo de 2009 desde <http://www.ngsp.org/prog/index3.html>
- Peñuela Oscar, A. (2005). Hemoglobina: una molécula modelo para el investigador. *Colombia Médica* **36(3)**: 215-225.
- Pfreundschoch, M. y Scholmerich, J. (2002). "Fisiopatología y bioquímica". Editorial Elsevier Science Harcourt, Madrid, España.
- Rajarathnam, R., Pan, Y., Donald, D., Chen, Y., Datwileyer, D. y Tottathil, J. (2005). An efficient preparation of polyanionic affinity agent and its evaluation for the measurement of glycated haemoglobin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**:3467–3473.
- Sánchez Rodríguez, W. (2000). Hemoglobina glucosilada. Extraído el día 18 de mayo de 2009 desde <http://quimicosclinicos-xalapa04.spaces.live.com> en <http://www.scribd.com/doc/8551475/HEMOGLOBINA-GLUCOSILADA>
- Sang, U., Jee-Hoon, S., Yo, H. y Lee, S. (2006). Fabrication of a disposable biochip for measuring percent hemoglobin A1c (%HbA1c). *Sensors and Actuators A* **130(131)**:267–272.
- Secretaria de Salud. (2008). Programa de acción específico 2007-2012. Diabetes Mellitus. Subsecretaria de prevención y promoción de salud. México, D. F.

- Stanley, B. y Bowes, M. (1985). Glycosylated haemoglobins and their role in management of diabetes mellitus. *Biochemical Education* **13(1)**:2-6.

- Tanaka, T., Shoko, T., Izawa, K; Okochi, M., Watanabe, S., Harada, M. y Matsunaga, T. (2007). Electrochemical detection of HbA1c, a maker for diabetes, using a flow immunoassay system. *Biosensors and Bioelectronics* **22**:2051–2056.

- Thevarajah, M., Nadzimah, M. y Chew Y. (2009) Interference of hemoglobinA1c (HbA1c) detection using ion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) method by clinically silent hemoglobin variant in University Malaya Medical Centre (UMMC)—A case report. *Clinical Biochemistry* **42**: 430-434.

- Turgeon, M. (2006). “Hematología Clínica: Teoría y procedimiento”. Editorial El Manuel Moderno, México, D.F.

- Vogeser, M. y Parhofer, K. (2008) Head-to-head comparison of an automated immunometric and automated HPLC method for the quantification of HbA1c. *Clinical Biochemistry* **41**: 1410-1412.

- Weykamp, C., Theo, J. Frits, M. y Willem, S. (1993). Influence of Hemoglobin Variants and Derivatives on Glycohemoglobin Determinations, as Investigated by 102 Laboratories Using 16 Methods. *Clin Chem* **38(8)**:1717-1723.

- Wilson, H., Bogacz, P., Cathy, M., Philip, J., Theresa, L., Robin, C. y Douglas, R. (1993). Fully Automated Assay of Glycohemoglobin with the Abbott IMx Analyzer: Novel Approaches for Separation and Detection. *Clinical Chemistry* **39(10)**:2090-2097.

- Wiwanitkit Viroj. (2007). Problem of using hemoglobin A1C measurement in endemic area of hemoglobinopathy. *Primary Care Diabetes Europe* **173**:175.
- Hemoglobina glicada. Extraída el día 13 de marzo de 2009 desde <http://www2.ucg.br/cbb/downloads/LABIC/HemoglobinaGlicada.pdf>.
- Hemoglobina glicosilada A1c. Extraído el día 03 de junio de 2009 desde <http://www.biodiagnostics.com.mx/bc/216.php>
- Hemoglobina glicosilada. Extraído el día 05 de junio de 2009 desde www.diabetesjuvenil.com/documentos_html/dj_autocontrol_2.asp
- www.cancerinfo.es/index.php?textoid=21&orden=6. Extraído de www.google.com el día 29 de septiembre de 2009
- Diabetes. Extraído el día 05 de junio de 2009 desde www.fmdiabetes.org/v2/paginas/index.php.
- “Glycated (Glycosylated) Hemoglobin (The Superiority of HPLC Boronate Affinity)”. Extraído el día 02 de abril de 2009 desde www.primusdiagnostics.com/primus/files/Glossy%20%20Superiority%20HPLC%20Bor%20Affin%202006.pdf
- Hemoglobina glicosilada: el marcador de la diabetes. Extraída el día 17 de marzo de 2009 desde www.google.com en www.rochediagnos-tics.com.ar/.../Hemoglobina%20Glicosilada%20EL%20MARCADOR%20DE%2...
- Tema 2: Análisis de la glucemia y parámetros relacionados”. Extraída el día 03 de marzo de 2009 desde www.google.com en www4.ujaen.es/~esiles/TEMA%202.pdf