

INSTITUTO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA

La hemoglobina glicosilada y su importancia en la práctica asistencial e investigativa en el campo de la diabetes mellitus. Revisión bibliográfica

Lic. Enrique J. Ezcurra Ferrer'

Ezcurra Ferrer, E. J.: *La hemoglobina glicosilada y su Importancia en la práctica asistencial e investigativa en el campo de la diabetes mellitus. Revisión bibliográfica.*

La determinación de la hemoglobina glicosilada se ha introducido en el campo de la diabetes en años recientes y constituye actualmente un parámetro de gran importancia en la práctica asistencial e Investigativa en dicho campo. Se ofrecen en el presente trabajo los resultados de una revisión bibliográfica de esta temática (62 citas) y se comentan los aspectos más relevantes de las características estructurales y de composición, la biosíntesis y los métodos de determinación de la hemoglobina glicosilada, así como los resultados de estudios clínicos que ponen de manifiesto su importante asociación con la diabetes mellitus y sus complicaciones.

INTRODUCCION

Si se revisa la literatura científica especializada en el campo de la diabetes, anteriormente a 1975, se pueden encontrar escasísimas referencias, a un término que en los 10 años transcurridos desde esa fecha, ha aparecido en miles de publicaciones que cubre los más variados aspectos de la práctica diabetológica asistencial e investigativa.

La hemoglobina glicosilada, o más propiamente hablando, las hemoglobinas glicosiladas, se han relacionado, entre otras cosas, con el diagnóstico, con el control metabólico y con las complicaciones asociadas con la diabetes.

¿Qué es la hemoglobina glicosilada? ¿Cómo se sintetiza *in vivo*? ¿Cuál es su relación con la diabetes? ¿Se justifica el enorme interés que ha despertado en este campo en los últimos 10 años?

Se propone en el presente trabajo esclarecer éstas y otras interrogantes mediante una breve revisión bibliográfica que sirva, sobre todo, para dirigir al lector a las fuentes originales que sustentan sobradamente la relevante actualidad de esta temática.

Licenciada en Bioquímica.

NOMENCLATURA. COMPOSICION Y CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES

Como es bien conocido, más del 90% de la hemoglobina que se encuentra en los eritrocitos humanos, está formada por la hemoglobina A (también denominada A ó A). El 10% restante está constituido por compuestos resultantes de modificaciones possintéticas de la hemoglobina (HbA), por adición de pequeñas moléculas.

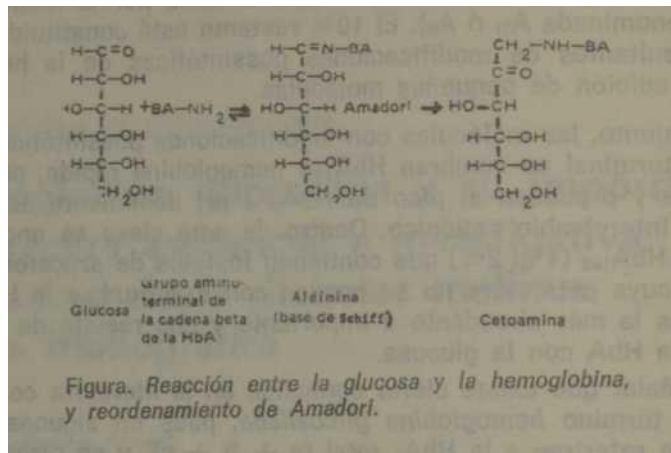
En su conjunto, las moléculas con modificaciones possintéticas del grupo N-aminoterminal se nombran HbAi ó hemoglobina rápida, pues eluyen rápidamente y preceden al pico de HbA₀ a pH débilmente ácido en columnas de intercambio catiónico. Dentro de esta clase se encuentran la HbAui y la HbA_{i,2} (1 al 2%) que contienen fosfatos de azúcares; la HbAib (1 al 2%), cuya estructura no se conoce con exactitud, y la HbA_{i,c} (4 al 6%), que es la más abundante e importante y que resulta de la condensación de la HbA con la glucosa.

Es de señalar que existe cierta confusión en la literatura con respecto al uso del término *hemoglobina glicosilada*, pues en algunos casos se emplea para referirse a la HbAi total (a + b + c), y en otros se utiliza para nombrar la subfracción más importante de ésta, la HbA_{i,c}.

Alien' en 1958, fue el primero en detectar la presencia de las hemoglobinas menores en hemolizados de pacientes normales, y logró aislar la HbA_{i,c}. Posteriormente se realizaron diversos estudios de caracterización, cuyos resultados iniciales² permitieron apreciar que las secuencias aminoácidas de la HbA₀ y de la HbA_{i,c} eran idénticas y se presenta como única diferencia detectable entre ambas, la presencia de una molécula de bajo peso molecular, reducible por borohidruro de sodio, unida al extremo aminoterminal de la cadena beta de la HbA_{i,c}. Evidencias posteriores³ apuntaban a la posibilidad de que esta sustancia fuera un carbohidrato, lo que fue confirmado por *Bunn y colaboradores*⁴ en 1975. Estos autores propusieron que el carbohidrato era la glucosa, la cual sufría un reordenamiento de Amadori, subsiguiente a la formación de una base de Schiff entre el residuo valínico N-terminal y el azúcar. Esta base de Schiff es un aducto lábil, llamado por algunos autores pre-HbA_{i,c}, el cual puede constituir, bajo ciertas condiciones, una fracción importante de la HbA_k- total. En la figura se representa de forma esquemática el reordenamiento de Amadori.

La evidencia definitiva que permitió esclarecer la naturaleza exacta del carbohidrato y el tipo de unión de éste con la cadena beta de la HbA, la brindaron *Koenig y colaboradores*,⁵ en 1977, los que caracterizaron a la 1-desoxi-1 (N-valil) fructosa, como el azúcar que se encuentra unido al extremo aminoterminal de la cadena beta de la HbA_{i,c}.

Con relación a las estructuras de las otras 2 hemoglobinas menores, HbAi y HbAib, la situación es más incierta. *McDonald y colaboradores* han demostrado que la HbAu puede separarse en 2 componentes, a1 y a2, con la utilización de métodos cromatográficos. El análisis del contenido de glucosa y fosfato de estas moléculas, así como la preparación de glicohemoglobinas sintéticas, les llevó a la conclusión de que la molécula presente en el extremo aminoterminal de la cadena beta de la HbAui es la fructosa 1-6 difosfato, mientras que en la HbAu2. es la glucosa-6 fosfato. La estructura de la HbA_h no ha sido aún dilucidada.



BIOSINTESIS

La biosíntesis de la HbA_{1c} se ha encontrado que tiene lugar a una velocidad constante durante el período de vida del eritrocito en todas las especies estudiadas. Como quiera que los hematíes circulantes carecen de la capacidad de iniciar la síntesis proteica, la producción de la HbA_{1c} tiene que necesariamente constituir una modificación posintética de la HbA.

Numerosas evidencias⁷⁻⁹ permiten afirmar que la glicosilación de la hemoglobina es una reacción no enzimática, lenta en su ocurrencia, probablemente irreversible y fundamentalmente dependiente de la concentración de glucosa circulante.

Dos hipótesis podrían explicar la formación *in vivo* de la HbA_{1c}. Bien la glucosa podría sufrir una adición no enzimática a la HbA₀ o la glucosa-6-fosfato formar un aducto más cargado negativamente que sería posteriormente desfosforilado para formar la HbA_{1c}. En ambos casos se requeriría la formación de la base de Schiff (pre-HbA_{1c}) entre el azúcar y la vaina del extremo N-terminal de la cadena beta, que luego sufriría el reordenamiento de Amadori ya señalado anteriormente.

La segunda variante resulta atractiva si se tiene en cuenta que *in vitro* ciertos intermediarios glicolíticos fosforilados presentan la condensación no enzimática con la hemoglobina a velocidades mucho mayores que los azúcares no fosforados.¹⁰⁻¹² Además, la presencia del fosfato le permitiría al azúcar orientarse y estabilizarse en el bolsón de difosfoglicerato de la molécula de hemoglobina y así explicar la especificidad de la reacción por la cadena beta. Sin embargo, también se ha informado⁶ que los niveles normales de HbA_{1c}, de glucosa-6-fosfato y de fructosa-6-fosfato en eritrocitos de

diabéticos, hacen insostenible la hipótesis de que la HbAu₂ sea el precursor fundamental de la HbA_{1c}.

*Shapiro y colaboradores*¹³ y *Svensen y colaboradores*¹⁴ han aportado recientemente datos adicionales sobre los complejos mecanismos imbricados en la biosíntesis no enzimática de los productos de glicosilación de la HbA.

MÉTODOS DE DETERMINACION DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA

De las consideraciones hechas en párrafos anteriores respecto a la composición, características estructurales y biosíntesis de la HbA_i, se desprende que su cuantificación puede basarse en métodos que midan individual y/o globalmente todas las fracciones glicosiladas, es decir, HbA_i total, la fracción más abundante, HbA_{1c}, y aún dentro de ésta las subfracciones estables y lábiles (pre-HbA_{1c}).

De los métodos que se utilizan actualmente para la dosificación de hemoglobina glicosilada, los de uso más generalizado (quizás por razones históricas), se basan en la cromatografía del hemolizado en columnas de intercambio catiónico. Del método original,¹⁵ que requería un largo tiempo para hacer las dosificaciones y el uso de columnas relativamente grandes con el consiguiente encarecimiento de la técnica, debido al alto precio de la resina, han ido surgiendo modificaciones^{16,19} que implican fundamentalmente el uso de microcolumnas que acortan el tiempo de análisis considerablemente y facilitan, por su notable simplificación, la determinación rutinaria de este parámetro. Todos estos métodos se basan en la rápida elución de las hemoglobinas menores a pH débilmente ácido,^{6,7} cambio de solución amortiguadora para eluir la HbA_o y medición de la absorbancia de las fracciones a 415 nanómetros. En dependencia de la variante utilizada se logrará la separación de las hemoglobinas menores en sus fracciones a, b, y c, o las 3 eluirán juntas como HbA_i total.

*Fluckiger y Winterhalter*¹¹ desarrollaron un método colorimétrico basado en la reacción del 5-hidroxi-metil-furfural producido por la hidrólisis ácida del residuo glicosado con el ácido tiobarbitúrico. Varios autores^{20,22} han modificado detalles metodológicos de este procedimiento, y aunque el mismo requiere una estricta estandarización, resulta por su sencillez, precisión, escasos requerimientos de equipos y recursos y potenciales posibilidades de ser automatizado, una de las metodologías más atractivas para la determinación rutinaria de hemoglobina glicosilada.

Se han descrito igualmente métodos que emplean electroforesis en gel de agar,^{23,24} radioinmunoensayo,²⁵ enfoque isoeléctrico^{26,27} y cromatografía líquida de alta presión,^{28,29} los que a pesar de ofrecer como ventajas la posibilidad de realizar un elevado número de determinaciones en corto tiempo, con alta sensibilidad y especificidad, requieren de la utilización de equipos costosos y sofisticados que no están a la disposición de un laboratorio clínico promedio.

La cromatografía de afinidad también ha sido utilizada recientemente para la determinación de hemoglobina glicosilada⁰¹⁺⁰¹ y el hecho de ser menos sensible que la de intercambio iónico a

variaciones de pH y temperatura, cantidad de muestra añadida y requerir básicamente sólo de columnas regenerables y un espectrofotómetro, le ofrecen mayores posibilidades de aplicación en el trabajo rutinario.

La literatura reciente ofrece varias referencias a estudios comparativos realizados entre muchos de estos métodos^{32,35} en los que se ponderan muchas de sus respectivas ventajas y limitaciones.

RESULTADOS DE ESTUDIOS CLINICOS

Fueron *Huisman* y *Dozy*³⁶ los que primero detectaron niveles aumentados de hemoglobina glicosilada asociados con la diabetes mellitus. Posteriormente, *Rahbar* y *colaboradores*,^{37,38} en una encuesta realizada en Teherán, detectaron una banda de hemoglobina anormal en 2 de 1 200 pacientes estudiados, los cuales resultaron ser diabéticos; estos autores encontraron esta misma banda en la sangre de todos los pacientes diabéticos que estudiaron a partir de esa primera observación.

Trivelli y *colaboradores*¹⁵ llevaron a cabo uno de los primeros estudios clínicos de los niveles de HbA_{1c} en pacientes diabéticos, y a partir de entonces, numerosos estudios han confirmado que este parámetro se halla aumentado de 1,5 a 2 veces más en pacientes diabéticos, que en sujetos normales.^{19,39,43} En el Instituto Nacional de Endocrinología se han corroborado estos hallazgos en uno de los primeros trabajos que se realizaron dentro de esta temática.⁴⁴

En la tabla se resumen los resultados obtenidos en estos estudios, y se observa que los niveles promedio de hemoglobina glicosilada en sujetos normales y en pacientes diabéticos, son significativamente diferentes en todas las series estudiadas.

Tabla. Niveles de hemoglobina glicosilada en normales y en diabéticos en diversos estudios ($\bar{x} \pm DE$ en %)

Autor (referencia)	N	Normales	N	Diabéticos
<i>Trivelli</i> ¹⁵	3	3,3 — 3,5	8	6 — 10
<i>Gabbay</i> ³⁹	28	4,9 ± 0,7	48	10,0 ± 1,9
<i>Poynard</i> ⁴⁰	26	5,1 ± 0,7	34	9,8 ± 2,3
<i>Schoss</i> ⁴¹	92	4,6 ± 1,1	123	6,5 ± 0,9
<i>Spicer</i> ⁴²	10	4,6 ± 0,3	15	9,5 ± 0,9
<i>Graf</i> ⁴³	42	8,2 ± 1,2	29	12,7 ± 3,4
<i>Chou</i> ¹⁹	18	6,6 ± 1,3	52	10,8 ± 2,5
<i>Ezcurra</i> ⁴⁴	126	6,3 ± 0,4	163	10,7 ± 2,6

Se han investigado asimismo los niveles de hemoglobina glicosilada en niños, ⁴⁸ en mujeres embarazadas normales y diabéticas,⁴⁹⁻⁵¹ en pacientes diabéticos en las más diversas situaciones clínicas, y se ha evaluado su posible utilidad en el diagnóstico de la diabetes y la intolerancia a los carbohidratos.⁵²⁻⁵⁴

Nos limitaremos, sin embargo, en los próximos párrafos, a comentar brevemente las evidencias relacionadas con el papel más relevante de esta determinación en la práctica diabetológica, es decir, el constituir un indicador integral del control metabólico en pacientes diabéticos.

La observación de que los niveles de hemoglobina glicosilada eran normales en el gemelo no diabético,⁵⁵ vino a confirmar que los niveles anormales encontrados en la diabetes son secundarios al desajuste metabólico de la enfermedad y no reflejo de un determinismo genético. El hecho de que la velocidad de glicosilación de la hemoglobina para formar HbA_{1c} sea determinada fundamentalmente por los niveles de glucosa a los que se ven expuestos los hematíes circulantes durante su vida media (aproximadamente 120 días), ha sido inobjetablemente confirmado por numerosos estudios.

*Gabbay y colaboradores*³⁹ encontraron una correlación significativa entre los niveles de HbA_{1c} y la excreción urinaria de glucosa (en muestras de 24 horas) medida mensualmente en 128 pacientes diabéticos. La mejor correlación se encontró entre el nivel de HbA_{1c} y la glucosuria medida 2 meses antes, tiempo que constituye la vida media de los hematíes normales

Se han encontrado niveles muy elevados de hemoglobina glicosilada en pacientes diabéticos en cetoacidosis,^{56,57} lo que refleja, sin lugar a dudas, el período prolongado de descontrol metabólico precedente al episodio agudo.

Ditzel y Kjaergaard,⁵⁸ al estudiar diabéticos en el comienzo de la enfermedad y al seguir estos pacientes hasta la mejoría de su control metabólico, hallaron que los valores elevados de hemoglobina glicosilada del inicio, tendían gradualmente a disminuir hacia la zona normal, a medida que el control metabólico de los pacientes mejoraba.

En diabéticos no insulino dependientes, *Graf*⁴³ encontró una relación altamente significativa entre la tasa de HbA_{1c} y la glicemia en ayunas, lo cual refleja la utilidad de este parámetro, aún en estos casos en los que el control metabólico tiende supuestamente a ser más estable. Mediante un diseño diferente, *Ezcurra y Díaz*³⁹ hallaron que en diabéticos no insulino dependientes, la hemoglobina glicosilada podía indicar la tendencia del control glicémico por períodos largos de tiempo.

Como bien señalan *Gonen y Rubenstein* en su magnífica revisión,⁶ la gran utilidad de la dosificación cuantitativa de hemoglobina glicosilada en la evaluación del control metabólico en pacientes diabéticos ha sido bien demostrada. Dichos autores resumen sus ventajas y limitaciones.

Ventajas

1. Es una prueba objetiva, no dependiente de la cooperación ni de la habilidad del paciente, como es el caso del autoanálisis cuantitativo de glicemia y glucosurias mediante el uso de tiras y equipos específicos.

2. Es independiente de la hora del día, comida o ejercicios previos.
3. Describe el control metabólico con un solo valor.
4. Facilita la evaluación inicial del paciente y simplifica el proceso de seguimiento.
5. Provee al clínico con un punto final definitivo hacia el cual debe dirigir el proceder terapéutico.
6. Puede servir como una prueba de *screening* para diabéticos, aparentemente compensados, y que en realidad tengan un control metabólico lejos del óptimo.

Limitaciones

1. No es útil para decidir sobre manipulaciones agudas de terapia insulínica o diata.
2. Obviamente no refleja la ocurrencia de episodios hipoglucémicos.
3. No es útil en presencia de ciertos desórdenes hematológicos en los que la vida media del hematíe esté alterada.
4. A pesar de recientes modificaciones, la metodología analítica es aún más cara y laboriosa que la de otras determinaciones empleadas para evaluar el control metabólico en pacientes diabéticos.

LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA Y LAS COMPLICACIONES DE LA DIABETES

Medio siglo después del descubrimiento de la insulina, las secuelas micro y macrovasculares de la diabetes mellitus constituyen el reto principal para los investigadores en este campo, debido a lo relativamente poco que se conoce aún sobre su patogenia, y al enorme impacto en cuanto a morbilidad y mortalidad que estas complicaciones representan para las poblaciones diabéticas en todo el mundo.

Uno de los puntos más controvertidos en los que a este tópico se refiere, es la relación entre el grado de control metabólico y la ocurrencia de las complicaciones a largo plazo,⁶¹ lo cual ha sido, sin duda, debido en parte a la carencia de un método objetivo y uniforme que permita monitorear de modo efectivo el verdadero *status* del control metabólico en los pacientes diabéticos. Como se ha señalado en epígrafes anteriores, la hemoglobina glicosilada constituye un índice integrador que refleja la media de las concentraciones glicémicas del paciente en un período de 6 a 8 semanas anteriores a su cuantificación, y es por esta razón que se han depositado enormes esperanzas en que estudios clínicos prospectivos que incluyan esta determinación, permitirán dilucidar definitivamente la probable relación entre la hiperglicemia y las complicaciones asociadas con la diabetes. Es importante destacar el carácter prospectivo que tienen que tener estos estudios, pues

el tiempo en que transcurre la síntesis *in vivo* de la HbA_{1c}, no puede guardar relación alguna (para una medición aislada) con la ausencia, presencia, frecuencia o severidad de las complicaciones.

Como señalan *Cerami y Koenig*,⁶² hay otro aspecto importante que engarza a la hemoglobina glicosilada con las secuelas de la diabetes, y es la potencial utilización de la reacción de glicosilación de la hemoglobina como modelo bioquímico conceptual dentro del cual se enmarquen los mecanismos patogénicos de estas secuelas. Si una proteína como la hemoglobina, a través de una reacción posribosomal, es capaz de sufrir cambios que afecten su afinidad por el oxígeno y modifiquen en cierta medida la elasticidad y deformabilidad del eritrocito, entonces otras proteínas estructurales o funcionales (enzimas) son potencialmente capaces de sufrir cambios semejantes que expliquen las modificaciones bioquímicas, estructurales y funcionales asociadas, entre otras, con las lesiones micro y macrovasculares.

Ya han comenzado a aparecer trabajos en la literatura relacionados con la glicosilación de muchas otras proteínas y se han referido hechos, hipótesis y especulaciones sobre la significación fisiopatológica de estos procesos para la diabetes mellitus y sus complicaciones. Esta temática será objeto de una próxima publicación que se tiene actualmente en preparación.

SUMMARY

Ezcurra Ferrer, E. J.: *Glycosylated hemoglobin and its importance in assistance and investigative practice in the field of diabetes mellitus. Bibliographic review.*

Recently, determination of glycosylated hemoglobin has been introduced in the field of diabetes mellitus and is a parameter of great importance in assistance and investigative practice within such field. In this paper, results from a bibliographic review on this themes (62 quotations) are offered and the most outstanding aspects of structural and of composition characteristics biosynthesis and methods for determination of glycosylated hemoglobin, as well as results of clinical studies making evident its important association with diabetes mellitus and its complications, are commented.

RÉSUMÉ

Ezcurra Ferrer, E. J.: *L'hémoglobine glycosylée et son importance au niveau des soins et de la recherche dans le domaine du diabète sucré. Revue bibliographique.*

Depuis quelques années, le dosage de l'hémoglobine glycosylée a été introduit dans le domaine du diabète et il constitue actuellement un paramètre d'une grande importance au niveau des soins médicaux et de la recherche dans ce domaine. Dans ce travail l'auteur présente les résultats d'une revue bibliographique réalisée sur ce sujet (62 références) et il commente les aspects les plus remarquables des caractéristiques structurales et de composition, la biosynthèse et les méthodes de dosage de l'hémoglobine glycosylée, ainsi que les résultats d'études cliniques qui mettent en évidence son importante association avec le diabète sucré et ses complications..

BIBLIOGRAFIA

1. *Allen, D. IV.; IV. A. Schroeder; J. Boieg*: Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin. *J Am Chem Soc* 80: 1628, 1958.
2. *Holmquist, IV. R.; IV. A. Schroeder*: A new N-terminal blocking group Involving a Schiff base In haemoglobin A_{1c}. *Blor.hem* 5: 2489, 1966.

3. *Bookchin, R. M.; P. M. Gallop*: Structure of hemoglobin A_{1c}: nature of the N-terminal beta chain blocking group. *Biochem Biophys Res Comm* 32: 86, 1968.
4. *Bunn, H. F. et al.*: Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in HbA_{1c}. *Biochem Biophys Res Comm* 67: 103, 1975.
5. *Koenig, R. J.; S. H. Blobstein; A. Cerami*: Structure of carbohydrate of haemoglobin A_{1c}. *J Biol Chem* 252: 2992, 1977.
6. *McDonald, M. J. et al.*: Glycosylated minor components of adult hemoglobin. *J Biol Chem* 253: 2327, 1978.
7. *Bunn, H. F. et al.*: The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. *J Clin Invest* 57: 1652, 1976.
8. *Fitzgibbons, J. F.; R. D. Koler; R. T. Jonea*: Red cell agerelated changes of HbA_{1a} + b and A_{1c} in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 58: 820, 1976.
9. *Koenig, R. J.; A. Cerami*: Synthesis of HbA_{1c} in normal and diabetic mice: potential model of basement membrane thickening. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 3687, 1975.
10. *Haney, D. N.; H. F. Bunn*: Glycosylation of hemoglobin in vitro; affinity labelling of hemoglobin by glucose-6-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 3534, 1976.
11. *Fluckiger, R.; K. H. Winterhalter*: In vitro synthesis of HbA_{1c}. *FEBS Lett* 71: 356, 1976.
12. *Stevens, V. J. et al.*: Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 252: 2998, 1977.
13. *Shapiro, R. et al.*: Site of non-enzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J. Biol. Chem.* 255: 3120, 1980.
14. *Svendens, P. A. et al.*: Synthesis of glucosylated hemoglobin in vivo. *Diabetol* 21: 549, 1981.
15. *Trivelli, L. A.; H. M. Ranney; H. T. La*: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 284 : 353, 1971.
16. *Kynoch, P. A.; H. Lehman*: Rapid estimation (2.5 hrs) of glycosylated hemoglobin for routine purposes. *Lancet* II: 16, 1977.
17. *Welch, S. G.; B. J. Boucher*: A rapid microscale method for the measurement of hemoglobin A, (a + b + c). *Diabetol* 14: 209, 1978.
18. *Jones, M. B.; R. D. Koler; R. T. Jones*: Microcolumn method for the determination of hemoglobin minor fractions, A, (a + b) and A_{1c}. *Hemogl* 2: 53, 1978.
19. *Chou, J.; C. A. Robinson, A. L. Siegel*: Simple method of estimating glycosylated hemoglobin and its application to evaluation of diabetic patients. *Clin Chem* 24: 1708, 1978.
20. *Parker, K. H. et al.*: Improved colorimetric assay for glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 27: 669, 1981.
21. *Nicol, D. J.; R. E. Davis; D. H. Currow*: A simplified colorimetric method for the measurement of glycosylated hemoglobin. *Pathol* 15: 443, 1983.
22. *Stafender, J. C.; R. P. Eaton*: Evaluation of a colorimetric method for the determination of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 29: 135, 1983.
23. *Menard, L. et al.*: Quantitative determination of HbA_{1c} by agar-gel electrophoresis. *Clin Chem* 26: 1598, 1980.
24. *Dahl-Jorgensen, K.; A. E. Larsen*: HbA_{1c} determination by agar-gel electrophoresis after elimination of labile HbA_{1a}: a comparison with ion-exchange chromatography. *Scand J Clin Lab Invest* 42: 27, 1982.
25. *Javid, J. et al.*: Immunologic characterization and quantification of HbA_{1c}. *Br. J. Hemat.* 38: 329, 1978.
26. *Beccarla, L. et al.*: HbA_{1c} separation by isoelectric focusing. *Am. J. Hematol.* 4: 367 (1978).
27. *Simon, M.; J. Cuan*: HbA_{1c}, by isoelectric focusing. *Clin Chem* 28: 9, 1982.
28. *Cole, R. A. et al.*: A rapid method for the determination of glycosylated hemoglobin using high-pressure liquid chromatography. *Metabolism* 27: 289, 1978.
29. *Davis, J. E.; J. M. McDonald; L. Janet*: A high-performance liquid chromatographic method for HbA_{1c}. *Diabetes* 27: 102, 1978.
30. *Bouriotis, V. et al.*: Measurement of glycosylated hemoglobin using affinity chromatography. *Diabetol* 21: 579, 1981.
31. *Klenk, D. C. et al.*: Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography. comparison with colorimetry and ion-exchange methods and effects of common interferences. *Clin Chem* 28: 2088, 1982.

32. *Pecorero, ff. E. et al.*: Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. *Diabetes* 28: 1120, 1979
33. *Little, Ft. R. et al.*: Effect of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography and colorimetry. *Clin Chem* 29: 1113, 1983.
34. *Boucher, B. J. et al.*: A collaborative study of the measurement of glycosylated hemoglobin by several methods in 7 laboratories in the United Kingdom. *Diabetol* 24: 265, 1983.
35. *Mortensen, H. B. et al.*: Comparison of six assays for glycosylated hemoglobin determination. *Scand J Clin Lab Invest* 43: 357, 1983.
36. *Hulsman, T. H.; A. H. Dozy*: Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *J Lab Clin Med* 60: 302, 1962.
37. *Rahbar, S.*: An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics. *Clin Chim Acta* 22: 296, 1968.
38. *Rahbar, S.; O. Blumenfeld; H. M. Ranneg*: Studies of the unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Comm* 36: 838, 1969.
39. *Gabbay, K. H. et al.*: Glycosylated hemoglobin and long term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 44: 859, 1977.
40. *Poynard, J. P. et al.*: Dosage par microméthode de l'hémoglobine A_{1c} chez les diabétiques. Premiers résultats. *Nouv Press Med* 7: 1648, 1978.
41. *Schoss, R.; S. Schoss-Barbette; C. Lambotte*: Dosage of HbA_{1c} by isoelectric focusing. *Clin Chim Acta* 86 : 61, 1978.
42. *Spicer, K. M.; R. C. Allen; M. G. Buse*: A simplified assay of HbA_{1c} in diabetic patients by use of isoelectric focusing and quantitative microdensitometry. *Diabetes* 27: 384, 1978.
43. *Graf, R. J.; J. B. Halter; D. Porte*: Glycosylated hemoglobin in normal subjects and subjects with maturity onset diabetes. Evidence for a saturable system in man. *Diabetes* 27: 834, 1978.
44. *Ezcurra, E. J.*: Niveles de hemoglobina glicosilada en sujetos normales y en pacientes diabéticos. (En prensa).
45. *Jackson, R. L.; R. L. Hess; J. D. England*: HbA_{1c} values in children with overt diabetes maintained in varying degrees of control. *Diabet Care* 2: 391, 1979.
46. *Heinze, E. et al.*: HbA_{1c} in children with long standing and newly diagnosed diabetes mellitus. *Acta Paediatr Scand* 68: 602, 1979.
47. *Kaplan, L. A. et al.*: HbA_{1c} in haemolyzates from healthy and insulin-dependent diabetic children as determined with a temperature controlled minicolumn assay. *Clin Chem* 28: 13, 1982.
48. *Mortensen, H. S.; A. A. Volund*: Variations in HbA_{1c} and blood glucose in children with newly diagnosed diabetes mellitus described by a biokinetic model. *Diabet Metab* 10: 18, 1984.
49. *Schwartz, H. C. et al.*: Effects of pregnancy on HbA_{1c} in normal, gestational diabetic and diabetic women. *Diabetes* 25: 1118, 1976.
50. *Vintzileos, A. M.; J. P. Thompson*: Glycohemoglobin determination in normal pregnancy and in insulin dependent diabetics. *Obstet Gynecol* 56: 435, 1980.
51. *Artal, R.*: Glycohemoglobin as a screening test for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 148 : 412, 1984.
52. *Dunn, P. J. et al.*: Reproducibility of HbA_{1c} and sensitivity to various degrees of glucose intolerance. *Ann Int Med* 91: 390, 1979.
53. *Boucher, B. J.*: Glycosylated hemoglobin in the diagnosis of diabetes mellitus and for the assessment of chronic hyperglycaemia. *Diabetologia* 21: 34, 1981.
54. *Nakao, J.*: Classification of glucose tolerance in the aged based on HbA_{1c}. *Tohoku J Exp Med* 132: 305, 1980.
55. *Tattersall, R. B. et al.*: Hemoglobin components in diabetes mellitus. Studies in identical twins. *N Engl J Med* 293: 1175, 1975.
56. *Dolhofer, R.*: Different behaviour of HbA_{1a-c} and glycosylalbumin levels during recovery from diabetic ketoacidosis and non-acidotic coma. *Diabetologia* 21: 211, 1981.
57. *Paulsen, E. P.; M. Koury*: HbA_{1c} levels in insulin dependent and independent diabetes mellitus. *Diabetes* 25 (Suppl 2): 890, 1976.
58. *Ditzel, J.; J. Kjaergaard*: HbA_{1c} concentration after initial insulin treatment for newly diagnosed diabetics. *Br Med J* 1: 741, 1978.

59. *Ezcurra, E. J.; O. Díaz*: Correlación entre niveles glicémicos y concentración de hemoglobina glicosilada en pacientes diabéticos. (En Prensa).
60. *Gonen, B.; A. H. Rubenstein*: HbA_{1c} and diabetes mellitus. *Diabetologia* 15: 1, 1978.
61. *Bressler, R.*: Control of the blood glucose. Is it valuable? Is it feasible? *Drugs* 17: 461, 1979.
62. *Cerami, A.; R. J. Koenig*: HbA_{1c} as a model for the development of the sequelae of diabetes mellitus. *TIBS* 4: 73, 1978.

Recibido: 9 de septiembre de 1985

Aprobado: 8 de diciembre de 1985

Lic. *Enrique Ezcurra Ferrer*
Instituto Nacional de Endocrinología
Zapata esquina a C, municipio "Plaza de la Revolución"
Habana 4. Ciudad de La Habana
Cuba