

49  
2e.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**"DIFERENTES METODOLOGIAS PARA LA DETECCION CLINICA  
DE LA HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (GHb)."**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**FELIPE EDMUNDO NAVARRETE CARO**

**ASESOR: QFB CAROLINA MORENO RAMOS**

**CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.**

**1997.**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos

Diferentes Metodologías para la Detección Clínica de la Hemoglobina

Glucosilada (Ghb).

que presenta el pasante: Felipe Edmundo Navarrete Caro  
con número de cuenta: 8553962-0 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

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

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlan Izcalli, Edo. de Méx., a 19 de Agosto de 1997

PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Idalia Avila Miyazawa</u>	<u>[Firma]</u>
VOCAL	<u>Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	<u>[Firma]</u>
SECRETARIO	<u>Q.F.B. Carolina Moreno Ramos</u>	<u>[Firma]</u>
1er. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Antonio Sánchez Ortega</u>	<u>[Firma]</u>
2do. SUPLENTE	<u>Q.F.B. Martha Patricia Campos Peón</u>	<u>[Firma]</u>

**AGRADEZCO A DIOS**

**EL HABERME PERMITIDO VIVIR CON PLENITUD  
TODOS ESTOS MOMENTOS Y VER TERMINADO ESTE  
PROYECTO.**

**A MIS PADRES**

**QUIENES LES DEBO TODO LO QUE SOY.  
DE QUIENES SOLO HE RECIBIDO AMOR,  
COMPRESION Y APOYO. PARA USTEDES  
CON MUCHO CARIÑO ESTE TRABAJO.**

**A CLAUDIA**

**DE QUIEN SIEMPRE HE RECIBIDO AMOR Y  
CONFIANZA. Y QUIEN SIEMPRE HA ESTADO  
A MI LADO EN TODO MOMENTO.**

**PARA CAROLINA**

**UN MUY ESPECIAL AGRADECIMIENTO A LA QFB CAROLINA MORENO  
RAMOS QUE ADEMAS DE MI ASESORA SIEMPRE ME HA DISTINGUIDO  
CON SU SINCERA AMISTAD.**

## INDICE

	Hoja
<b>1.-Objetivos</b>	<b>4</b>
1.1.- Objetivo General	4
1.2.- Objetivos particulares	4
<b>2.-Generalidades</b>	<b>5</b>
2.1.-Diabetes Mellitus	6
2.1.1.- Clasificación de la diabetes mellitus.	12
2.1.2.- Complicaciones de la diabetes mellitus.	14
2.2.-Datos demográficos de la diabetes mellitus.	17
2.3.-Diabetes mellitus y economía.	19
2.4.-Incidencia y prevalencia de diabetes mellitus.	20
2.5.-Tratamiento, control y diagnóstico de diabetes mellitus.	21
<b>3.-Hemoglobina Glucosilada</b>	<b>27</b>
3.1.-Formación de HbA1 en eritrocitos.	32
3.2.-Importancia Clínica de la hemoglobina glucosilada.	35
<b>4.-Métodos de cuantificación</b>	<b>41</b>
4.1.-Métodos por Afinidad	42
4.1.1.-Cromatografía de Columnas por Afinidad	45
4.1.1.1.-Mini o Microcolumnas de Afinidad	47
4.1.1.2.-Cromatografía Líquida de Alta Resolución por Afinidad (HPLC)	49
4.1.2.-Captura Iónica	51
4.2.- Inmuno Ensayos	55
4.2.1.-Inmuno aglutinación en Látex	59
4.2.2.-Inmuno Ensayos Enzimáticos	61

4.3.-Métodos de Separación por carga	63
4.3.1.-Electroforesis	64
4.3.2.-Cromatografía de Columnas por Intercambio Iónico	69
4.3.2.1.-Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de Intercambio Iónico	70
4.3.2.2.-Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico	74
4.3.2.2.1.-Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico para HbA1	75
4.3.2.2.2.-Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico para HbA1c	77
5.-Discusión	79
5.1.-Métodos por Afinidad	82
5.2.-Métodos por Intercambio Iónico	85
5.2.1.-Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Intercambio Iónico	85
5.2.2.-Columnas Desechables de Intercambio Iónico	88
5.2.3.-Electroforesis	90
5.3.-Inmunoensayo	92
6.-Conclusiones	94
6.1.-Conclusiones con respecto al tipo de muestra.	95
6.2.-Con respecto a la Metodología utilizada.	96
6.3.-Con respecto al tiempo de proceso y el grado de automatización.	98
6.4.-Con respecto a la cantidad de Capital con que cuenta el laboratorio.	100
7.-Referencias citadas	101

## **1.-Objetivos**

### **1.1.-Objetivo General**

**Realizar una recopilación bibliográfica con la finalidad de proponer un texto que permita seleccionar eficientemente el método o técnica más adecuado para un laboratorio interesado en determinar hemoglobina glucosilada a su pacientes según los criterios de precisión velocidad y costo.**

### **1.2.-Objetivos particulares**

- 1.2.1.-Llevar a cabo una recopilación bibliográfica de los diferentes métodos para la determinación de hemoglobina Glucosilada (GHb).**
- 1.2.2.-Realizar la comparación técnica y práctica de los diferentes métodos existentes para la determinación de hemoglobina Glucosilada ( GHb ).**

## **2.-Generalidades**

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. Se han desarrollado también nuevos métodos para evaluar la glucemia entre los que destaca la prueba de la hemoglobina Glucosilada (GHb) . 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.

En este trabajo se persigue principalmente que todos aquellos interesados en el control de los niveles de glucosa de pacientes afectados por la diabetes mellitus posean información suficiente para seleccionar el método de determinación de hemoglobina Glucosilada idóneo, que se satisfaga al 100% las necesidades de su laboratorio, centro de investigación u hospital en los aspectos de precisión, sensibilidad, exactitud, automatización y costo. Sin embargo antes de iniciar el tema de instrumentación es quizá conveniente mencionar algunos aspectos generales sobre esta enfermedad y algunos datos demográficos que nos ayuden a entender la importancia de diagnosticar más rápido y con mayor precisión los estados y fases de los pacientes afectados.

## **2.1.-Diabetes Mellitus**

La diabetes mellitus es un síndrome heterogéneo que se caracteriza por la presencia de hiperglucemia, consecuencia de una deficiencia absoluta de insulina o de una resistencia tisular a su acción. Es un síndrome que implica una serie de complicaciones metabólicas a largo plazo que afectan la mayor parte de aparatos y sistemas. La sintomatología se relaciona con las anomalías del metabolismo, que pueden conducir a una amplia variedad de trastornos macrovasculares y microvasculares. Entre las manifestaciones macrovasculares encontramos miocardiopatías, ataques cerebrovasculares o enfermedades vasculares periféricas; entre las alteraciones microvasculares encontramos retinopatía, nefropatía o neuropatía periférica. 2

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.

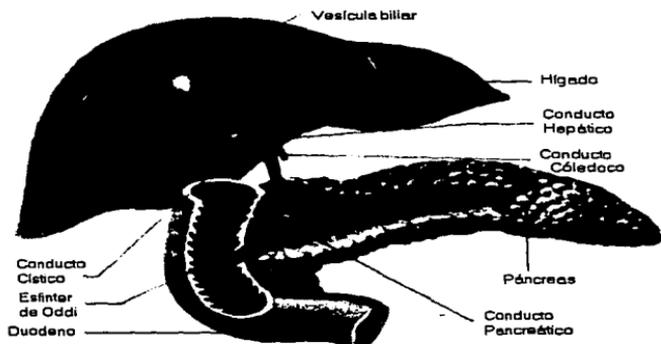
El Páncreas ; Es una masa irregular de tejido, situada entre el estómago y el intestino delgado, anatómicamente consta de tres partes: cabeza, cuerpo y cola. (Fig. 1). El Páncreas se encuentra en la parte posterior superior del estomago y sus dimensiones promedio aproximadas son 15 cm de largo y 7 cm de ancho y 5 cm de fondo su función principal es ser una glándula de acción endógena y exógena. Su función endógena se refiere a la producción de dos hormonas relacionadas con la síntesis de los carbohidratos para la obtención y almacenamiento de energía. Estas dos hormonas son el Glucagón y la Insulina.

Dentro de su función exócrina secreta el jugo pancreático que contiene enzimas que intervienen en la hidrólisis de proteínas, grasas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Secreta a nivel endógeno insulina y glucagón que vierte en la corriente sanguínea y son independientes del jugo pancreático que interviene en la digestión.

El papel de la insulina es muy importante para el aprovechamiento de los carbohidratos en la obtención de energía.

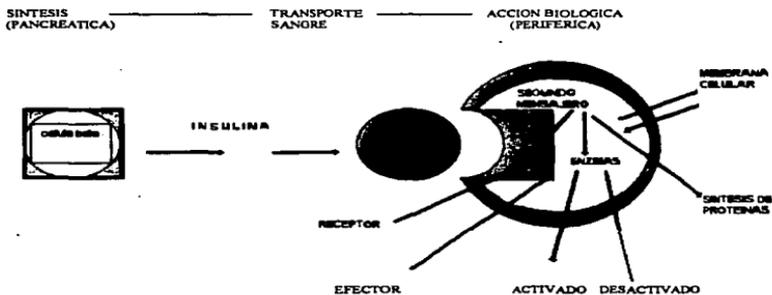
El páncreas es el responsable de poner en circulación a la insulina para que esta tenga efecto directo sobre otros tejidos y órganos para metabolizar los carbohidratos. De su buen funcionamiento, síntesis correcta de insulina y correcta secreción en momento y cantidad depende la presencia o no de los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

La enfermedad resultado del mal funcionamiento del páncreas o de la ausencia de insulina y en su caso de la presencia pero falta de actividad de insulina se conoce como diabetes mellitus.

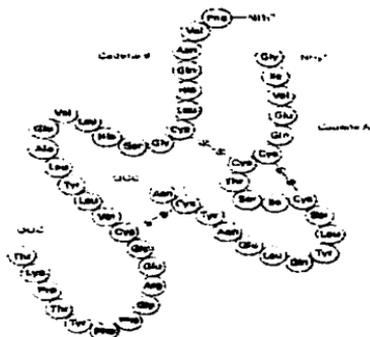


**Fig.1 Esquema del páncreas y su ubicación anatómica. 14**

El glucagon se produce en las células alfa de los islotes de Langerhans y su función principal es el obtener energía a partir del glucógeno almacenado en el tejido muscular, mientras que la insulina se produce o sintetiza a partir de las células Beta de los Islotes de Langerhans y se vierte a torrente sanguíneo, cuando llega a tejidos se une a un receptor celular específico que esta unido a un efector que a su vez activa un segundo mensajero su función principal es el transformar a los carbohidratos en glucógeno para servir como materia de reserva en la producción de energía. (Fig. 2). La insulina es un polipeptido lineal de doble cadena unido por 2 puentes de disulfuro y un conector o peptido C. (Fig. 3)



**Fig.2 Mecanismo de acción de la insulina sobre receptor y segundo mensajero.**



**Fig. 3 Estructura de la insulina. Cadena A, Cadena B . 22**

En la actualidad se considera que el término tradicional de diabetes mellitus no se refiere en realidad a una sola enfermedad sino a una familia de síndromes que tienen como común denominador la hiperglucemia y el trastorno metabólico. »

La mayor parte de los casos de diabetes mellitus pueden dividirse en dos tipos: tipo I o insulino dependiente y tipo II no insulino dependiente. La diabetes tipo I se presenta, por lo general durante la infancia o adolescencia, si bien su aparición puede acontecer a cualquier edad. Los pacientes pueden mostrarse enfermos de forma aguda en el momento del diagnóstico, con hiperglucemia grave y otros trastornos metabólicos. Esta situación se asocia a defectos inmunes específicos que se cree son los elementos causales de la destrucción, por medio de un mecanismo autoinmune, de las células beta del páncreas. Los individuos con diabetes tipo I son casi siempre delgados y con tendencia a la cetosis. Su tratamiento se basa en la administración de insulina y en terapia dietética y ejercicio físico. » La diabetes tipo II es de mayor frecuencia y se presenta generalmente avanzada la edad del individuo y se relaciona principalmente con hábitos alimenticios y trastornos metabólicos.

Sin embargo además de los tipos I y II se pueden agregar a la clasificación de la diabetes la denominada diabetes gestacional y la diabetes mellitus secundaria (intolerancia a la glucosa). »

### **2.1.1. Clasificación de la diabetes mellitus**

#### **Diabetes tipo I**

La diabetes mellitus tipo I ( dependiente de insulina ) se caracteriza en general por un inicio súbito de polidipsia, poliuria y polifagia que progresan rápidamente y que pueden desencadenar hasta una cetoacidosis diabética. Se acompaña de insulinopenia y dependencia de la aplicación de insulina para llevar una vida normal . En la fase inicial de ese tipo de diabetes se puede identificar en algunos pacientes la presencia de anticuerpos antiinsulina, lo cual sugiere el carácter inmunológico de la fisiopatogenia. »

#### **Diabetes tipo II**

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 el desarrollo de cetoacidosis diabética y puede presentarse como hiperosmolar. Los pacientes no necesitan insulina exógena para corregir la hiperglucemia ya que tienen insulina circulante que incluso puede encontrarse en concentraciones superiores a los valores de referencia. »

#### **Diabetes gestacional**

Este término se refiere a la hiperglucemia que se descubre durante el embarazo y ocurre aproximadamente entre el 2 el 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 II en los siguientes 10 años. »

### **Diabetes mellitus secundaria**

Esta variedad es rara y se relaciona con defectos en la secreción pancreática de insulina y con interferencias para que ejerza su acción sobre las células efectoras (Fig. 2). Los defectos e interferencias se pueden agrupar de la manera siguiente:

- a) Destrucción pancreática en la que se reduce la secreción de insulina como ocurre en los casos de pancreatitis, fibrosis quística, hemocromatosis y pancreatectomía.
- b) Exceso de hormonas "antagónicas" a la insulina como en la enfermedad de Cushing, acromegalia, glucagonoma, feocromocitoma e hipertiroidismo puede asociarse con diabetes.
- c) Fármacos de tipo de las tiacidas, diuréticos, glucocorticoides y agentes adrenérgicos pueden causar diabetes o simplemente intolerancia a los hidratos de carbono.
- d) Genéticos, existe una variada patología como es la -mitonia distrófica, la distrofia muscular, la ataxia y los síndromes de Turner , Klinefelter. a

### **2.1.2.-Complicaciones de la diabetes**

Las complicaciones que puede tener el diabético pueden ser agudas o tardías donde se refiere especialmente a las lesiones de nivel metabólico y del tipo vascular respectivamente. »

Las complicaciones de tipo agudo se presentan en la diabetes tipo I y se presentan cuando el paciente no ha sido controlado debidamente, situación que podría llevarlo a un "shock" hipoglucémico, coma por hiperglucemia y cetoacidosis. »

En las complicaciones tardías la hiperglucemia es la alteración básica para el establecimiento de las complicaciones clínicas, ya que al haber concentraciones altas de glucosa se producen una serie de alteraciones bioquímicas en órganos "blanco" por glucación. »

Esta glucación conduce a alteraciones en la función que se pueden valorar al registrar la velocidad de conducción nerviosa o si se mide el índice de filtración glomerular. Las alteraciones funcionales conducen a lesiones estructurales en estos tejidos "blanco", como por ejemplo la desmielinización de la fibra nerviosa o la proliferación mesangial y cambios vasculares en la retina. Estas son complicaciones clínicas más frecuentes referidas; neuropatía, retinopatía y nefropatía. »

Complicaciones de la diabetes pueden clasificarse en: **Agudas y Tardías.**

#### **COMPLICACIONES AGUDAS**

Shock hipoglucémico

Coma hiperglucémico

Cetoacidosis

#### **COMPLICACIONES TARDIAS**

##### **Microangiopatía**

Coronaria

Nefropatía

Periférica

##### **Macroangiopatía (arteriosclerosis)**

Retinopatía

Cerebral

Neuropatía

Es necesario definir por su alta frecuencia dentro de las complicaciones metabólicas agudas, a la cetoacidosis diabética, misma que se presenta en pacientes tipo I.

### **Cetoacidosis diabética**

La cetoacidosis diabética aparece asociada con la suspensión del tratamiento por insulina o a consecuencia de estrés en pacientes que siguen tomando insulina.

La disminución de las concentraciones de insulina ( con o sin aumento concomitante de catecolaminas ) causa aumento de la lipólisis y suministra un máximo de ácidos grasos libres al hígado y al haber concentraciones plasmáticas muy altas de ácidos grasos libres, se satura la vía de oxidación y esterificación del hepatocito, lo que conduce a hígado graso e hipertrigliceridemia además de cetoacidosis. »

La cetoacidosis es el resultado de la deficiente actividad de la insulina y del exceso de la actividad de hormonas contraregulatorias, como el glucagon, la hormona del crecimiento, el cortisol y las catecolaminas. Como resultado de esta alteración, la glucemia aumenta, así la lipólisis y la gluconeogénesis. La oxidación de los lípidos da lugar a los cuerpos cetónicos que causan la acidosis. »

## **2.2.-Datos demográficos de la diabetes mellitus**

En 1991 la Secretaría de Salud de México a cargo en ese entonces del Dr. Jesús Kumate Rodríguez y basado en el último censo de población de este país reportó los siguientes datos en el International Diabetes Directory .4

México es un país con una población total de 85,593.000 habitantes, y la prevalencia de diabetes mellitus es:

Pacientes Insulino dependientes: 5 - 10 % del total de los diabéticos.

Pacientes No Insulino dependientes: 85 - 90 % del total de los diabéticos.

Pacientes Insulino dependientes: 0.8 - 1 % de la población total.

Pacientes No Insulino dependientes: 8 - 10 % de la población total.

Esto a grandes rasgos nos indica que para 1991 aproximadamente el 10 % de los mexicanos sufrían o padecían diabetes mellitus en cualquiera de sus dos principales tipos.4

El Instituto Mexicano del Seguro Social ( IMSS ) ampara a poco más de 40% de la población en México. La mortalidad por diabetes entre los derechohabientes del IMSS ha aumentado en los últimos años. También se ha observado un incremento en la demanda de hospitalización por diabetes que es casi 5 veces mayor que el correspondiente a otras enfermedades.1

El número de consultas anuales por diabetes dadas por médicos familiares aumentó de 400,000 a 2,000,000 durante el periodo comprendido entre 1980 y 1989; en el mismo lapso , el número de consultas por especialidades aumentó de 52,000 a 280,000 al año. Durante este periodo, la población amparada por el IMSS creció en un 60%, mientras que las consultas por diabetes de primer nivel (medicina familiar) aumentaron en 341% y por especialidades debido a diabetes en 438%. En lo que se refiere a mortalidad, la diabetes ha mostrado una tendencia ascendente en los dos decenios pasados. La contribución de la diabetes ha aumentado de 7% del total de las causas de muerte en 1976 a 13% en 1991. 1

Desde la perspectiva diagnóstica, se necesitan pruebas específicas que permitan un diagnóstico más preciso, una determinación del grado de control de la glucemia alterada y una evaluación y definición de las complicaciones asociadas y de los factores de riesgo. 2

De la situación que se presenta en la institución que atiende a más del 40% de la población Mexicana, se desprende la importancia de no sólo implantar un método certero como la hemoglobina Glucosilada para el control de los pacientes diabéticos, si no el implementar una metodología para este ensayo que permita hacerlo de manera confiable y rápida. La necesidad de seleccionar un método certero y además adecuado a el volumen de demanda de cada centro es pues de gran importancia, si se pretende atender mejor y a más Mexicanos.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que exige cuidados médicos permanentes. Como consecuencia, las pruebas de laboratorio se han convertido, en los últimos años, en elementos de evaluación y seguimiento. La diabetes mellitus es una enfermedad muy frecuente que afecta a unos 14 millones de europeos y a unos 13 millones de norteamericanos, muchos de los cuales no han sido aún diagnosticados. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) estas cifras crecen a una velocidad de 7 % anual. Su prevalencia aumenta con la edad, y casi la mitad de los casos aparecen en pacientes de más de 65 años. Pero quizás una cifra que permite valorar aún más la importancia de esta patología es el hecho de que anualmente 150,000 norteamericanos y 140,000 europeos fallecen como consecuencia directa de la propia enfermedad o de sus complicaciones.2

### **2.3.-Diabetes Mellitus y la Economía**

La diabetes mellitus no sólo es una enfermedad altamente prevalente, sino también una enfermedad cuya atención requiere de grandes gastos a nivel individual y a nivel mundial. Según David E. Goldstein : en 1992 tan sólo en los Estados Unidos de Norte América uno de cada 7 dólares gastados en Salud fueron gastados en atención de pacientes diabéticos principalmente en complicaciones crónicas de esta enfermedad.s

A nivel mundial la diabetes mellitus es una de las enfermedades crónicas más serias y prevalentes. En los Estados Unidos de Norte América se diagnosticaron para 1992, 7.2 Millones de pacientes que sufrían en menor o mayor grado las secuelas de esta enfermedad. La productividad de los países se ve afectada seriamente cuando tomamos en cuenta datos como el siguiente: En 1992, 47,800 trabajadores fueron permanentemente incapacitados para continuar sus labores productivas debido a la diabetes mellitus, 48,259 muertes fueron reportadas y relacionadas directamente a pacientes que sufría diabetes mellitus mientras que otras 118,678 muertes fueron relacionadas con pacientes que sufrían este trastorno. Finalmente se agrega en este reporte que la diabetes es la causa mas común de la ceguera, falla renal y las amputaciones de pierna en adultos. s

Dadas las estadísticas de la morbilidad y mortalidad, no es sorprendente que el aspecto económico cobre importancia pues se estima que los costos directos de la atención a pacientes en los Estados Unidos de Norte América en 1992 fueron estimados entre 30 y 40 Billones de Dólares y los gastos indirectos resultaron entre 40 y 50 Billones de Dólares.s

## **2.4.-Incidencia y Prevalencia de Diabetes Mellitus**

En los últimos decenios se han observado cambios importantes en el comportamiento epidemiológico de la diabetes mellitus en el mundo. Cada vez resulta más evidente que existen diferencias geográficas en la prevalencia de la diabetes y de sus tipos clínicos principales. La diabetes mellitus insulino dependiente ( DMID ) es más frecuente en los países del norte de Europa que en el resto del mundo, mientras que su frecuencia es muy baja en los países asiáticos. En algunas áreas geográficas se han observado, durante períodos definidos, un aumento en la incidencia de este tipo de diabetes. 1

La diabetes tipo II se presenta generalmente en individuos de mayor edad y se asocia con frecuencia a obesidad ( en estos sujetos la pérdida de peso puede por sí sola mejorar e incluso normalizar los niveles plasmáticos de glucosa ). Los pacientes con diabetes tipo II no presenta habitualmente tendencia a la cetoacidosis, a excepción de fases activas de la enfermedad o a situaciones de estrés. 1

## **2.5.-Tratamiento, Control y Diagnóstico de la diabetes mellitus**

Tratamiento, control 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.

### **Tratamiento de la diabetes mellitus**

El tratamiento puede incluir inyecciones de insulina o sustancias orales que disminuyen los niveles plasmáticos de glucosa (hipoglucemiantes orales), así como terapia dietética , reducción de peso y ejercicio físico. 2

La utilización de inyecciones de insulina sintética o natural es en realidad un tratamiento de sustitución por la ausencia o falta de acción de la insulina propia del paciente.

La insulina se encuentra disponible para los pacientes diabéticos en tres formas principales: Actividad rápida, intermedia y lenta o prolongada.

### **Control y Diagnóstico de la diabetes mellitus.**

El control y diagnóstico de esta enfermedad se encuentran vinculados entre la dieta adecuada a estos pacientes y la constante revisión de los niveles de glucosa en sangre presentes en el paciente.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica que requiere cuidado médico constante. Como consecuencia de esta situación su diagnóstico con pruebas de laboratorio se ha convertido en un aspecto importante en el cuidado, evaluación, manejo y control de esta enfermedad. Pruebas específicas se requieren para establecer el diagnóstico, determinar el grado de alteración en el control glucémico y para definir y asociar las complicaciones de los factores de riesgo de esta enfermedad. 7

El realizar pruebas diagnósticas para la evaluación del paciente diabético da al médico mayor información sobre la terapia a seguir a corto plazo y disminuye la posibilidad de complicaciones vasculares en corto tiempo.7

La recomendación de la Organización Mundial de la Salud sobre cuales y que tan frecuentemente deben ser las pruebas de laboratorio que se realice un paciente diabético en un año se basan en los standards recomendados por la Asociación Americana de diabetes y estos son:

- 1.- Glucosa plasmática en ayuno; su utilidad es evaluar el control glicémico en la diabetes tipo II.
- 2.- Glucosa plasmática de toma aleatoria; puede ser obtenida en pacientes no diagnosticados y que hasta el momento no presentan síntomas para propósitos de diagnóstico. Puede ser usada también para comparar valores obtenidos de metodologías caseras de auto control.
- 3.- GHb ( hemoglobina glucosilada ); Esta prueba deberá ser utilizada dos veces al año en todos los pacientes y hasta cuatro veces en pacientes tratados con insulina y a aquellos de bajo control metabólico.
- 4.- Perfil de lípidos en Ayuno; uno cada año en adultos y dos cada año para infantes.
- 5.- Creatinina en suero; en adultos o si se presenta proteinuria.
- 6.- Uriálisis ; debe realizarse anualmente y verificar presencia de cetonas , glucosa y proteínas .después de que el diagnóstico de la diabetes tenga 5 años o después de la pubertad. La excreción total urinaria de proteínas deberá realizarse anualmente por medio de un método de Microalbuminuria.
- 7.- Cultivo urinario; sólo si el examen microscópico es anormal o si se presentan síntomas.
- 8.- Pruebas de función Tiroidea; T4 y TSH.
- 9.- EGO; examen general de orina, solo en adultos.7

Existe también la referencia de utilizar como perfil de pruebas de laboratorio en el diagnóstico de la diabetes las pruebas por separado de Microalbumina para la evaluación del funcionamiento renal y la realización de la prueba de Fructosamina.:

### **Fructosamina**

Genéricamente se denominan así las concentraciones de albúmina y otras proteínas séricas glucosiladas. Estas proteínas séricas tienen una vida relativamente corta de aproximadamente una a dos semanas y la concentración media de glucemia sólo puede valorarse durante un periodo más corto.:

Sin embargo la característica principal de la diabetes mellitus es la hiperglicemia presente en todos los pacientes, por tanto el evaluar la concentración en suero de la glucosa es la prueba principal para descartar si un individuo sufre o no de esta enfermedad y también es importante para conocer si este individuo lleva un control adecuado de su metabolismo en la ingesta de carbohidratos y control de la misma enfermedad.

### **Diferentes alternativas para la evaluación de la glucemia.**

Existen diversas pruebas clínicas de evaluar el grado de glucemia presente en un paciente. Cuando se utilizan adecuadamente juegan un papel crítico en la determinación del grado del control realizado por el plan de tratamiento asignado a cada paciente.

Las pruebas diagnósticas de glucosa para pacientes diabéticos se pueden agrupar según el tipo de muestra que utilizan:

**Suero o Plasma**  
**Sangre Total**  
**Orina**

#### **Pruebas de Glucosa en Orina**

El papel de las pruebas de glucosa en orina ha decrecido en años recientes. Los ensayos de glucosa en orina pueden potencialmente ofrecer resultados erróneos por las variaciones de la conducta renal y porque las pruebas en orina no pueden detectar hipoglicemia, en consecuencia pruebas en suero son necesarias para confirmación. Las pruebas de orina son útiles en la determinación de niveles de cetonas misma que es una parte importante en el manejo de la diabetes.

#### **Pruebas de Glucosa en Suero**

Este tipo de pruebas son las más utilizadas para la determinación de glucosa, las modernas técnicas enzimáticas ofrecen resultados rápidos, confiables y exactos. Existen un gran número de estos métodos incluyendo el de la glucosa en sangre en ayuno, la prueba aleatoria de glucosa en sangre y el de la tolerancia oral a la glucosa.

#### **Pruebas de Glucosa en Sangre total**

Las determinaciones en sangre total generalmente son pruebas rápidas y son consideradas sólo para el control personal de los pacientes, sin embargo existen programas de salud institucionales que recurren al uso de este tipo de muestra al tener que revisar a grandes grupos de individuos en el afán de distinguir porcentajes de incidencia de la diabetes.

La glucosa en suero en ayuno frecuentemente utilizada en el diagnóstico de pacientes asintomáticos, es el método óptimo para el control de pacientes con diabetes tipo I.

Por mucho tiempo el standard 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 utilizada en la actualidad.

También se pueden clasificar por su capacidad de entregar un resultado de concentración exacto o de interpretación de rango en:

Cuantitativas  
Semi cuantitativas

O por el grado de automatización e instrumentación que involucran en:

Manuales  
Semi automatizadas  
Automatizadas

Finalmente por el tipo de principio químico o físico que utilizan :

Hexocinasa  
Glucosa oxidasa  
Conducción eléctrica

La determinación en suero de glucosa que utiliza tiras de papel impregnadas de glucosa - oxidasa es extremadamente útil para el autocontrol de pacientes a pesar de ser necesario pruebas de laboratorio de tiempo en tiempo para verificar la precisión de este control casero.7

Las pruebas realizadas en el control de estos pacientes pueden variar desde métodos que utilizan tiras reactivas impregnadas de glucosa oxidasa, de interpretación semi cuantitativa hasta técnicas que implican la utilización de auto analizadores que realizan lecturas espectro-fotométricas con diferentes metodologías enzimáticas o de punto final. Sin embargo la principal diferencia es la utilización de programas de control de calidad que garantizan la fiabilidad y confianza de estos resultados.

La concentración de glucosa en suero fluctúa a lo largo del tiempo. La 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.

Finalmente con la introducción del ensayo de hemoglobina Glucosilada (GHb) a principios de los años ochenta se obtuvo un ensayo que brindaría información sobre el nivel glucémico de un paciente a largo plazo e información válida no sólo en ese momento.

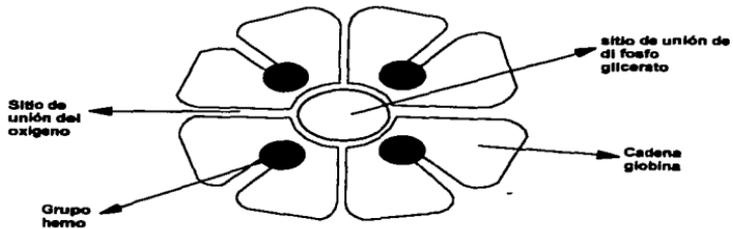
### **3.-Hemoglobina Glucosilada**

Se ha mencionado que la vida media de las células rojas o eritrocitos, es de aproximadamente 120 días y que se originan en la médula del hueso. 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. 12

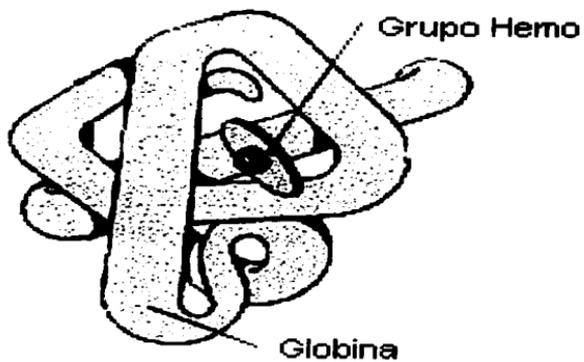
La función principal de la hemoglobina es transportar los gases de la respiración, mientras que los eritrocitos a su vez tienen como función transportar a la hemoglobina. La hemoglobina tiene como peso molecular 68,000 daltons; comprende 4 cadenas de amino ácidos , cada una unida a un componente hemo. Son las moléculas del grupo hemo las 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. Un eritrocito maduro o adulto contendrá en su interior alrededor de 640 millones de tetrameros de hemoglobina. 9

La estructura primaria de la hemoglobina consiste en una secuencia lineal de amino ácidos, unida por uniones covalentes, componiendo así las cadenas polipeptídicas. Las cadenas polipeptídicas forman una hélice ( estructura secundaria ) que se mantiene por puentes de hidrogeno entre grupos Carbonilo (C=O) y Amida (N-H) de ciertos péptidos. La hélice se dobla en una forma compacta, rugosa y esférica ( estructura terciaria ), la cual se mantiene gracias a fuerzas de van der Waals, puentes de hidrogeno y puentes de sales. La estructura terciaria es un monómero consistente en una cadena globina y un grupo hemo. En esta estructura los amino ácidos polarizados se encuentran en la cara exterior, mientras que los no polares se encuentran en el interior.

Esta carga eléctrica en la superficie es una característica importante para la identificación de diferentes tipos de hemoglobinas. La estructura terciaria puede sufrir agregaciones (estructura cuaternaria) : dos cadenas forman un dímero y cuatro cadenas forman un tetrámero. La hemoglobina en su forma funcional es un tetrámero consistente de dos pares de esferas hemo - globina. (Fig.4 y 5).



**Fig.4** Esquema del Tetrámero de la hemoglobina; modelo esquemático del arreglo monomérico y los sitios de unión de la hemoglobina. »



**Fig.5 Esquema de la estructura terciaria de hemoglobina; modelo esquemático del arreglo monomérico. »**

Cada célula roja empieza su vida sin hemoglobina glucosilada, 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 tetrameros de la hemoglobina la formación de la hemoglobina glucosilada como tal ocurre en dos pasos (Fig. 6) :

1.- El azúcar circulante en la sangre pasa través de la pared celular del eritrocito y reacciona con la hemoglobina .

En este primer paso la unión el azúcar a la hemoglobina ocurre rápidamente y esta unión azúcar - hemoglobina es reversible por lo que si la concentración de azúcar decrece la unión reversible se rompe fácilmente .

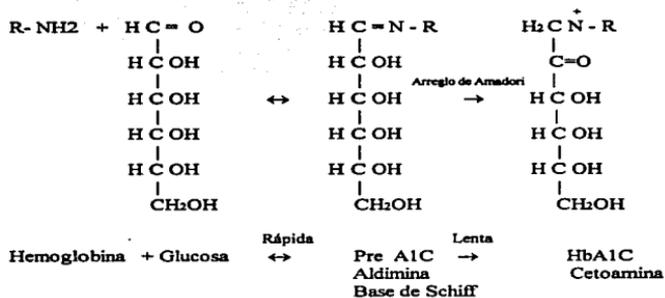
El producto del primer paso es un intermediario conocido por los nombres; base de Schiff, fracción lábil, pre-A1c o Aldimina;<sup>12</sup>

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 mas base de Schiff.<sup>12</sup>

2.- La base de Schiff lentamente se rearrreglará molecularmente para formar una unión irreversible este producto es la hemoglobina glucosilada .<sup>12</sup>

Si las altas concentraciones de glucosa persisten, la doble unión de la almidina, que es sumamente inestable, se arregla a través de una reacción de transposición lenta ( rearreglo de Amadori ) formándose un complejo glucosa - proteína de tipo cetoamina estable que ya no se descompone y que subsiste durante la vida de la proteína y sólo desaparece por degradación.<sup>13</sup>

La primera reacción ocurre in vivo en minutos a horas. La segunda en cambio, en una reacción que ocurre muy lentamente en días a semanas <sup>13</sup>



**Fig. 6 Adición de la glucosa a la hemoglobina, para formar la base de Schiff y mediante el rearreglo de Amadori formar la hemoglobina glucosilada.**

### 3.1.-Formación de HbA1 en eritrocitos.

Se ha mencionado hasta el momento la importancia clínica de la hemoglobina glucosilada en el diagnóstico y control de los pacientes diabéticos, pero es también importante mencionar algunos aspectos de su origen y síntesis así como los principales variantes encontrados en esta glucoproteína.

En 1955 Kunkel y Walenius separaron la hemoglobina humana en tres fracciones y de acuerdo a su velocidad de migración en un plato electroforético denominaron a la 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 observo 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.

La hemoglobina glucosilada fue observada por primera vez por Allen y Cols en 1958 <sup>10</sup>. Cuando buscaban los componentes heterogéneos de la oxihemoglobina por Cromatografía . 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 : 4. <sup>10</sup> Sin embargo se conoce que la fracción HbA1a, se puede separar a la vez en subfracciones como la HbA1a1 y la HbA1a2 .

Otros científicos han descubierto fracciones adicionales de la hemoglobina A y nombraron a estas fracciones ; HbA1d y HbA1e de las cuales se desconoce los sitios en los cuales se una el azúcar para formar hemoglobina glucosilada.<sup>12</sup>

Es importante señalar que los carbohidratos que se unen a la hemoglobina son la fructosa 1,6 - difosfato, la glucosa 6 - fosfato y la glucosa, aunque en términos generales se hable de glucosa.<sup>13</sup>

La hemoglobina A puede glucosilarse en diferentes sitios (Fig.7); la hemoglobina A se compone de cuatro cadenas de globinas, dos de las cadenas se conocen como cadenas alfa y las otras dos como cadenas beta, los azúcares se pueden unir a cualquiera de las cadenas de globinas en diferentes sitios principalmente en los grupos N terminales de las cadenas alfa y beta o en residuos de lisina en una de las cadenas .

En forma general la Hb esta unida a glucosa en la valina NH2 terminal de las cadenas beta de manera predominante.

Subunidad de hemoglobina	Estructura de la subunidad	Residuo de Carbohidrato	Contenido de la Subunidad
Hb A0	Alfa 2 Beta 2	-----	> 90%
Hb A2	Alfa 2 Delta2	-----	< 1.5 %
Hb F	Alfa 2 Gamma 2	-----	< 0.8 %
A1a1	Alfa ( Beta-F-D-P)2	Fructosa 1,6 Difosfato	< 1.0 %
A1a 2	Alfa ( Beta-G-6-P)2	Glucosa 6 fosfato	< 1.0 %
Hb	A1b	?	< 1.0 %
A1c	Alfa 2 (Beta-G )2	Glucosa	4 - 6 %
A1d	?	?	trazas
A1e	?	?	trazas

Fig.7 Tabla de los diferentes sitios de unión de la hemoglobina a los azúcares.<sup>17</sup>

De un corrimiento en gel de Agarosa de un procedimiento de electroforesis podemos observar las siguientes bandas al correspondientes a una muestra de sangre hemolizada de un paciente sano o normal al querer observar los componentes principales de la hemoglobina 23:

FRACCION	%
Ao	90.00
A2	2.00
F	< 1.00
A1c	4.00
A1b	1.00
A1a2	< 1.00
A1a1	< 1.00

Se refiere como GHb a la serie de componentes menores de la hemoglobina HbA0 que se han unido a diferentes azúcares y son conocidas colectivamente como HbA1 o hemoglobina rápida.2

Sus componentes principales por tanto son:

- HbA1a
- Hb A1b
- HbA1c

Y el componente más importante de la HbA1 con respecto al manejo de la diabetes es el HbA1c en el que el azúcar de la glucosa se adhiere. Los resultados de la GHb se reportan como porcentajes de la hemoglobina total.2

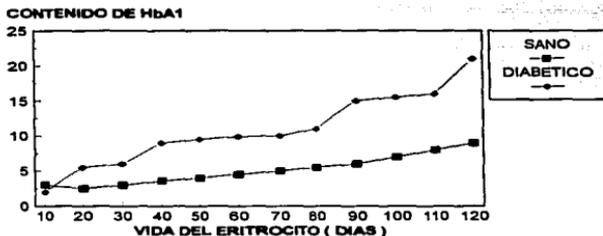
### **3.2.-Importancia Clínica de la hemoglobina glucosilada.**

En 1968 Rahabar observó por primera vez que la hemoglobina glucosilada (GHb) en pacientes con diabetes mellitus e individuos sanos difería en concentración, advirtió que la concentración o valor de esta fracción proteica (Ac1) se encuentra elevada de dos a tres veces en individuos diabéticos con respecto a los valores de los individuos sanos (Fig. 7). Esta fracción se clasificó posteriormente como una glicoproteína formada por la reacción entre la glucosa y la hemoglobina ( HbA).<sup>2</sup>

En individuos normales el 90% de la hemoglobina es HbA<sub>0</sub>, de la cual del 4 al 8 % sufre modificaciones traslacionales en su estructura, al unirse a algunos carbohidratos. A este complejo se la conoce como hemoglobina glucosilada y se cuantifica en el laboratorio como porcentaje de la hemoglobina glucosilada (%GHb)<sup>2</sup>

La glucosilación 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, puesto que esta reacción es no enzimática e irreversible, la concentración de hemoglobina glucosilada ( GHb ) 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 glucosilada (GHb) 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 de ese preciso momento.<sup>2,4</sup> (Fig. 8).

El porcentaje de hemoglobina glucosilada 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 glucosilarse y formar entonces variantes propias de hemoglobina glucosilada. 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 HbA<sub>0</sub>. Este es uno de los aspectos más importantes en la cuantificación de la hemoglobina glucosilada.<sup>11</sup>

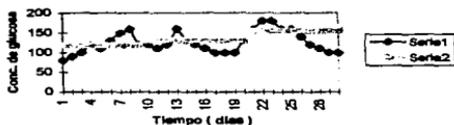


**Fig. 8 Formación de HbA1 con respecto al tiempo de vida de eritrocitos sanos y eritrocitos de pacientes diabéticos.**

La cantidad de hemoglobina glucosilada ( GHb ) que se formará en las células rojas de la sangre es directamente relacionada con la concentración de glucosa y su formación no es afectada por pequeños incrementos o decrementos en la concentración de glucosa en sangre.<sup>2,8</sup>

El porcentaje de hemoglobina glucosilada ( %GHb ) en la sangre de un paciente refleja la concentración promedio a largo tiempo de glucosa en sangre. ( 2 a 3 meses ). Esta prueba es una medida global en el control diabético, 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.<sup>2</sup> (Fig. 9).

**%GHb vs Conc. de Glucosa plasmática**



Serie 1 Concentración plasmática de glucosa  
Serie 2 GHb con respecto al tiempo.

**Fig. 9 Tabla comparativa de la conducta de la concentración de glucosa plasmática vs %GHb a lo largo del tiempo.**

Las prueba de hemoglobina glucosilada cuantifica la cantidad de hemoglobina que tiene adherida azúcar, ofrece un objetivo índice retrospectivo del nivel promedio de glucosa en sangre en los meses precedentes (1 a 3). Sin embargo esta prueba complementa las pruebas de rutina del control diario hecho en casa por los pacientes diabéticos con pruebas de sangre u orina. La GHb es especialmente valiosa porque los valores de la prueba pueden ser relacionados con promedios específicos de niveles de azúcar en sangre.1

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 medica 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.2

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. s

**Fructosamina:** Genéricamente se denominan así las concentraciones de albúmina y otras proteínas séricas glucosiladas por consiguiente, con la determinación de fructosamina se comprueba la concentración de las proteínas glucosiladas. s

Las albúminas constituyen el componente principal de las proteínas séricas, se glucosilan rápidamente y tienen una vida relativamente corta. Al contrario de la hemoglobina glucosilada que se forma sólo lentamente y que refleja por ello cambios en la glucemia media a largo plazo, la concentración alterada de fructosamina indica más rápidamente una concentración media alterada de glucemia. s

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 glucosilada 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. s

La determinación a corto plazo de la fructosamina es ventajosa cuando es necesario comprobar cambios de la situación metabólica que se producen a corto plazo. s

La relación de los resultados de hemoglobina glucosilada y los niveles promedio de glucosa según la revista Diabetes Care vol 7 No. 6 Nov - Dec 1984 indican que cada cambio de 1% en GHb refleja un cambio en la concentración media de glucosa en sangre de 24 a 35 mg/dl.<sup>15</sup>

Sin embargo David E. Golstein en su artículo Measurement of Glycosylated hemoglobin. High performer Liquid Chromatographic and Thiobarbituric Colorimetric Method indica que un cambio de 1% en la hemoglobina glucosilada significa un cambio en la concentración media de la glucosa en sangre de 30 a 35 mg/dl.<sup>16</sup>

La mejor interpretación gráfica de la relación de %HbA1C y la concentración plasmática de glucosa se encuentra en los trabajos de David E. Goldstein de la Universidad de Missouri Columbia y su relación se expresa en la gráfica utilizada para el manejo de sus pacientes.(Fig.10)

Registro Mensual de Hemoglobina glucosilada (% HbA1c).

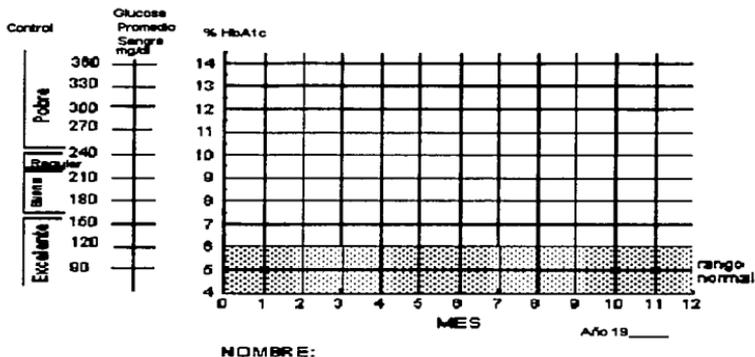


Fig.10 Gráfico del registro utilizado por el Dr. David Goldstein de la Universidad de Missouri en Columbia, para determinar el promedio de glucosa en sangre a partir de un resultado de % de A1c estandarizado.<sup>16</sup>

#### **4.-Métodos de cuantificación**

En 1968 Rahabar observó por primera vez que la hemoglobina glucosilada (GHb) en pacientes con diabetes mellitus e individuos sanos difería en concentración, advirtió que la concentración o valor de esta fracción proteica (Ac1) 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).<sup>2</sup>

Desde ese año la incorporación y uso de metodologías capaces de determinar el % de GHb es cada vez más frecuente y de hecho el ensayo ha pasado a ser una de las pruebas recomendadas por la OMS a ser realizada en pacientes diabéticos por lo menos 2 veces al año.

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

- I Métodos de Afinidad
- II Métodos de Inmuno Ensayo
- III Métodos por Separación de Carga

Todos estos métodos tienen como objetivo cuantificar la hemoglobina glucosilada 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 un método es más útil a un laboratorio o investigador.

#### 4.1.-Métodos por Afinidad

La característica principal de los métodos por Afinidad es que todos los métodos miden todas las hemoglobinas glucosiladas en la muestra, es decir la hemoglobina glucosilada total.<sup>17,18,19</sup>

Todos los métodos de Afinidad miden en global la HbA glucosilada, la HbF glucosilada, la HbS, la HbC glucosilada, la HbE glucosilada y cualquier otra variante de hemoglobina capaz de glucosilarse. Los resultados de estos métodos generalmente se reportan como % de GHb. (Fig. 12)

$$\frac{\text{Todas las hemoglobinas glucosiladas}}{\text{hemoglobina total}} \times 100 = \% \text{ de GHb en la muestra.}$$

Todos los métodos de Afinidad coinciden en ser métodos por Afinidad a Boronatos por esta razón son denominados usualmente como métodos de Afinidad por Boronatos (Fig.9).

Los Boronatos tienen una fuerte afinidad por los azúcares en la hemoglobina glucosilada, por lo que se unen a la hemoglobina glucosilada y todas aquellas hemoglobinas no glucosiladas se retiran mediante lavados. Posteriormente una solución de Sorbitol (azúcar) se adiciona y los Boronatos que tienen una mayor afinidad por el Sorbitol se unen al Sorbitol y liberan a las moléculas de hemoglobina glucosilada 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 glucosilada de la hemoglobina total.<sup>17,18,19</sup> (Fig. 11).

Reactivo polianiónico de afinidad

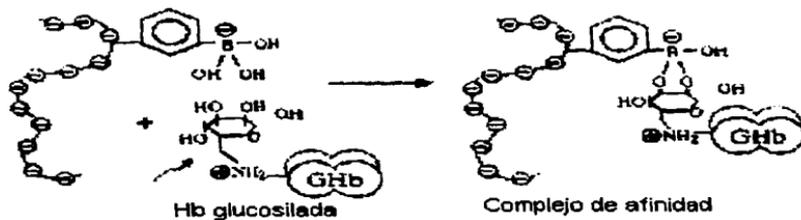
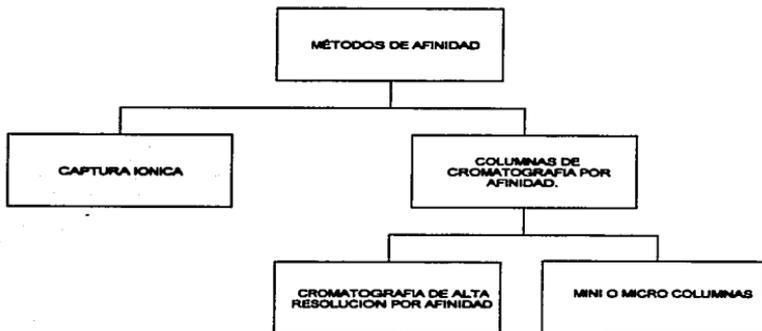


Fig.11 Reacción de afinidad entre la glucosa y un reactivo polianiónico de boro.<sup>2a</sup>

Los métodos de Afinidad se pueden agrupar de la siguiente manera :



**Fig.12** Clasificación de los métodos de cuantificación de la hemoglobina glucosilada por medio del principio de afinidad.

#### **4.1.1.-Cromatografía de Columnas de Afinidad**

##### **Principio**

Los Boronatos empacados y unidos a una resina de celulosa insoluble en este tipo de columna, tienen una fuerte afinidad por los azúcares en la hemoglobina glucosilada por lo que al depositarse una muestra de hemolisado en la columna los boronatos se unen a la hemoglobina glucosilada de la muestra y todas aquellas hemoglobinas no glucosiladas se retiran mediante lavados. Posteriormente una solución de Sorbitol ( azúcar ) por la que los boronatos tienen mayor afinidad, se adiciona y la hemoglobina glucosilada 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 glucosilada de la hemoglobina total de la muestra.<sup>17,18,19</sup>

El hemolisado se añade o inyecta a la columna empacada de resina de Boronatos y todas las hemoglobinas no glucosiladas pasan a través de la columna sin ser retenidas por la resina y son colectadas ( fracción no glucosilada ), mientras que todas las hemoglobinas glucosiladas se unen a los Boronatos presentes en la columna, luego se añade o inyecta una solución de Sorbitol, lo que provoca que se liberen las hemoglobinas glucosiladas presentes en la columna y el sorbitol se fije a los Boronatos de la columna. Las hemoglobinas glucosiladas eluyen a través de la columna y se colectan, esta es la fracción glucosilada de la muestra.<sup>17,18,19</sup>

La Cromatografía de Columnas de Afinidad reúne dos grupos de métodos similares:

- a) la Cromatografía líquida de alta resolución por columnas de Afinidad
- b) las mini o micro columnas de afinidad.

Los dos grupos miden la hemoglobina total y la reportan como % de GHb.

**Ventajas:**

Sus resultados no se ven afectados por la presencia de variantes de la hemoglobina.

No son sensibles a cambios de temperatura ni pH.

No sufren interferencia por parte de la fracción lábil o base de Schiff

17,18,19

**Desventajas:**

La muestra debe ser lisada antes de procesarse

Precisan de un intenso manejo y cuidado en el proceso.

17,18,19

#### **4.1.1.1.-Mini o Microcolumnas de Afinidad**

##### **Principio**

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 glucosilada, por lo que al depositarse una muestra de hemolisado en la columna los boronatos se unen a la hemoglobina glucosilada de la muestra y todas aquellas hemoglobinas no glucosiladas se retiran mediante lavados de un buffer. Posteriormente una solución de Sorbitol ( azúcar ) por la que los boronatos tienen mayor afinidad, se adiciona y la hemoglobina glucosilada 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 glucosilada de la hemoglobina total de la muestra.<sup>17,18,19</sup>

##### **Procedimiento**

El hemolisado se añade a la columna empacada con una resina de Boronatos, todas las hemoglobinas no glucosiladas pasan a través de la columna sin ser retenidas por no contener una azúcar unida a su molécula ( fracción no glucosilada ). Toda la hemoglobina glucosilada con cualquier azúcar se une a la resina de Boronatos de la columna, a continuación se añade una solución de Sorbitol por el que la resina tiene una mayor afinidad , lo que provoca que se liberen todas las hemoglobinas glucosiladas que se habían retenido en la columna eluyendo en su totalidad para ser colectada y reconocerse como la fracción glucosilada de la muestra.<sup>17,18,19</sup>

Se utiliza cualquier espectrofotómetro para realizar la lectura de absorbancia tanto de la fracción no glucosilada como de la fracción glucosilada a una longitud de onda de 415 nm para realizar el cálculo del % de hemoglobina glucosilada de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Absorbancia de la fracción glucosilada}}{\text{Absorbancia de la fracción glucosilada} + \text{absorbancia de la fracción no glucosilada}} \times 100 = \% \text{GHb}$$

Absorbancia de la fracción glucosilada + absorbancia de la fracción no glucosilada

### **Ventajas**

No reciben interferencia de hemoglobinas anormales o variantes de hemoglobina.

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. 17,18,19

### **Desventajas**

Altamente manuales.

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 GHb solamente y típicamente no se convierte a % de A1c estandarizado según el método de referencia.

Experiencia técnica requerida para procesar muestras.

Cálculos manuales y falta de reporte impreso.

17,18,19

#### **4.1.1.2.-Cromatografía Líquida de Alta Resolución por columnas de Afinidad**

##### **Principio**

Como todos los métodos de afinidad es también un método basado en la afinidad de los grupos Boronatos por los azúcares presentes en la muestra a analizar, como todos los métodos de afinidad mide todos los azúcares presentes en la muestra y sus resultados se expresan como %GHb.<sup>32</sup>

Existe la referencia de un fabricante de este tipo de metodología ( Primus ), quien ha desarrollado un método de columna de Cromatografía de Alta Resolución por afinidad. La columna desarrollada por Primus es una columna empacada de grupos Boronatos.

El sistema utilizado en este método es similar al utilizado en la Cromatografía Líquida de Alta resolución de Intercambio Iónico con excepción de que el método de intercambio Iónico es capaz de separar en fracciones a los componente de la GHb y el método de afinidad sólo cuantifica la cantidad o porcentaje de GHb.

La Cromatografía Líquida de Alta resolución es una metodología Semi-automatizada, esto debido a que la muestra en sí requiere de ser preparada fuera del sistema (hemolisar ), a pesar de existir autocargadores capaces de inyectar cada muestra al sistema aun se requiere de procesamiento manual por parte del operador .<sup>32</sup>

### **Procedimiento**

El sistema utiliza una columna empacada con grupos Boronatos unidos a una resina insoluble de celulosa, la cual es reutilizable después de lavarse por cada muestra corrida en el sistema, esta columna se utiliza para separar las hemoglobinas No glucosiladas de las hemoglobinas glucosiladas presentes en la muestra. La resina como fase sólida del sistema tiene la capacidad de retener a las hemoglobinas glucosiladas de las muestras debido a la fuerte afinidad de los grupos Boronatos por los azúcares presentes en la muestra y no retiene al resto de las hemoglobinas, las cuales eluyen en un tiempo determinado, posteriormente, el sistema inyecta a la columna una solución de Sorbitol por lo que la resina empacada en la columna tiene mayor afinidad y la o las hemoglobinas glucosiladas eluyen a través de la columna en un tiempo determinado, el tiempo de retención y las mediciones de espectrofotométricas de absorbancia determinan la relación porcentual entre las hemoglobinas glucosiladas y las no glucosiladas. Esta relación es expresada por el sistema como % GHb. 32

### **Ventajas**

No sufre interferencia de variantes de la hemoglobina.  
No interfieren cambios de temperatura o pH.  
No existe interferencia de la fracción lábil. 32

### **Desventajas**

Los resultados sólo pueden ser reportados en %GHb.  
Existen pocos sistemas disponibles en el mercado con esta metodología.  
Es un sistema dedicado únicamente para la medición de hemoglobina glucosilada. 32

#### 4.1.2.-Captura iónica

##### Principio

El método de captura iónica permite determinar el % de GHB directamente de Sangre completa con anticoagulante dentro del sistema IMx de Abbott Laboratories, este ensayo se lleva a cabo poniendo en contacto a la hemoglobina glucosilada con una solución de reactivo polianiónico de afinidad ( Ácido meta amino benzeno borónico unido a poliacrílico ácido ) y luego capturando el complejo aniónico formado con una matriz catiónica sólida precubierta con sales cuaternarias de alto peso molecular. Las hemoglobinas glucosiladas son cuantificadas al determinar la disminución de la fluorescencia del grupo hemo al que se le ha añadido un fluoróforo y comparando esta fluorescencia con la de la hemoglobina total.<sup>20,21</sup>

La especificidad de este método se encuentra en la afinidad del dihidroxiboronato por los sitios Cis - Diol de la Glucosa unida a las hemoglobinas.

La hemoglobina glucosilada y la hemoglobina total son cuantificadas al determinar por disminución de la fluorescencia del grupo hemo al adicionarle 4 metil umbeliferil fosfato y comparar las dos lecturas e interpretar de ahí el % que representa la hemoglobina glucosilada de la total.<sup>20,21</sup>

El método de captura iónica cuantifica el total de hemoglobinas glucosiladas, es decir cualquier hemoglobina que haya sido glucosilada, utilizando un método de afinidad de boronatos. Este método presenta una relación lineal con la metodología de Cromatografía de Alta resolución por Intercambio Iónico en sus resultados de % de GHB ( r = 97 ), lo que permite la conversión de estos resultados estandarizados de % A1c en base de la ecuación :

$$\%HbA1c \text{ Estandarizado} = \% Ghb + 1.76 / 1.49$$

### Procedimiento

Este es un ensayo por afinidad de ácido borónico que mide el porcentaje de glicohemoglobina (%GHb), este ensayo ha sido estandarizado para reportar igualmente el % de HbA1c. Se basa en la formación de un complejo específico entre la hemoglobina y un reactivo polianiónico de afinidad compuesto de ácido 3 aminofenilborónico.

Sí bien los métodos de enlace por afinidad detectan la glicohemoglobina total y no sólo la HbA1c ellos guardan un alto grado de correlación lineal con los métodos específicos para la determinación de HbA1c tales como la Cromatografía de Intercambio Iónico, esto hace posible utilizar los métodos de afinidad para informar también los valores de % estandarizado de HbA1c .20,21

El ensayo de Captura Iónica se basa en una técnica de captura de la hemoglobina glucosilada. En este método se utiliza una matriz sólida de fibra de vidrio recubierta de un compuesto amonio cuaternario de elevado peso molecular que confiere a esta matriz una carga eléctrica positiva, responsable de su capacidad de capturar complejos del analito que tengan una carga eléctrica negativa. En el transcurso del ensayo se generan complejos polianiónicos de glicohemoglobina cargados negativamente, dichos complejos son capturados a través de una interacción electrostática con la matriz catiónica .20,21

El ensayo utiliza un reactivo de afinidad soluble compuesto de dihidroxiboronato unido a un ácido poliacrílico de alto peso molecular . Durante el ensayo las moléculas de afinidad se unen específicamente a la glicohemoglobina debido a la interacción de afinidad entre las fracciones dihidroxiboronato y los grupos azúcar de la glucohemoglobina . A continuación la glucohemoglobina es separada de la hemoglobina no glucosilada mediante la interacción electrostática entre el complejo de afinidad reactivo polianiónico-glucohemoglobina y la superficie catiónica de la matriz (fenómeno de captura iónica ). La glucohemoglobina se cuantifica midiendo la extinción (quenching) de la fluorescencia . La capacidad de producir esta extinción es una propiedad natural de la hemoglobina.20,21 (Fig. 13).

### **Ventajas**

No sufre interferencia de variantes de la hemoglobina.  
No interfieren cambios de temperatura o pH.  
No existe interferencia de la fracción lábil.  
No necesita preparación de la muestra de forma externa.  
Totalmente automatizado. 20, 21

### **Desventajas**

Los resultados sólo pueden ser reportados en %GHb y % HbA1c estandarizado.  
Existen un solo sistemas disponible en el mercado con esta metodología IMx.  
No puede realizar muestras de urgencia.  
Los resultados son obtenidos de forma indirecta a partir de la fluorecencia de la hemoglobina y calculo del sistema. 20, 21

Este método no se ve afectado por la presencia de las variantes más comunes de la hemoglobina , ni por la presencia de glucosa, la fracción lábil, trigliceridos ni bilirrubina que pudieran estar presentes en la muestra. 20,21-

Este método esta acompañado por un sistema o equipo de mesa mismo que utiliza la tecnología de CI ( Captura Iónica ), totalmente automatizado, que recibe la muestra de sangre completa y es capaz de entregar el primer resultado dentro de los primeros 10 minutos después de calibrado el instrumento. 20,21



**Fig.13 El complejo de hemoglobina glucosilada y dihidroxiboronato capturada entre la fibra de vidrio utilizada en el ensayo de Captura iónica.<sup>28</sup>**

#### **4.2.-Inmuno Ensayos**

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. 25,26

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, es decir monoclonal una cepa o línea de anticuerpos capaces de reconocer sólo una secuencia de proteínas específicas o molécula. Policlonales dos o más líneas o cepas de anticuerpos que reconocen a grupos de proteínas o grupos de moléculas. 25,26

La representación clásica del reconocimiento de un antígeno o analito por parte de un anticuerpo se ilustra a continuación ( Fig. 14 ).



**Fig.14 Mecanismo de reconocimiento y adición de un anticuerpo a un antígeno.32**

Dentro de los diversos tipos de Inmunoensayo existen diferentes metodologías para la obtención de una respuesta física que nos permita cuantificar o identificar la presencia de un analito en una muestra, tales respuestas pueden ser el desarrollo de color, la aglutinación de partículas, la fluorescencia entre otros.

25.26

Dentro de los inmunoensayos para la determinación de hemoglobina glucosilada existen dos tipos de tecnologías ( Fig. 15 ):

- 1.- Reacción competitiva de inmunoaglutinación.
- 2.- Inmunoensayo Enzimático por Microtitulación.



**Fig.15** Clasificación de los métodos de cuantificación de la hemoglobina glucosilada por medio del principio del inmuno ensayo.

#### **4.2.1.-Inmunoaglutinación en Látex**

##### **Principio**

El inmunoensayo por inmunoaglutinación competitiva disponible es el ensayo DCA 2000 de la marca Miles, es un sistema automatizado para la medición de hemoglobina A<sub>1c</sub> (HbA<sub>1c</sub>). El sistema consiste en un espectrofotómetro precalibrado, reactivos unidosis o pruebas individuales que contienen reactivos líquidos y secos. El reactivo líquido es una solución de tiocianato ( 600 microlitros ) sellados en un contenedor. El reactivo seco o sólido consiste en un aglutinador, partículas de látex cubiertas de anticuerpos y ferrocianuro de potasio ( oxidante ). El instrumento desarrolla todas las funciones de la medición de la prueba a 37°C 25.

##### **Procedimiento**

La metodología se basa en una inhibición de la inmunoaglutinación en látex. La hemoglobina glucosilada de la muestra compete con un aglutinador (Polímero sintético que contienen múltiples copias de la porción inmunoreactiva de la HbA<sub>1c</sub>) por las partículas de látex recubiertas con anticuerpos específicos monoclonales para HbA<sub>1c</sub>; La absorbancia es medida a 531 nanómetros. La medición de la hemoglobina total es también medida en el mismo cartucho por el método de tiocianometahemoglobina en el que el Fe<sup>2+</sup> de la hemoglobina es oxidado a Fe<sup>3+</sup> de la metahemoglobina por ferrocianuro, y la metahemoglobina es convertida a tiocianometahemoglobina por tiocianato.25

##### **Ventajas**

Este método es capaz de medir HbA<sub>1c</sub>.

Sólo necesita de 9 minutos para reporta un resultado.

Todos los reactivos están contenidos en un cartucho unidosis.

Sistema de un sólo paso.

Las variantes HbF, HbS y HbC no causan problemas de desempeño.25

### **Desventajas**

**El método es manual, es una determinación indirecta y lenta con respecto a aquellos métodos que implican automatización.<sup>25</sup>**

#### **4.2.2.-Inmuno ensayo Enzimático para la determinación de Hemoglobina A1c**

##### **Principio**

El ensayo para HbA1c se basa en la microtitulación en un plato de 96 pozos. La muestra de hemoglobina se cubre en el plato como parte de la prueba. El anticuerpo monoclonal utilizado es específico para la cetoamina final y no reconoce a la Aldimina ( pre-HbA1c ) producto precursor en la formación de la hemoglobina glucosilada o a otros sitios glucosilados o a las hemoglobinas no glucosiladas. 26

##### **Procedimiento**

La muestra es adicionada previamente con anticoagulante (EDTA) y lisiada para su proceso. Los eritrocitos se lavan con solución salina isotónica antes del lisado y hasta entonces se realiza el proceso de lisado por medio de agua destilada en un proceso de choque osmótico. La hemoglobina en la muestra es oxidada y el pH ajustado para obtener la unión óptima de hemoglobina en el plato de microtitulación. La hemoglobina no unida es removida por lavados. Un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima (Peroxidasa de rábano picante) se une a la vez a la HbA1c que ha sido inmovilizada en el plato y el conjugado o anticuerpo no unido es removido también por lavados. La enzima peroxidasa de rábano picante es detectada por la reacción del sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y la reacción se detiene con ácido. El color desarrollado es medido y entonces relacionado con porcentajes conocidos de HbA1c de los calibradores y la muestra puede ser entonces relacionada con valores de porcentaje según la lectura obtenida al correr el ensayo y la curva de calibración realizada. 26

**Especificidad:**

El anticuerpo monoclonal no reconoce HbA0 u otra variante de hemoglobina que contenga el grupo terminal N en la cadena beta. El ensayo es libre de interferencia por parte de la pre-HbA1c, HbF, HbC, HbS, lipémia y factores interferentes comúnmente asociados con otros métodos.<sup>26</sup>

El tiempo del ensayo total es de menos de dos horas para 96 determinaciones, excluyendo el proceso de preparación de las muestras.<sup>26</sup>

**Ventajas**

El método es capaz de determinar HbA1c.  
No recibe interferencias de la fracción lábil, HbF, HbS o la HbC  
No recibe interferencias de las muestras lipémicas.<sup>26</sup>

**Desventajas**

El método es manual.<sup>26</sup>

### **4.3.-Métodos de Separación por Carga**

Estos métodos se basan en la capacidad de poder separar una muestra en sus componentes mediante su diferencias de carga eléctrica y luego cuantificar cada una de estas fracciones.23,27,28,29,30,31

Sí 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. 23,27,28,29,30,31 (Fig. 16)

Las hemoglobinas glucosiladas y las hemoglobinas no glucosiladas 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 glucosilada y conocer su porcentaje respecto a la hemoglobina total de la muestra. 23,27,28,29,30,31

Todos los métodos se comparan con esta tecnología por haber sido la primer tecnología en la que se observe por primera vez la hemoglobina glucosilada.

Son métodos de los que se tiene mayor información por haber estado en el mercado mayor tiempo.

Los métodos por separación por carga se pueden agrupar de la siguiente manera:

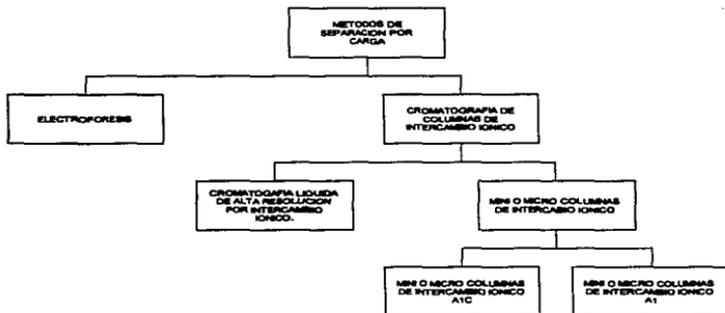


Fig.16 Clasificación de los métodos de cuantificación de la hemoglobina glucosilada por medio del principio de intercambio iónico.

### **4.3.1.-Electroforesis**

#### **Principio**

Este método se basa en que las hemoglobinas cargadas positivamente migran hacia un 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 la hemoglobinas y migran a diferentes distancias en un periodo de tiempo.23,24

#### **Procedimiento**

Un sistema electroforético se compone principalmente de : una fuente de poder o batería, un plato o charola electroforética, la cual en sus extremos se conecta a la fuente de poder de la siguiente manera; uno a el polo positivo de la batería y el otro al polo negativo de la misma, se utiliza también un amortiguador neutro como fase líquida que facilite el paso de corriente y la migración de las partículas cargadas hacia el polo de carga opuesta a ellas y por último un gel neutro que servirá como fase sólida por la cual se desplazará la muestra a la que se pretende separar en sus componentes según la carga de cada uno de ellos. 23,24

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 mas fuerte y migra más rápido que las fracciones de la HbA1, las cuales tienen una carga positiva más débil. 23,24 ( Fig. 17).

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 calculo porcentual de la relación hemoglobinas HbA1 entre la HbA0. 23,24

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, A1d y A1e.

Según el fabricante o ensayo electroforético utilizado se podrá disponer de un resultado porcentual de %HbA1 o % de HbA1c.<sup>23,24</sup>

#### **Ventajas**

Este método es altamente referido en la bibliografía por haberse descubierto la hemoglobina glucosilada en este tipo de sistema.

El método es capaz de separar todos los componentes de la hemoglobina glucosilada.

El método puede identificar cada fracción presente en la muestra y permite realizar un calculo directo del porcentaje de la hemoglobina glucosilada total o la fracción A1c.<sup>23</sup>

#### **Desventajas:**

Una duración anormal de la vida de los glóbulos rojos, como se da en las anemias hemolíticas, la policitemia, la Hb S o la post-esplenectomía, puede afectar a la recuperación de la Hb A1c. Los valores en porcentaje de glucohemoglobina pueden seguir utilizándose para monitorizar a dichos pacientes. No obstante, los valores deben ser comparados con muestras previas del propio paciente y no con valores normales publicados.

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 glucoesa de los glóbulos rojos.

Los geles no conservados en posición horizontal pueden producir modelos electroforéticos atípicos.

Variantes de hemoglobina distintas de la HbF, HbS y HbC pueden presentar picos que interfieran, y necesitan ser interpretados por otros métodos.

La medición de las glucohemoglobinas no ha demostrado ser fiable para el diagnóstico de la diabetes mellitus, pero es un método recomendado para la monitorización del control glucémico.

Niveles de hemoglobina fetal de hasta un 7% no afectan a los resultados del ensayo, porque la HbF se descompone totalmente, la resolución del pico de HbA1c puede verse afectada a niveles superiores al 7% de HbF, a causa del aumento del tamaño del pico de la HbF y puede producir un descenso en el porcentaje aparente de HbA1c.

Si la glucohemoglobina lábil es causa de preocupación, esta puede ser eliminada por incubación a un pH de 5 durante 15 minutos, a 37°C.

La limpieza inadecuada de la cara posterior del gel antes de realizar la lectura densitométrica puede provocar interferencia con la cuantificación del la HbA1c

En algunos casos no puede separar las subfracciones de la HbA1

Es un método sumamente manual, que requiere experiencia y habilidad manual para su desarrollo.

Se puede ver afectado por la presencia de la fracción lábil o por variantes de la hemoglobina.

Es muy sensible a cambios de pH y de temperatura. 23



#### **4.3.2.-Cromatografía de Columnas por Intercambio Iónico**

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 y las partículas con menor fuerza positiva se unen de manera menos fuerte a la resina. Posteriormente se añaden soluciones de fuerzas iónicas cada vez mas fuertes a la columna. Las partículas cuyas uniones con la resina son débiles eluirán de la columna como primera fracción. Las partículas de uniones más fuertes eluirán en fracciones posteriores. Las fracciones que se desean estudiar o cuantificar se separan y su absorbancia es medida. 27,28,29,30,31

La fracción HbA1a1 posee la carga positiva más débil por lo que eluirá de este tipo de columna como primera fracción. La HbA2 y la HbA0 eluirán como última fracción.

Existen dos tipos de métodos de columnas cromatográficas de intercambio iónico:

- 1.- Cromatografía Líquida de Alta resolución de intercambio Catiónico
- 2.- Mini o Micro Columnas de intercambio iónico.

#### **4.3.2.1.-Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) por Intercambio Catiónico**

##### **Principio:**

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 y las partículas con menor fuerza positiva se unen de manera menos fuerte a la resina. Posteriormente se añaden soluciones de fuerzas iónicas cada vez más fuertes a la columna. Las partículas cuyas uniones con la resina son débiles eluirán de la columna como primera fracción. Las partículas de uniones más fuertes eluirán en fracciones posteriores. Las columnas que se desean estudiar o cuantificar se separan y su absorbancia es medida por un instrumento denominado cromatógrafo líquido de alta resolución, mismo que interpreta y realiza gráficos de los resultados o porcentajes de hemoglobina glucosilada y sus fracciones de interés ( HbA1c).<sup>27</sup> ( Fig. 18

##### **Procedimiento**

La fracción HbA1a posee la carga positiva más débil por lo que eluirá de este tipo de columna como primera fracción seguida de la fracción HbA1b y HbA1c. La HbA2 y la HbA0 eluirán como última fracción.

La determinación de la GHb 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.<sup>27</sup>

Todas las operaciones del sistema son controladas por un Microprocesador y un integrador recopila y reduce los datos de la muestra y alimenta la información a un impresor o monitor los cuales producen un reporte donde se resumen los resultados de : % de HbA1c, % HbA1 ( a + b + c ), así como los porcentajes relativos por área bajo la curva de todas las subfracciones de la hemoglobina que hayan sido separadas.<sup>27</sup>

La eliminación de la base de Schiff o fracción lábil (Fig. 6) se logra cuando la muestra se incuba en un reactivo de hemólisis que contiene boronatos . El boronato se une a los grupos diol de la glucosa promoviendo la disociación de los componentes lábiles . Esta reacción se lleva a cabo en una incubación de 30 minutos a una temperatura de 37 ° C.<sup>27</sup>

Las muestras hemolizadas se deben mantener a 10 °C +/- 2 °C de forma constante en un baño o incubador o en el autocargador si el sistema dispone de uno, antes de ser inyectadas en el cromatógrafo. La detección se desarrolla en 2 longitudes de onda , 415 nm y 690 nm para asegurar una línea de base estable.<sup>27</sup>

La Cromatografía Líquida de Alta resolución es también conocida como HPLC por ser estas las siglas de su nombre en el idioma inglés, en la modalidad de intercambio Iónico, se ha desarrollado un método para la cuantificación o determinación de la GHb y tiene como principal característica el poder cuantificar %HbA1c, %HbA1 y el % A1c estandarizado (siempre que el sistema este estandarizado).<sup>27</sup>

Como en la mayoría de las técnicas desarrolladas hasta el momento la muestra deberá prepararse manualmente y esta es una muestra de sangre la que habrá de hemolizarse además de incubarse a 37 °C por un periodo de por lo menos 30 minutos en baño de agua.

### **Ventajas**

Es capaz de medir o determinar el % A1c.

Es posible determina valores estandarizados de % A1c.

Es una metodología Semi automatizada.

Las variantes anormales de la hemoglobina no afectan el resultado

(si la HbF es menor de 5 % no afecta el resultado).

Excelente precisión con coeficientes de variación en el rango del 3%.<sup>27</sup>

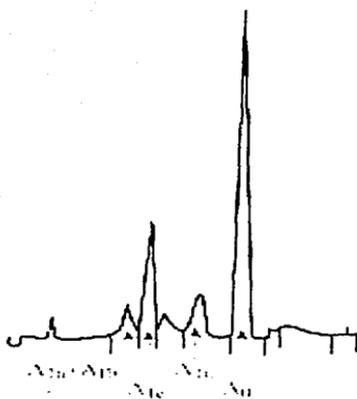
### **Desventajas**

La fracción lábil produce interferencias, si las muestras no son previamente tratadas.

Los sistemas pueden realizar una determinación de 4 a 8 minutos por muestra pero en tiempo necesario para equilibrar el sistema entre muestra y muestra puede llevar a 7 hrs para completar una corrida de 48 muestras.

Es necesaria experiencia técnica para interpretar resultados, dar mantenimiento al sistema y manejarlo adecuadamente.

Este sistema es un equipo dedicado que no podrá ser utilizado en otro tipo de ensayo. 27



HPLC: sujeto normal

**Fig.18** Cromatograma de una muestra de un sujeto normal para la separación y cuantificación de la hemoglobina glucosilada según la fracción A1c.27

#### **4.3.2.2.- Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico**

Los métodos por mini o microcolumnas de intercambio iónico se pueden subclasificar según su capacidad de poder o no cuantificar la fracción HbA1c de la hemoglobina glucosilada. 28,29,30,31

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. Las mini o micro columnas por intercambio iónico se clasifican en:

- 1.- Métodos que determinan HbA1
- 2.- Métodos que determinan HbA1c

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 boratos y fosfatos fuerza iónica baja a través de la columna. Este buffer hace eluir la base de Schiff, interferencias ictericas o lipémicas y las fracciones HbA1b y HbA1a . La HbA1c y la HbA0 se mantienen capturados 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. 28,29,30,31

Las mini o micro columnas por intercambio iónico 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 glucohemoglobina o fracción rápida de la hemoglobina total o fracción no glucosilada. 28,29,30,31

#### **4.3.2.1.-Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico para HbA1**

##### **Principio**

Las pruebas para la determinación de hemoglobina glucosilada para esta metodología requieren de la determinación de dos analitos (hemoglobina total y hemoglobina glucosilada), además de el subsecuente calculo del porcentaje de la hemoglobina glucosilada la muestra debe ser preparada fuera del sistema (lisada) para luego ser agregada al dispositivo en el cual se retendrán por intercambio catiónico las hemoglobinas no glucosiladas. 29,30,31

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 y las partículas con menor fuerza positiva se unen de manera menos fuerte a la resina. Posteriormente se añaden soluciones de fuerzas iónicas cada vez más fuertes a la columna. Las partículas cuyas uniones con la resina son débiles se separarán de la columna como fracción a determinar. 29,30,31

##### **Procedimiento**

Una alcuota de sangre bien mezclada se introduce en un tubo prellenado de resina el cual contiene tanto buffer como agente lisante para hemoglobina glucosilada y una resina catiónica de intercambio. Esta mezcla dentro del tubo se invierte de posición por rotación por cinco minutos dentro de los cuales la hemoglobina no glucosilada se adhiere a la resina. Un separador de plasma se coloca en la parte superior de tubo de resina y es entonces centrifugado por cinco minutos la absorbancia del sobrenadante es leída a 415 nm. En un espectrofotómetro. El porcentaje de hemoglobina rápida es calculado de esta lectura y es expresado como un porcentaje de la hemoglobina total la cual se determina independientemente. 29,30,31

### **Ventajas**

Son de bajo costo.

Son de fácil uso.

No requieren de un equipamiento costoso.

El primer resultado se obtiene en 12 minutos. 29,30,31

### **Desventajas**

Este método es totalmente manual.

Requiere de pretratamiento de la muestra.

Es dependiente de la temperatura a la que se lleva a cabo. 29,30,31

#### **4.3.2.2.-Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico para HbA1c**

##### **Principio**

Las pruebas para la determinación de hemoglobina glucosilada para esta metodología requieren de la determinación de dos analitos (hemoglobina total y hemoglobina glucosilada), además de el subsecuente calculo del porcentaje de la hemoglobina glucosilada la muestra debe ser preparada fuera del sistema (lisada) para luego ser agregada al dispositivo en el cual se retendrán por intercambio catiónico las hemoglobinas no glucosiladas.<sup>28</sup>

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 empacada y las partículas con menor fuerza positiva se unen de manera menos fuerte a la resina. Posteriormente se añaden soluciones de fuerzas iónicas cada vez mas fuertes a la columna. Las partículas cuyas uniones con la resina son débiles se separarán de la columna como fracción a determinar. <sup>28</sup>

##### **Procedimiento**

Una alícuota de sangre se mezcla con un reactivo hemolisante mismo que simultáneamente lisa las células rojas para liberar la hemoglobina e iniciar la remoción de la fracción lábil o Aldimina . Una alícuota del hemolisado se aplica en un dispositivo de columna de intercambio catiónico débilmente acidificada . Un buffer de boronatos y fosfatos de fuerza iónica baja es entonces pasado a través de la columna este primer buffer eluye las fracciones HbA1a y la HbA1b, remueve también las interferencias lipémicas e ictericas así como las disociaciones de la base de Schiff o fracción lábil . Las fracciones HbA1c y la HbA0 permanecen dentro de la columna . La HbA1c es entonces eluida independientemente a través de la adición de un segundo buffer o reactivo el cual tiene una mayor fuerza iónica.

La HbA0 y las hemoglobinas S y C de estar presentes se mantienen dentro de la columna . <sup>28</sup>

Mientras las fracciones de la hemoglobina están siendo separadas un tubo de hemoglobina total es preparado mezclando una alícuota de hemolisado con el segundo buffer o reactivo de elución.

Después de colectar el eluato que contiene la HbA1c se calcula la concentración específica de HbA1c en base a la lectura espectrofotométrica de los dos tubos la cual se lleva a cabo a 415 nm. 28

### **Ventajas**

No sufre interferencia por parte de la fracción lábil pues se elimina, mediante el reactivo de hemolisis.

No necesita de instrumentación especial para realizarse.

El método es relativamente de bajo costo.

El tiempo del ensayo es bajo comparado con otras metodologías (HPLC).

Es capaz de determinar la fracción HbA1c . 28

### **Desventajas**

La presencia de variantes de hemoglobina pueden causar resultados falsos.

Es sensible a la temperatura.

Es sensible al pH.

Es altamente manual . 28

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## 5.-Discusión

Los diferentes tipos de variantes y derivados de la hemoglobina son un factor de evaluación de los métodos o principios de ensayo de la determinación de hemoglobina glucosilada. Al observarse cuanto se ven afectados ante la presencia de este tipo de variantes, seguramente se podrá también concluir acerca de la sensibilidad y especificidad de estos ensayos.

Todas estas variantes son factores que pueden interferir en la interpretación o resultado de una muestra, esto debido principalmente a la diversidad de estructuras físicas y componentes químicos de cada variante y de la forma en que estas variaciones afecten a cada método.

La hemoglobina (Hb) tiene variantes estructurales las cuales contienen cambios genéticamente determinados en las estructuras primarias de las cadenas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ), dentro de los más comunes están la HbA<sub>0</sub> ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbF<sub>0</sub> ( $\alpha_2\gamma_2$ ) y la HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) hemoglobinas normales y las hemoglobinas HbS, HbC y HbE que contienen mutaciones en la cadena beta, hemoglobinas no normales. Estas variaciones son precisamente las que confieren diferentes cargas totales a la molécula y las responsables que este tipo de muestras se interpreten de manera diferente a las muestras que contienen hemoglobina sin variantes.º

Existen también variantes de la síntesis de la Hemoglobina, que se originan debido a cambios genéticamente determinados en la capacidad de sintetizar las cadenas de la hemoglobina. Se pueden entonces presentar defectos genéticos como la  $\beta$  Talasemia y la HbF hereditaria persistente (HPHF) ambas causadas por producción impar de cadenas beta y son capaces de afectar la certeza o sensibilidad de los métodos para la determinación de la hemoglobina glucosilada.º

Por otra parte existen derivados de la hemoglobina que resultan de modificaciones postranslacionales de su molécula ejemplos de esto son los que resultan de reacciones con la glucosa ( glucohemoglobina, su precursor la base de Schiff ), la urea ( hemoglobina carbamylada ), con la acetil co enzima A o el ácido acetil salicílico ( hemoglobina acetilada ) y finalmente los cambios causados con el almacenamiento. 11

La literatura refiere el desempeño de las metodologías y los resultados de ensayos de hemoglobina glucosilada por diferentes técnicas, así como también acerca de su interpretación y de como son afectadas de forma diferente por las variantes y los derivados de la hemoglobina. Este tipo de variantes y derivados pueden causar interferencia analítica por reducir el tiempo de vida media de los eritrocitos y con ello el tiempo de exposición de la hemoglobina a la glucosa circulante, causando con ello falsos bajos porcentajes de glucohemoglobina además de afectar la determinación según su modificación estructural con base a el principio en el que se desarrolle la técnica del ensayo. Estas condiciones pueden llevar a interpretaciones erróneas, cuando se realizan comparaciones con datos obtenidos de controles en los que no existan este tipo de variaciones o derivados. 11

Otras interferencias que pueden afectar la precisión y exactitud de un ensayo para determinar hemoglobina glucosilada son: temperatura, pH, presencia de altas concentraciones de triglicéridos o altas concentraciones de bilirrubina.

Por lo tanto un método o ensayo para la determinación de hemoglobina glucosilada es más confiable entre menos se vea afectado ante este tipo de interferencias.

Uno de los objetivos de este trabajo es realizar la comparación técnica y práctica de los diferentes métodos existentes para la determinación de hemoglobina Glucosilada ( GHb ). Esto es más importante cuando se puede diferenciar cual o cuales de los métodos sufren menor grado de interferencia de cualquiera de los factores inherentes a la muestra.

Existen tres principios de determinación de la hemoglobina glucosilada y en cada uno de ellos existen también diferentes métodos cuyas características dependen de su manufactura, material a utilizarse y grado de automatización.

Los tres principios por los que se puede cuantificar la hemoglobina glucosilada son:

- 1.- Métodos por Afinidad.
- 2.- Métodos por Intercambio Iónico.
- 3.- Métodos por Inmunoensayo.

La discusión sobre cual o cuales métodos son más útiles para un laboratorio tiene origen al obtenerse diferentes datos de las referencias citadas hasta este capítulo.

En un estudio publicado en 1993 por la revista Clinical Chemistry y realizado en Holanda sobre un programa de control de calidad externo en el que intervinieron 102 laboratorios que utilizaron 16 métodos diferentes para la determinación de hemoglobina glucosilada con sus propios rangos de referencia se obtuvieron las siguientes conclusiones cuando se analizaron muestras de hemoglobina con variantes estructurales ( HbS, HbC, HbE), variantes de productos de la síntesis de hemoglobina ( Hb beta Talasemica, HPHF ) y derivados de la hemoglobina, ( hemoglobina carbamylada, hemoglobina acetilada, la base de Schiff y aquellos presentes en la sangre almacenada).<sup>11</sup>

### **5.1.-Métodos por Afinidad**

Dentro de este grupo de métodos se encuentran: Los métodos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución por Afinidad, Las Mini o Micro Columnas por Afinidad y el método por Captura Iónica por Afinidad a Boronatos.

Ninguno de estos métodos reportan en la literatura comercial interferencias con muestras en las que se encuentren presentes variantes de la hemoglobina, tales como HbS, HbC o HbF.

Sin embargo si se reportan posibles interferencias en la interpretación de los resultados ante cambios de temperatura o mala conservación de las muestras.<sup>18,19</sup>

Los métodos de este grupo en el trabajo realizado por Weykamp et al, reporta resultados semejantes frente a las diferentes variantes de la hemoglobina y un control de un paciente sano:

#### **Control (sujeto sano HbA homocigotico)**

De un control de un sujeto sano con HbAA homocigotica la mayoría de los laboratorios reportan valores dentro de los rangos de normalidad. Y la mayoría de los insertos comerciales refieren correlaciones a un método standard superiores al 98%. Todas las metodologías refieren poder cuantificar los valores de los rangos normales y patológicos más comunes.<sup>11</sup>

Con excepción de las hemoglobinas S y la C homocigoticas para las que se observan resultados altamente variables los métodos por afinidad de los diferentes fabricantes mostraron conductas similares. <sup>11</sup>

El método no se ve afectado por alguna de las variantes de la hemoglobinas o derivados que se hayan estudiado. Los bajos porcentajes en pacientes con HbS (homocigotica) y algún otro bajo porcentaje en sujetos con HbC (homocigotica) requieren previo conocimiento de estas situaciones y el uso de rangos especiales para la correcta interpretación. <sup>11</sup>

De manera particular con las principales variantes de la hemoglobina se observa:

**HbS homocigotica**

De las muestras homocigoticas de HbS ; los laboratorios participantes con Cromatografía de Afinidad reportan valores de hemoglobina glucosilada bajos pero sin dispersión. 11

**HbC homocigotica**

Con los métodos de Cromatografía de Afinidad los porcentajes de glucohemoglobina son altos y variables con respecto al valor de los obtenidos de sujeto HbA utilizado como Control. 11

**HbE homocigotica**

Para los métodos de Cromatografía de afinidad se observan valores de porcentajes consistentemente altos. 11

**HbS heterocigotica**

Los resultados por Cromatografía de Afinidad están dentro del rango de normalidad. 11

**HbF hereditaria persistente**

Los métodos por Cromatografía de afinidad reportan resultados dentro del rango de referencia pero con valores bajos. 11

**Derivados de hemoglobina**

No se encuentra diferencias de porcentajes en las muestras preparadas artificialmente de hemoglobinas carbamilada y acetilada. 11

**Sangre Almacenada**

Ningún método por afinidad muestra diferencias substanciales y están dentro de los rangos de referencia. 11

### **Base de Schiff**

Para la Cromatografía de afinidad las muestras con alto porcentaje de contenido de base de Schiff causaron resultados por debajo de aquellos establecidos para la muestra control. 11

## **5.2-Métodos por Intercambio Iónico**

Los métodos por Intercambio Iónico se separan en sus tres principales metodologías:

- 1.- Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Intercambio Iónico.
- 2.- Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico.
- 3.- Electroforesis.

### **5.2.1.-Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Intercambio Iónico.**

La mayoría de la literatura reporta la utilidad de estos métodos en la interpretación de la hemoglobina glucosilada, sin embargo refieren la necesidad de utilizar estándares especiales para la interpretación de resultados. No se hace mención en la literatura de las posibles interferencias de las variaciones de la hemoglobina .10,27

La mayoría de los métodos HPLC de Intercambio Iónico reconocen las hemoglobinas anormales. La HPLC no demostró ser útil en la determinación de HbA1c en sujetos con HbSS y HbCC (homocigóticos), por lo que la medición de HbS1c y HbC1c se utiliza como solución pero se deberá interpretar con rangos especiales cada resultado. Para aquellos sujetos con hemoglobinopatías heterocigóticas y variantes en la síntesis de hemoglobinas el método deberá satisfacer tres condiciones para poder ser utilizado 27:

- 1.- La variante deberá ser reconocida.
- 2.- La HbA1c , HbA0 y las variantes deberán ser separadas total y claramente.
- 3.- La HbA1c deberá ser reportada en porcentaje de la hemoglobina total.

Los métodos de este grupo en el trabajo realizado por Weykamp et al, reportan resultados semejantes frente a las diferentes variantes de la hemoglobina y un control de un paciente sano 11:

### **Control ( sujeto sano HbA homocigotico )**

De un control de un sujeto sano con HbA homocigotica la mayoría de los laboratorios reportan valores dentro de los rangos de normalidad. Y la mayoría de los insertos comerciales refieren linealidades superiores al 98%. Todas las metodologías refieren poder cuantificar los valores de los rangos normales y patológicos más comunes. 11

### **HbC homocigótica**

En aquellos usuarios que utilizaron Cromatografía Líquida de Alta Resolución se observan resultados de detección de Glucohemoglobina "no medibles", los usuarios de columnas desechables de intercambio iónico reportaron bajos valores del porcentajes. 11

### **HbE homocigotica**

Los resultados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución por Intercambio Iónico son altamente dispersos desde "no medibles" hasta muy elevados. 11

### **HbS heterocigota**

La HPLC por Intercambio Iónico arroja resultados variables que son desde no detectables hasta valores dentro del rango de normalidad. 11

### **HbF hereditaria persistente**

Los resultados para HPLC por Intercambio Iónico mostraron valores desde "no medibles", hasta valores dentro del rango de referencia y un valor muy alto. 11

### **Derivados de hemoglobina**

Los ensayos de HPLC de Intercambio Iónico muestran resultados altos .

Debe señalarse que derivados tales como la Hb Carbamilada y la Acetilada presentan problemas debido a que eluyen con la HbA1c y se presentan resultados falsamente elevados. En particular la Hb Carbamilada presenta problemas pues no es posible distinguirla en el cromatograma y su presencia en pacientes nefróticos es común amén de ser esta condición propia de los pacientes diabéticos. 11

### **Sangre Almacenada**

Ningún método muestra diferencias substanciales y están dentro de los rangos de referencia, pero dentro de los resultados de HPLC por Intercambio Iónico se encontró un pico alto para la fracción HbA1b. 11

### **Base de Schiff**

los resultados para HPLC por Intercambio Iónico están entre los rangos de referencia hasta incrementarse con respecto a los valores asignados al control. 11

### **5.2.2.-Columnas Desechables de Intercambio Iónico**

Los resultados de la medición de HbA1c con columnas desechables de Intercambio Iónico son altamente comparables con los resultados que se observan con HPLC de este mismo principio; El método no reconoce hemoglobinas anormales y en este caso no es posible realizar correcciones para hemoglobinopatías y derivados de la síntesis de hemoglobina. El método no es útil para el análisis de muestras de HbA1c con altos valores de HbF. 8,29,30,31

#### **Control ( sujeto sano HbA homocigotico )**

De un control de un sujeto sano con HbA homocigotica la mayoría de los laboratorios reporta valores dentro de los rangos de normalidad. La mayoría de los insertos comerciales refieren liberalidades superiores al 98%. Todas las metodologías refieren poder cuantificar los valores de los rangos normales y patológicos más comunes.11

#### **HbS homocigoticas**

Los participantes que utilizaron columnas desechables de intercambio iónico reportan resultados bajos o no medibles de hemoglobina glucosilada . 11

#### **Beta Talasemia**

Aquellos laboratorios que utilizaron columnas descartables o desechables de intercambio iónico reportan consistentemente porcentajes altos de glucohemoglobina para estas muestras. 11

#### **HbE homocigotica**

Aquellos que utilizaron columnas descartables de intercambio iónico dan valores dentro de los rangos de referencia para esta variable en particular. 11

### **HbS homocigotica**

Los resultados de columnas desechables de Intercambio Iónico dan valores bajos. 11

### **HbS heterocigotica**

Los resultados de columnas desechables de intercambio iónico dan también valores bajos. 11

### **HbF hereditaria persistente**

Los resultados para las columnas desechables de intercambio iónico son altamente variables. 11

### **Derivados de hemoglobina**

Las columnas descartables de intercambio iónico muestran resultados consistentemente altos. 11

### **Sangre Almacenada**

Ningún laboratorio reporta diferencias substanciales y están dentro de los rangos de referencia. 11

### **Base de Schiff**

Las columnas descartables de Intercambio Iónicos no reporta cambios significativos con respecto a los valores del control. 11

### **5.2.3.-Electroforesis**

Como en el caso de la HPLC por Intercambio Iónico, la Electroforesis no es útil para la medición de HbA1c en muestras de sujetos con hemoglobinopatías homocigóticas, si esta situación es desconocida por el usuario. No todos los métodos de electroforesis reconocen las variantes de hemoglobina. Puesto que la técnica de la electroforesis para HbA1c no separa HbA0 de la HbE0 y la HbA1c de la HbE1c los resultados de hemoglobina glucosilada se ven incrementados para aquellos pacientes con HbAE. La base de Schiff por supuesto debe ser eliminada de la muestra según procedimiento para evitar interferencias.<sup>23</sup>

#### **Control ( sujeto sano HbA homocigotico )**

De un control de un sujeto sano con HbA homocigotica la mayoría de los laboratorios reportan valores dentro de los rangos de normalidad. <sup>11</sup>

#### **HbS**

Aquellos que utilizaron Electroforesis reportan resultados de "no medibles", otros reportan hemoglobina F y el resto reporta valores bajos. <sup>11</sup>

#### **Beta Talasemia**

La Electroforesis reporta resultados variables, mientras que el resto de los métodos en su mayoría reporta valores dentro de sus rangos de referencia y algunos lo hicieron apenas por debajo de estos rangos. <sup>11</sup>

#### **HbF hereditaria persistente**

Los datos de Electroforesis están desde los valores bajos de referencia hasta valores muy altos. <sup>11</sup>

**Derivados de hemoglobina**

La Electroforesis muestra resultados altos consistentemente altos. 11

**Sangre Almacenada**

Ningún laboratorio muestra diferencias substanciales y están dentro de los rangos de referencia. 11

**Base de Schiff**

La Electroforesis arroja datos o resultados que están entre los rangos de referencia hasta incrementados con respecto a los valores asignados al control. 11

### **5.3.-Inmunoensayo**

Debido a la especificidad de los anticuerpos utilizados por los diferentes métodos inmunológicos las conductas de las determinaciones son diferentes, mientras que uno de los métodos sólo reconoce HbA1c y sufre de fuertes interferencias ante la presencia de variantes de la hemoglobina además de no permitir corrección alguna. El otro método reconoce sitios de unión en la cadena beta en el grupo N terminal por lo que es posible reconocer variantes como las de la hemoglobina glucosilada HbS . Para la correcta interpretación de los resultados para sujetos con la condición de eritrocitos de vidas medias bajas deberá documentarse esta condición para utilizar rangos específicos y validar el uso de estos ensayos .25,26

#### **Control ( sujeto sano HbA homocigotico )**

De un control de un sujeto sano con HbA homocigotica la mayoría de los laboratorios reportan valores dentro de los rangos de normalidad . 11

#### **HbC**

Los usuarios de Inmunoensayos reportarán valores por debajo de cero de la calibración y en el caso de Dako de Novotest los valores están dentro del rango de referencia. 11

#### **HbS heterocigotica**

Los Inmunoensayos dieron valores bajos y sólo un inmunoensayo se encuentra dentro de los valores de referencia. 11

#### **HbF hereditaria persistente**

Los valores de los inmunoensayos están por debajo de los valores de referencia. 11

#### **Sangre Almacenada**

Ningún método mostró diferencias substanciales y están dentro de los rangos de referencia. 11

**Base de Schiff**

**En los ensayos inmunológicos no hay cambios significativos con respecto a los valores del control. 11**

## **6.-Conclusiones**

Las conclusiones de cual o cuales métodos son mejores para las diferentes circunstancias de un laboratorio clínico de investigación o referencia en el análisis o cuantificación de la hemoglobina glucosilada, sólo se podrán obtener hasta haber encontrado cual o cuales son las interferencias más comunes o importantes para cada método.

Por tanto las conclusiones acerca de que tipo de metodología es más adecuada para las diferentes circunstancias de un laboratorio, se deben plantear con respecto a cuatro factores:

- 1.- El tipo de muestra que se desea manejar.
2. La tecnología o metodología utilizada para la determinación.
- 3.- El tiempo de proceso y el grado de automatización con que se desea contar
- 4.- La cantidad de Capital con que el laboratorio cuente o desea destinar a este propósito.

### **6.1.-Conclusiones con respecto al tipo de muestra.**

Las mediciones de porcentajes de glucohemoglobina en sujetos con variantes de hemoglobina o altos porcentajes de derivados de hemoglobina pueden afectar de forma diferente a cada uno de los métodos de determinación de este parámetro.

La disminución del tiempo de exposición de la hemoglobina circulante a la concentración de glucosa puede llevar a un decremento verdadero de los porcentajes de hemoglobina glucosilada con la consecuente interpretación errónea cuando esta condición no es reconocida. Ejemplo de esta situación puede ser una anemia Talasémica o la presencia de hemoglobina HbS homocigótica o no.

Comparado con sujetos con HbA, los pacientes HbS y los sujetos con HbC poseen eritrocitos cuya vida media se encuentra entre los 27 - 36 días y 19 días respectivamente. lo que mostrará porcentajes de hemoglobina glucosilada disminuidos que no correlacionan con las concentraciones medias de glucosa en sangre, a menos que se utilicen rangos de referencia especiales para este tipo de condición. Los métodos específicos de medición de HbA1c hemoglobinopatías homocigóticas fallarán al detectar el porcentaje correcto al existir interferencias de variantes como HbS1c y Hb1c.

La expresión de HbA1c en términos de la hemoglobina total en condiciones caracterizadas por la presencia de altos porcentajes de hemoglobinas diferentes a las HbA0, tales como las de sujetos con hemoglobinopatías heterocigótica ( e.g. HbAE, HbAS y HbAC o sujetos con síntesis de variantes de Hb ( e.g. beta talasemia y HPPH). El uso de rangos de referencia específicos para cada condición parecen poco útiles por la variabilidad de las expresiones anormales de la hemoglobina

El almacenamiento y cuidado de la muestra es también importante pues la alteración de la temperatura, el pH y tiempo de vida de esta muestra puede disminuir definitivamente con la cantidad de hemoglobina glucosilada presente en la muestra.

## **6.2.-Con respecto a la Metodología utilizada.**

### **Metodologías por Afinidad**

Excepto por las hemoglobinas homocigóticas S y C en las que existen valores altamente variables los resultados vistos en las metodologías por afinidad de los diferentes fabricantes muestran conductas similares. Se observa que estos métodos no son afectados por cualquier otra variante o derivado estudiado. Para el análisis de pacientes con HbS y HbC con estos métodos se requiere del conocimiento previo de estas situaciones para la interpretación de los bajos resultados o bajos porcentajes obtenidos y se sugiere el uso de rangos especiales para la correcta interpretación.

### **Cromatografía Líquida de Alta Resolución y Mini o Micro Columnas desechables de intercambio iónico**

La medición de HbA1c con este tipo de metodologías es fácil en la HPLC pero las Mini o Micro columnas presentan problemas en contraste con HPLC puesto que estos métodos no reconocen las hemoglobinas anormales y son incapaces de separar las variantes de las fracciones glucosiladas de las no glucosiladas que pueden eluir conjuntamente, en consecuencia la corrección para hemoglobinopatías heterocigótica es imposible. El método no es útil en la determinación de HbA1c en estas condiciones y en la presencia de altos porcentajes de HbF sufre de fuertes interferencias.

### **Electroforesis**

Este método no es útil para determinar HbA1c en muestras de sujetos con hemoglobinopatías homocigóticas. La mayoría de los métodos de electroforesis reconocen las variantes de la hemoglobina, sin embargo la mayoría de los métodos de electroforesis no pueden separar la HbA0 de la HbE0 o HbA1c de la HbE1c lo que conduce a una interpretación elevada de la glucohemoglobina en pacientes diabéticos con HbAE. Con respecto a los derivados existen problemas de resolución pues tanto la Hb Carbamilada, la Hb Acetilada y la base de Schiff migran prácticamente igual que la HbA0 lo que conlleva a una posible baja interpretación de la hemoglobina glucosilada. En el caso particular de la base de Schiff su interferencia se puede evitar al eliminar la base de Schiff de la muestra previo al ensayo.

### **Inmunoensayos**

Debido a la especificidad de los anticuerpos de cada metodología los resultados entre los diferentes métodos de esta tecnología son diferentes para cada variante o derivado. Aquellos anticuerpos que solo reconocen a la HbA1 causan respuestas de poca cuantificación con las variantes de la hemoglobina, además que este método no acepta corrección alguna. Los métodos que si reconocen la HbS reportan problemas con el resto de las variantes .

### **6.3.-Con respecto al tiempo de proceso y el grado de automatización.**

Los métodos para los Inmunoensayos, Las Mini o Micro Columnas de Intercambio Iónico y de Afinidad, así como la Electroforesis son definitivamente metodologías de carácter manual, mismas que requieren pretratamiento para cada una de las muestras a analizar (hemolizado), situación de la que se desprende; que el usuario debe invertir tiempo en la preparación de la muestra. Este tipo de ensayos requiere gran habilidad manual y experiencia para obtener resultados confiables.

La Electroforesis requiere de preparación de amortiguadores y tiempo para el corrimiento de la muestra. En la mayoría de las técnicas de electroforesis sólo es posible correr hasta diez muestras, seguidas de la interpretación de las muestras por medio del Densitómetro. Por lo cual el proceso de un número mayor de muestras requiere de gran tiempo. La electroforesis también requiere de gran experiencia puesto que la preparación de geles y la dosificación de la muestra implica habilidad manual y gran experiencia en el manejo de la técnica.

Las Mini o Micro Columnas requieren de un mayor cuidado y tratamiento por parte de los usuarios, que además de pretratar las muestras (lisar eritrocitos y eliminar la fracción lábil) deberán esperar la elución de cada fracción, recolectarla y en su caso leerla para su interpretación. Cada determinación es individual y requiere de calibración previa del espectrofotómetro utilizado además de que en muchos casos los cálculos del porcentaje de hemoglobina glucosilada se realiza de forma manual. De aquí que la inversión de tiempo en cada muestra es de consideración.

Los métodos Inmunoensayos en general son totalmente manuales y requieren a su vez gran inversión de tiempo en pretratamiento ( lisado y eliminación de la fracción lábil ) y manejo de las muestras, tiempo para la incubación de los ensayos y la adición manual de los reactivos, además de la interpretación en un espectrofotómetro y la previa calibración de este equipo.

Hasta aquí ninguno de los métodos es capaz de lisar la muestra para liberar la hemoglobina de los eritrocitos de la muestra, así como ninguno es capaz de eliminar la posible interferencia de muestras lipémicas o ictericas, además que ninguno de estos métodos es capaz de eliminar la base de Schiff del proceso de forma automática y eliminar con esto todas las interferencias de este precursor de la hemoglobina glucosilada.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución bajo los principios de Intercambio Iónico y el de Afinidad requieren de corrimientos de standards o soluciones de referencia de concentración conocida de hemoglobina glucosilada para la correcta interpretación de la fracciones de la hemoglobina glucosilada en la muestra, además de la preparación previa de estos standards es necesario también el lavado y estabilización de la columna utilizada entre muestra y muestra. Es indispensable tratar cada muestra antes de ser preparada para lisar los eritrocitos y eliminar la fracción lábil, sin embargo existen instrumentos equipados con autocargadores e inyectores automáticos que hacen más eficiente el proceso de varias muestras.

Con respecto al mayor grado de automatización se puede referir al método de Captura Iónica por Afinidad a Boronatos en el cual no es necesario un pretratamiento de la muestra por parte del usuario y ningún manejo o interpretación por parte del mismo, en este método se puede determinar el % de hemoglobina Glucosilada de hasta 23 muestras o de una sola muestra y el resultado es interpretado automáticamente por el instrumento sin necesidad de que el usuario intervenga. El método lisa la muestra y elimina la base de Schiff del ensayo evitando la posible interferencia del precursor de la hemoglobina glucosilada en la correcta interpretación de la muestra.

#### **6.4.-Con respecto a la cantidad de Capital con que cuenta el laboratorio.**

La mayoría de los métodos manuales se pueden referir como bajos en costo, sin embargo el costo indirecto del tiempo dedicado por parte del usuario siempre debe ser tomado en cuenta. La mayoría de estos métodos permiten que cualquier laboratorio con una baja inversión pueda realizar este tipo de determinación. Es importante mencionar que en este tipo de método es factible correr una sola muestra y no se requiere de reunir un grupo de especímenes para hacer más económico para el laboratorio el correr este ensayo.

Las determinaciones semi automatizadas como la Electroforesis y la HPLC por Intercambio Iónico o por Afinidad resultan de alto costo si es necesaria la inversión en el sistema de interpretación y de las columnas o geles específicos necesarios para el corrimiento de cada muestra. Es importante añadir al costo de cada determinación, el costo del tiempo del usuario que aunque menor significa un costo indirecto a tomar en cuenta. Es importante mencionar que un laboratorio de gran volumen puede obtener un sistema especializado por parte de los fabricantes bajo consumo de reactivos sin necesidad de comprar el Sistema.

Por último la determinación por Captura Iónica implica definitivamente menores costos indirectos pues el usuario no dedica demasiado tiempo al proceso de este ensayo. Los costos a tomar en cuenta se derivan de los reactivos necesarios para la obtención de resultados en cada muestra o grupo de muestras.

## **7.- Referencias Citadas**

- 1.- Epidemiología de la Diabetes en México, Fundación Mexicana para la Salud (1995).
- 2.- Guía Clínica de la diabetes, Abbott Laboratories de España (1995),
- 3.- Gerard J. Tortora, Nicholas, P. Anagnostakos, (1990), Principios de Anatomía y Fisiología, pgs 513-514, 749-751
- 4.- Jesús Kumate Rodríguez, (1991) Prevalence of diabetes International Diabetes Directory, pg 150
- 5.- David E. Goldstein, ( 1994), Is Hemoglobin Testing Useful in Diabetes Mellitus ? Lessons from the Diabetes, Control and Complications Trial. Clin.Chem 40/8, 1637-1640
- 7.- Dr. David e. Goldstein, (1994) Glycated Hemoglobin in the Management of the Diabetes Patient. Abbott Diagnostics .
- 8.- Perfil Diabético, ( 1992) Laboratorios Lakeside, S.A.
- 9.- Lawrence W. Powers , (1989), Diagnostic Hematology, Clinical and technical Principles.
- 10.- Allen, D.w., W.A. Schroeder an J. Balog, (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. The American Journal chemical Society, (80), pg 1628 - 1634.
- 11.- Cas W. Weykamp, Theo J. Penders, Frits A. J. Muskeit and Willem van der Slik, (1993) Influence of Hemoglobin Variants and Derivatives on Glycohemoglobin Determinations, as investigated by 102 Laboratories Using 16 Methods., CLIN, CHEM 38/8 1717 - 1723

12.- Background on Glycated hemoglobin, Abbott Laboratories, Abbott park , Illinois

13.- Ma. Cristina Revilla Monsalve, (1995), Pruebas de laboratorio útiles para el control de la diabetes mellitus. Hemoglobina glucosilada. Revista Médica IMSS (Mex).33:501-504.

14.- Sintesoft Latinoamericano Edición Especial, Anatomía V. 2.0 Universal Soft 1996.

15.- David E. Goldstein, Diabetes Treatment, Diabetes 1991 Vital Statistics, American Diabetes Association, pp 45-47

16.- David E. Golstein, (1984), Measurement of Glycosylated hemoglobin, High Performance Liquid Chromatographic and Thiobarbituric Colorimetric Method Measurement of Glycosylated hemoglobin, Diabetes Care vol 7 No. 6 Nov - Dec.

17.-Insert Package (1986), Glyc-Affin GHb,Complete disposable system for quantitating glycohemoglobins (GHb).Código SG 6200, SG 6220,Isolab,Drawer 4350 Akron, Ohio USA 44321

18.- Insert Package Glyco-Tek, Affinity Column Method,Cat No. 5351,Helena Laboratories  
Beaumont, Texas 77704.

19.- Insert Package Glyco-SEP/A, (1995), Affinity Chromatography system for the quantitative colorimetric determination of glycohemoglobin in human blood.,GSA 801 - 120 pruebas  
Clinical Technology Corporation, 50 C Rocky point road, Box 1723 , Rocky point NY 11778.

20.- Insert Package, Glycated Hemoglobin IMx, (1995),Affinity Ion Capture Method, List. Number 1A86-66, ABBOTT LABORATORIES, ABBOTT PARK, IL 60064

- 21.- Wilson, DH, Bogacz, JP, Forsythe, CM, Turk, PJ, Lane, TL, Gates, RC, and Brandt, DR., (1995), Fully automated Assay for Glycated Hemoglobin on the Abbott IMx analyzer Utilizing Novel Approaches for Separation and Detection, Clinical Chemistry Submitted Feb. 1995
- 22.- Sergio Islas Andrade , Alberto Lifnitz Guinzberg, ( 1993 ), Diabetes Mellitus, Interamericana, McGraw - Hill S.A. DE C.V.,pg 292-294.
- 23.- Insert package DIATRAC HbA1c, (1995), Electrophoresis Sistem for glycated hemoglobin, BECKMAN INSTRUMENTS, BREA, CALIFORNIA
- 24.- Helen Klusek. Hamilton, Minnie Bowen Rose, (1993 ), Manual de Diagnóstico Clínico, INTERAMERICANA, S.A. DE C.V. pg 24, 27, 28, 29
25. Ronald H. Ng., Katherine M. Sparks, and Charles E. Hiar., (1995), A Rapid Automated immunoassay System or Measuring Hemoglobin A1c by Using Precalibrated Unitized Reagent Cartridges.,Dept. Of Pathol. And Lab. Med., Methodist Hosp. of Indiana, Indianapolis, IN 46202 and Miles Inc., Elkhart, IN 46515.
- 26.- Insert Package NovoClone HbA1c, (1995), Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Haemoglobin A1c, Novo Nordisk Diagnostics Ltd., Dirac House  
St. Johns Innovation Park, Cowley Road, Cambridge, U.K.
- 27.- Instruction Manual Diamat, (1990), Analyzer Sistem, For the quantitative Measurement of Hemoglobin A1c and/or Hemoglobin A1 (a+b+c), Bio-Rad Clinical Division, 1000 Alfred Novel Drive, Hercules, California 94547
- 28.- Instruction Method Insert Package Hemoglobina A1c by Column Test, For measuring the percentage of HbA1c in Whole Blood, Bio-Rad Clinical Division, (1995), 1000 Alfred Novel Drive, Hercules, California 94547
- 29.- Insert Package GLYCO- SEP, (1995), Quantitative colorimetric procedure for the determination of glycosylated hgb in whole blood. For in vitro diagnostic use.  
Chembio Diagnostic System, INC, 84 Horse black Road, Yaphank New York 11980

30.- Insert Package GLYCOHEMOGLOBIN UNITEST SET, (1995), EAGLE DIAGNOSTICS, AMERICANA SCIENTIFIC PRODUCTS, AMERICAN PHYSICIANS SERVICE AND SUPPLY. Divisions of American Hospital Supply Corporation, Mc Graw Park, IL 60085.

31.- Insert Package GLYCO Hb QUIK COLUMN PROCEDURE, HELENA LABORATORIES, (1995), 1530 Lindbergh Drive, Beaumont, Texas 77704 - 0752

32.- IMX GLYCATED HEMOGLOBIN LAUNCH BINDER, (1995), NATACHA NICHOLAS , Metabolic and Cardiovascular Diseases Product Manager, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL.