

La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes

Germán Campuzano-Maya¹, Guillermo Latorre-Sierra²

Resumen: La humanidad enfrenta una epidemia de diabetes que avanza incontenible. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la población mundial de diabéticos ha pasado de 30 millones en 1985 a 220 millones en 2009 y se espera que para el 2030 esta cifra llegue 336 millones. La diabetes se define como un estado hiperglucémico que con el correr de los años se manifiesta por daño a múltiples órganos, siendo la primera causa de ceguera, de falla renal y de amputaciones en los adultos, y una de las principales causas de enfermedad cardíaca y de trombosis. Desde que se descubrió la hemoglobina A1C (HbA1c), ésta ha sido el indicador más fiel para monitorear los pacientes diabéticos y gracias a la estandarización alcanzada en la prueba en los últimos años, la *American Diabetes Association* (ADA) la incorporó recientemente como el primer criterio de diagnóstico de diabetes en individuos asintomáticos o con sospecha clínica de esta enfermedad. La ADA ha definido tres puntos de corte para la HbA1c: $\leq 5,6\%$, nivel no diabético; entre $5,7\%$ y $6,4\%$, nivel prediabético; y, $\geq 6,5\%$, compatible con el diagnóstico de diabetes. Igualmente, la ADA mantiene como la meta en el tratamiento del paciente diabético un nivel de HbA1c $\leq 7\%$. Además de la definición de los puntos de corte, enfatiza en la necesidad de que las pruebas se hagan en un laboratorio clínico que utilice instrumentos y reactivos certificados por el NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) y estandarizados de acuerdo con las especificaciones del DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*). En el módulo se analizan los aspectos clínicos y epidemiológicos de la diabetes mellitus y los aspectos históricos de la prueba, las bases de la glicación como un fenómeno bioquímico no-enzimático, los métodos disponibles para medir la HbA1c y los factores preanalíticos, analíticos y posanalíticos que podrían afectar la prueba, que tanto el médico como el laboratorio clínico deben conocer al momento de solicitar o de hacer la prueba, respectivamente.

Palabras clave: diabetes, hemoglobina glicada, HbA1c, diagnóstico y manejo de la diabetes, métodos para medir HbA1c, factores preanalíticos, factores analíticos, factores posanalíticos.

Campuzano-Maya G, Latorre-Sierra G. La HbA1c en el diagnóstico y en el manejo de la diabetes. *Medicina & Laboratorio* 2010; 16: 211-241.

Módulo 1 (La clínica y el laboratorio), número 80. Editora Médica Colombiana S.A., 2010®.

Recibido el 5 de junio, 2010; aceptado el 22 de junio, 2010.

¹ Médico especialista en Hematología y Patología Clínica. Docente, *Ad Honorem*, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. Médico Director, Laboratorio Clínico Hematológico. Carrera 43C No. 5-33, Medellín, Colombia. E-mail: gcampuzano@hematologico.com

² Médico especialista en Medicina Interna y Endocrinología. Profesor titular, Jefe de la Sección de Endocrinología y Metabolismo. Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. E-mail: glatorres.endocrino@gmail.com

Hasta el año 2009, cuando el Comité Internacional de Expertos, conformado por representantes de la *American Diabetes Association* (ADA), la *European Association for the Study of Diabetes* (EASD) y la *International Diabetes Federation* (IDF), aprobó la hemoglobina A1C (HbA1c) como criterio de diagnóstico de diabetes [1] e inmediatamente después, la ADA, uno de los órganos más representativos a nivel mundial en la diabetología, en la revisión de los “Estándares de Cuidado Médico en Diabetes”, correspondiente al año 2010, al incorporarla por primera vez como criterio de diagnóstico de la diabetes [2]; anteriormente, desde el consenso de 1997, el diagnóstico de esta enfermedad se fundamentaba en el valor de la glucemia en ayunas (mayor de 126 mg/dL, en dos ocasiones) o en la prueba de tolerancia a la glucosa, tras la ingesta de 75 gramos de glucosa, (mayor de 200 mg/dL, en dos ocasiones), o en el caso de presentar un valor superior a 200 mg/dL, en cualquier momento del día, y síntomas compatibles de diabetes (como poliuria, polidipsia o pérdida de peso), criterios que se habían consensuado con base en los resultados de estudios epidemiológicos, en los que se había observado un incremento en el desarrollo de retinopatía a largo plazo, como una de las primeras manifestaciones relacionadas con la enfermedad [3-6].

A este uso, se le adiciona ahora una nueva indicación, la HbA1c a partir del momento en que la prueba fue mejorando el desempeño analítico y se difundió su conocimiento [7-10], rápidamente se convirtió en el “estándar de oro” para evaluar la respuesta al tratamiento instalado [11-12] y así lo ha ratificado en los últimos años la ADA [2, 13-17] y los demás organismos internacionales relacionados con el manejo de la diabetes, como la *Canadian Diabetes Association*. [18-19], la *American Diabetes Association* y el *American College of Obstetricians* [20], la *National Kidney Foundation* [21], el *US Preventive Services Task Force* (USPSTF) [22], la *European Society of Cardiology* [23] y la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) [24], en nuestro medio, sólo para enunciar algunos ejemplos.

El objetivo de este módulo es revisar el uso de la HbA1c en el contexto del diagnóstico y del manejo de la diabetes. Para lograr el objetivo se analizarán cuatro aspectos: (1) la epidemia de la diabetes (2) ¿qué es la HbA1c?, (3) aspectos técnicos relacionados con la medición de la HbA1c, y (4) indicaciones de la HbA1c en la práctica médica. El módulo se ha diseñado pensando en el médico que debe diagnosticar y tratar la diabetes lo más temprano posible, de tal manera que logre reducir las complicaciones de ella, y al personal del laboratorio clínico, en particular al bacteriólogo, que debe proveer al médico estudios con resultados exactos, precisos y sobre todo, de utilidad clínica, que permitan diagnosticar e intervenir adecuada y oportunamente al paciente con diabetes.

La epidemia de la diabetes

La diabetes es la primera causa de ceguera, de falla renal y de amputaciones en los adultos, y una de las principales causas de enfermedad cardíaca y de trombosis. La diabetes se ha convertido en un problema importante para la salud pública, debido a la epidemia en los adultos y a la aparición de la diabetes tipo 2 en los niños, relacionada con la obesidad y el estilo de vida sedentario de la población. Cuatro de cada cinco personas con diabetes viven en países en vía de desarrollo, afectando por igual a hombres y a mujeres, cada vez más jóvenes. La diabetes tipo 2 es responsable de cerca del 95% de todos los casos de diabetes y de casi el 100% de los casos no diagnosticados de diabetes [25]. La prediabetes es una condición asintomática en la cual se presentan niveles altos de glucemia, con valores superiores a los normales, pero inferiores a los establecidos para su diagnóstico [26-27]. Para una mejor comprensión del módulo, en la **figura 1** se esquematiza la historia natural de la diabetes tipo 2 [28].

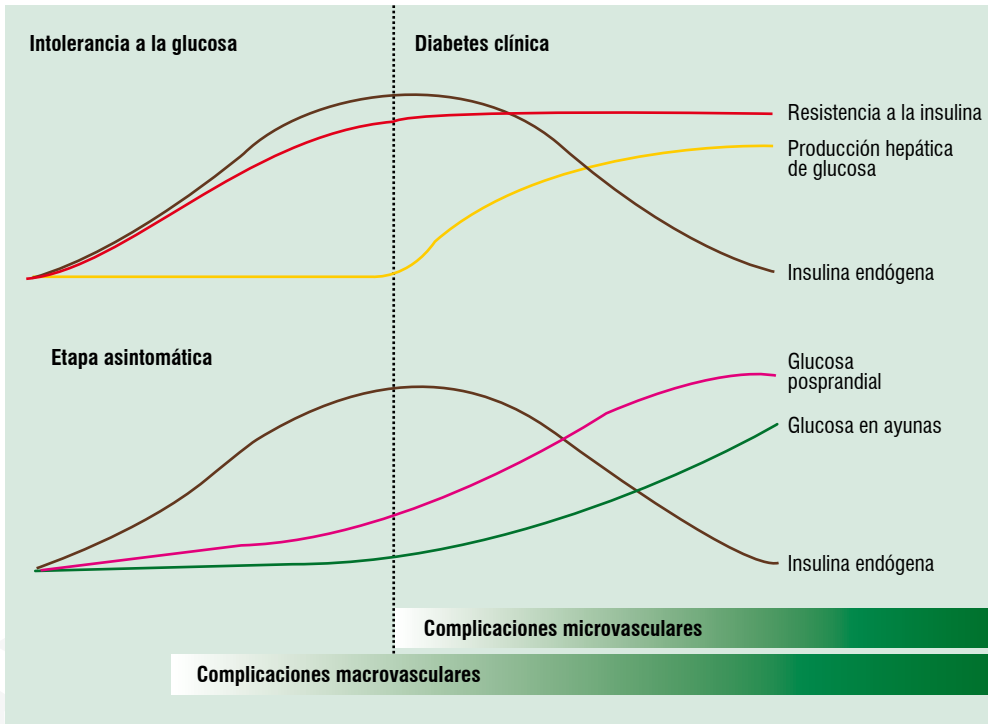


Figura 1. Historia natural de la diabetes tipo 2. El estado prediabético de la intolerancia a la glucosa se caracteriza por un aumento paulatino de la resistencia a la insulina, por una hiperinsulinemia compensatoria y por una hiperglucemia posprandial leve. Inicialmente, los niveles de glucemia en ayunas se mantienen dentro de los rangos normales; sin embargo, estos niveles comienzan a aumentar a medida que se va disminuyendo la secreción de la insulina y su acción sobre la glucosa, al mismo tiempo que aumenta la producción de glucosa por parte del hígado. Tomado y modificado de Ramlo-Halsted BA, Edelman SV. The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice. Prim Care 1999; 26: 771-789 [28].

Definición y clasificación de la diabetes

La diabetes se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, que se presenta como consecuencia de defectos en la secreción de insulina, de la acción de la insulina, o de ambos, que a largo plazo se asocia con daño, disfunción o falla de varios órganos, especialmente los ojos, los riñones, el sistema nervioso, el corazón y los vasos sanguíneos [29].

De acuerdo con la ADA, la diabetes se clasifica en cuatro grupos [29], a saber:

- **Diabetes tipo 1:** resultante de la destrucción de las células β del páncreas, usualmente llevando a una deficiencia absoluta de insulina, la mayoría de ellas de origen autoinmune;
- **Diabetes tipo 2:** resultante de un defecto progresivo de la secreción de insulina, en el contexto de resistencia gradual a la insulina;
- **Otros tipos de diabetes** debidos a distintas causas: por ejemplo, defectos genéticos en la función de las células β del páncreas, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades exocrinas del páncreas como la fibrosis quística, y la diabetes inducida por drogas o químicos, entre otros; y,
- **Diabetes gestacional:** la que se diagnostica en el curso del embarazo.

La diabetes como problema de salud pública

La diabetes es un serio problema de salud pública y es así como la humanidad se enfrenta a una verdadera epidemia. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuando en el año 1985 la población mundial de diabéticos era de 30 millones de pacientes [30], en el año 2009 había aumentado a 220 millones de individuos con diabetes [31], y se estima que de continuar con esta tendencia, llegaría a 366 millones en el año 2030 [32]. Para mayor información, en la **figura 2** se muestra el mapa de la prevalencia mundial de la diabetes [33] y en la **figura 3** se muestra la evolución de la prevalencia mundial de la diabetes de 1985 a 2030 [30]. El incremento exagerado de la prevalencia de la diabetes se relaciona con el aumento de la población mundial, el envejecimiento de la misma, la urbanización y, sobre todo, con el incremento de la obesidad y de la inactividad física [30, 32-33], situación que explica por qué la epidemia afecta con mayor prevalencia a los países industrializados, sin que sean excluidos los países en vía de desarrollo [25]. Para agravar el problema, aparte del creciente número de pacientes con diagnóstico de diabetes, se estima que para el año 2025 habrán cerca de 500 millones de individuos con prediabetes [34], y lo más grave, que un número importante de individuos tendrán diabetes sin que se les haya diagnosticado, debido a que la enfermedad puede estar oculta por muchos años antes de que se presenten las manifestaciones clínicas o las complicaciones en los órganos blanco [2, 35-38], situación por la cual algunos autores consideran que los casos diagnosticados representan la punta de un gran iceberg [39-41]. En Colombia, la Asociación Colombiana de Diabetes estima que el 7% de la población colombiana mayor de 30 años tiene diabetes tipo 2 y de 30% a 40% de los afectados, desconocen su enfermedad [42]

Con la incorporación de la HbA1c como criterio de diagnóstico a partir del presente año (2010) [2], se espera que el diagnóstico aumente en el futuro, tanto en el número de casos, como en el número de diagnósticos precoces que se logren establecer, y así parece que sucederá como lo dejan entrever los primeros trabajos que aplican los nuevos criterios para el diagnóstico de la diabetes [43]. Cowie y colaboradores encontraron en población estadounidense, que utilizando como criterio de diagnóstico un valor de HbA1c $\geq 6,5\%$, el diagnóstico de diabetes aumenta en la población de menores de 20 años en 1,8% y en mayores de 65

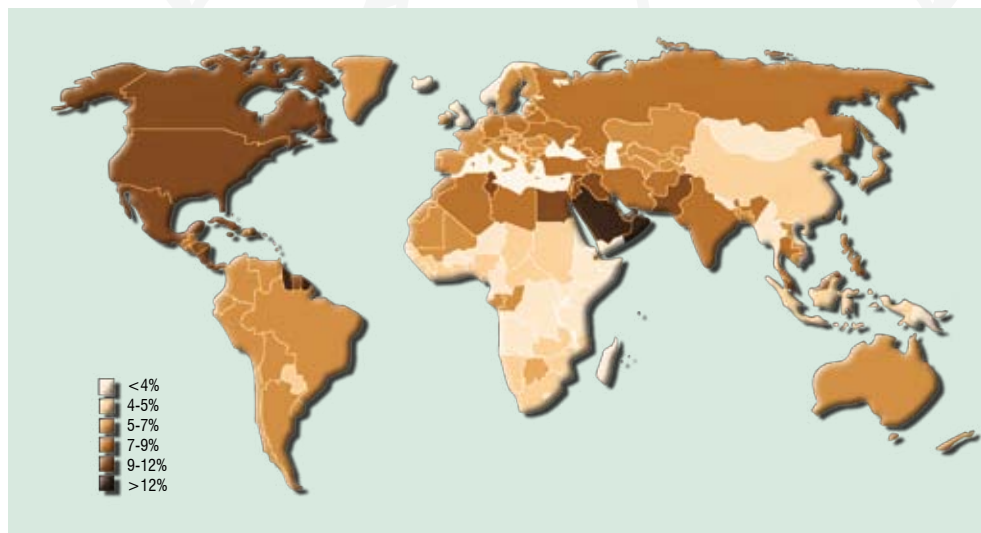


Figura 2. Prevalencia estimada, en porcentajes, para la diabetes en los adultos entre 20 y 79 años de edad, para el año 2010. Diabetes Atlas 2009, International Diabetes Federation [33].

años en 3,5% con respecto a los criterios convencionales basados en la glucemia [43] y estos valores podrían ser más altos en los países en donde la tamización no es una cultura generalizada [44-46], de ahí la necesidad de poner en marcha programas masivos de diagnóstico de la enfermedad oculta, sobre todo en población de alto riesgo, en particular en todos aquellos individuos con sobrepeso y obesidad [2, 37-38], como una manera más eficiente de abordar la epidemia de la diabetes, como claramente podría ser el caso de Colombia, en donde la prevalencia aparentemente es baja con respecto al resto del mundo y de la región.

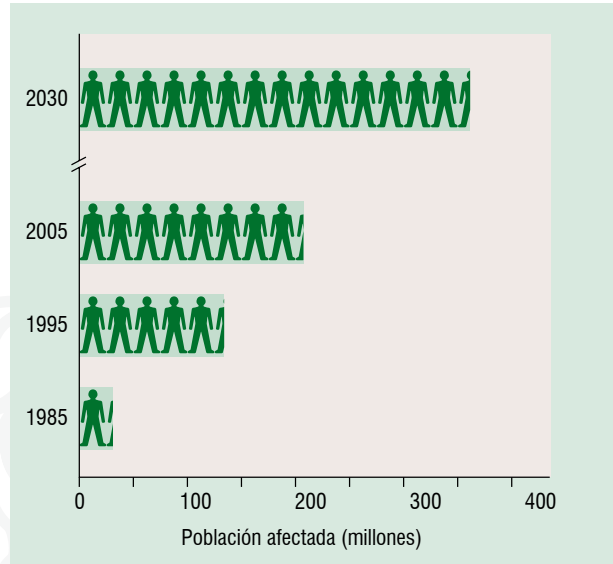


Figura 3. Evolución de la prevalencia de la diabetes a nivel mundial de 1985 al 2030. Tomado y modificado de **Smyth S, Heron A.** Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Medicine* 2005; 12: 75-80 [30].

Complicaciones de la diabetes

La hiperglucemia prolongada, con el correr del tiempo, después de años o décadas, da origen a grandes daños y disfunción, usualmente de carácter irreversible, en órganos como los ojos, los riñones, los nervios, los vasos sanguíneos grandes y pequeños, así como en la coagulación sanguínea [47-49], como se analizará con mayor detalle en los siguientes subtítulos.

Manifestaciones microvasculares

Como se mencionó, dentro de este grupo se incluyen la retinopatía con posibilidad de evolucionar a ceguera [6, 50-51], la nefropatía con posibilidad de evolucionar a insuficiencia renal crónica [52-55] y la neuropatía con posibilidad de evolucionar a complicaciones como úlceras en los pies, amputaciones de extremidades [56], artropatía de Charcot y manifestaciones de disfunción autonómica, incluida la disfunción sexual [57-66], en donde el sello anatómico clásico de la microangiopatía diabética es el engrosamiento de las membranas basales capilares, engrosamiento que posteriormente induce una angiopatía oclusiva, hipoxia y daño tisular [67]. En la mayoría de estas complicaciones hay una buena correlación con la severidad y la duración de la hiperglucemia y pueden aparecer entre 5 a 10 años después de haberse iniciado la enfermedad.

Manifestaciones macrovasculares

A diferencia de las manifestaciones microvasculares que son específicas de la diabetes, las manifestaciones macrovasculares, como la enfermedad coronaria [68], la trombosis [69-70] y la hipertensión arterial [71] no son exclusivas de la diabetes. Las manifestaciones macrovasculares, además de ser una causa muy importante de mortalidad relacionada con la diabetes, conllevan un alto costo social y económico, costo que se traduce en disminución de la calidad de vida con aumento de la morbilidad en una población económica activa, ausentismo laboral e incremento de los gastos en salud pública por la necesidad de estudios complementarios y procedimientos terapéuticos complejos [5, 48-49, 72-73].

¿Qué es la HbA1c?

La hemoglobina glicada o glicohemoglobina, más conocida con la sigla HbA1c, hemoglobina A1C o simplemente A1C, tradicionalmente mal denominada hemoglobina glicosilada o glucosilada, de acuerdo con la definición de la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) es un término genérico que se refiere a un grupo de sustancias que se forman a partir de reacciones bioquímicas entre la hemoglobina A (HbA) y algunos azúcares presentes en la circulación sanguínea [74]. Para una mejor comprensión del proceso de glicación es importante aclarar algunos aspectos fundamentales del eritrocito y de la hemoglobina, su mayor componente, y la relación de éstos con los azúcares presentes en la sangre y contacto con el eritrocito y la hemoglobina.

En condiciones normales el eritrocito vive en la circulación un promedio de 120 días y en el caso de la hemoglobina humana, el mayor componente del eritrocito, está formada por dos dímeros de globina que en el adulto corresponden a la HbA ($\alpha\alpha\beta\beta$), que representa más del 97% de la hemoglobina total, a la HbA2 ($\alpha\alpha\delta\delta$), que comprende menos del 2,5%, y a la hemoglobina fetal (HbF) ($\alpha\alpha\gamma\gamma$), que representa menos del 1% de la cantidad de hemoglobina del adulto [75]. El contacto permanente del eritrocito con otras sustancias, en particular con azúcares como la glucosa, hace que ésta las incorpore a su estructura molecular proporcionalmente con la concentración de estas sustancias en el torrente sanguíneo y durante el lapso de vida de la célula.

En el caso concreto de la HbA1c, como se ha expresado, la HbA constituye el 97% de la hemoglobina del adulto (estado que se alcanza a partir del primer año de vida), a través de los mecanismos de glicación parte de la HbA se convierte en HbA1 y dependiendo del azúcar que incorpore en sus diferentes formas, conocidas con hemoglobinas rápidas, por ser las que primero eluden en los procesos de cromatografía usados para identificarlas, HbA1a, HbA1b y HbA1c, siendo esta última el principal componente (aproximadamente el 80 % de la HbA1). Como resultado de las diferentes reacciones de glicación, la HbA, finalmente se subdivide en dos grandes grupos: la HbA1 que corresponde a la hemoglobina que ha sido fruto de la glicación no-enzimática y la Hb0 (hemoglobina “cero”) que corresponde la fracción no glicada. En la **tabla 1** se relacionan algunas de estas reacciones y sus respectivos productos finales, y en la **figura 4** se esquematizan estos conceptos. En la **figura 5** se describen los pasos en la glicación de la hemoglobina.

Vale la pena recordar que la molécula de hemoglobina también puede ser modificada por otras sustancias y dentro de estas en el entorno del análisis de la hemoglobina glicada, se debe hacer referencia a las conocidas como hemoglobinas químicamente modificadas (también conocidas como derivados de hemoglobina y las que aparecen con mayor frecuencia son la Hb-carbamilada y la Hb-acetilada, que serán analizadas en detalle bajo el subtítulo aumento espurio de la HbA1c, en los preanalíticos de la prueba.

Tabla 1. Tipos de hemoglobinas glicadas	
Producto final	Reacción
HbA1a1	Glicación con fructuosa 1, bifosfato
HbA1a2	Glicación con glucosa 6 fosfato
HbA1b	Glicación con ácido pirúvico
HbA1c	Glicación con glucosa
L HbA1c	Denota la fracción lábil de la HbA1c, o la fracción aldimina
S HbA1c	Denota la fracción estable de la HbA1c, o la fracción cetoamina

Glicación de otras proteínas

La glicación no es una reacción exclusiva de la hemoglobina. La glicación se presenta con la mayoría de las proteínas del organismo y en la clínica, algunas de las complicaciones de la diabetes están íntimamente relaciona-

das con fenómenos de glicación como sucede con la glicación del cristalino con su consecuente catarata que puede presentarse, con relativa alta frecuencia, en los pacientes diabéticos [76]. Algunas de las reacciones de glicación de otras proteínas de posible uso clínico mediante su medición en el laboratorio clínico son la albúmina glicada y la fructosamina.

Albúmina glicada

Se diferencia de la HbA1c en el hecho de que la glicación en vez de la hemoglobina se hace en la albúmina presente en el torrente sanguíneo. La albúmina glicada es una alternativa útil en los casos en donde se sabe que el paciente puede tener falsos resultados con la HbA1c, como puede ser en pacientes con hemoglobinopatías u otras anemias hemolíticas en donde característicamente se reduce la vida media del eritrocito [77]. Tiene como problemas el que no está estandarizada, como sí lo está la HbA1c, no está disponible en los laboratorios clínicos de rutina y que sólo refleja el estado de glucosa de las dos a tres semanas previas [77], cuando la HbA1c refleja la glucemia media del individuo en los tres a cuatro meses previos a la toma de la muestra [78]. La albúmina glicada puede estar modificada en pacientes con enfermedades digestivas perdedoras de proteínas o en pacientes sometidos a diálisis peritoneal [77]. La albúmina glicada es una buena opción para los pacientes diabéticos con falla renal crónica debido a que no se modifica ni por la anemia ni por el uso de eritropoyetina [79], además de que su concentración se correlaciona positivamente con el grado de la severidad de la insuficiencia renal [80].

Fructosamina

También se fundamenta en un fenómeno de glicación, siendo el resultado de la interacción de glucosa sanguínea con lisina presente en la albúmina u otras proteínas plasmáticas [81-83]. La fructosamina se utiliza con mayor frecuencia que la albúmina glicada y puede estar disponible en algunos laboratorios clínicos como alternativa a la HbA1c. Tiene algunos inconvenientes como la falta de estandarización y que sólo refleja el estado de la glucemia en las dos a tres semanas anteriores al momento en que se toma la muestra [82-83]. Como en el caso anterior, puede ser una alternativa cuando la HbA1c no está indicada, como podría ser en la diabetes gestacional [84].

¿Cómo la HbA1c se relaciona con la diabetes?

Hay una relación directa entre el porcentaje de la HbA1c y el promedio de glucosa sérica porque la glicación (no la glicosilación) de la hemoglobina es un proceso relativamente lento, no-enzimático, que sucede durante los 120 días de la vida media del eritrocito y que termina en la glicación irreversible de la hemoglobina de los glóbulos rojos hasta su muerte, por lo que se ha dicho que la HbA1c refleja la glucemia media del individuo en los tres a cuatro meses previos a la toma de la muestra [78]. Los resultados descritos por Fitzgibbons y colaboradores, en 1976, mostraron que la concentración de HbA1c se incrementa a medida que el eritrocito

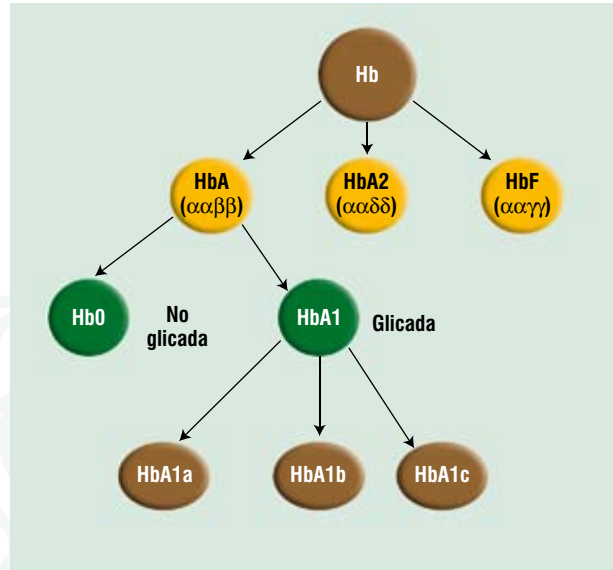


Figura 4. Esquema de los diferentes tipos de hemoglobina.

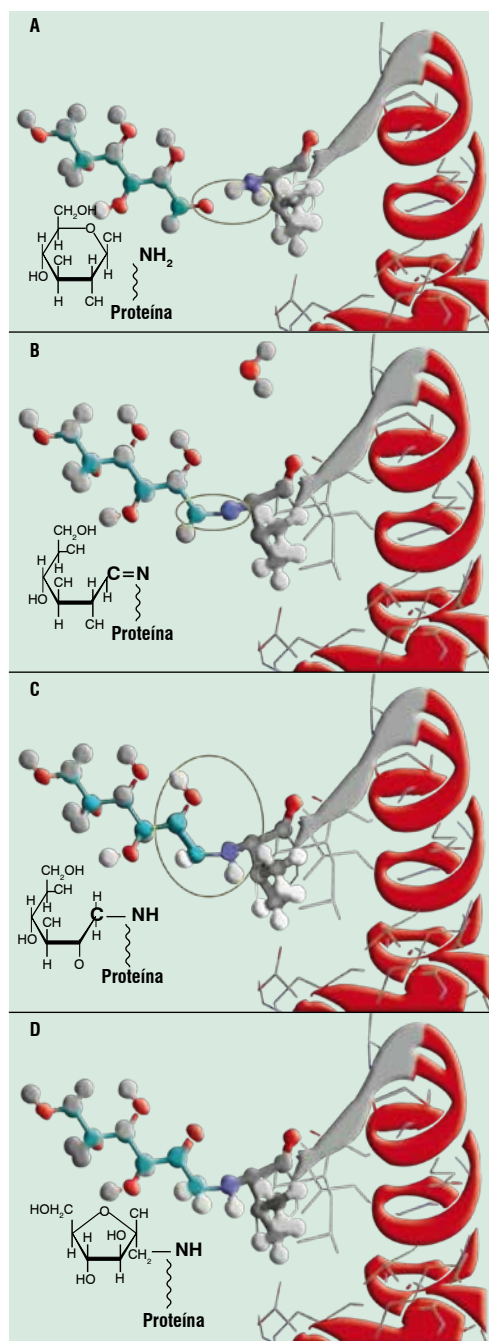


Figura 5. Proceso de reacción entre la cadena β de la hemoglobina y la glucosa. Cuando las moléculas de glucosa se ponen en contacto con el grupo amino libre en la cadena β de la hemoglobina (A), se produce una unión entre el aminoácido valina de la hemoglobina y la molécula de glucosa. (B) En la primera reacción reversible se forma una aldimina. Esta unión provoca un reajuste Amadori (C), por el cual se genera de forma irreversible una cetoamina (D), que permanecerá unida durante toda la vida del eritrocito.

envejece [85] y Bunn y colaboradores, en el mismo año, informaron que en los pacientes diabéticos el incremento en el porcentaje de la HbA1c es significativamente mayor que en los individuos sanos [86].

En la **figura 6** se muestra la relación de la concentración de la HbA1c y el desarrollo de complicaciones microvasculares [16] y en la **figura 7** se muestra el impacto de la reducción de la HbA1c en relación a la disminución de complicaciones microvasculares y microvasculares [5].

Como se ha expresado, en la práctica se acepta que la concentración de HbA1c refleja la glucemia media del individuo en los tres a cuatro meses previos a la toma de la muestra [78]; sin embargo, estudios recientes muestran que cuando se tiene un determinado resultado de HbA1c, el 50% de ésta corresponde a la HbA1c formada en el mes previo a la toma de muestra; 25% en el mes previo a esto y 25% restante, esto es, en los meses previos tres y cuatro [87-88].

El descubrimiento

El conocimiento del fenómeno de glicación no es nuevo si se tiene en cuenta que fue descubierto en 1912 por el químico francés Maillard al estudiar la pérdida de lisina (aminoácido esencial), en los alimentos conservados cuando éstos son ricos en proteínas y en glúcidos [89]. La glicación, de gran importancia en la industria alimentaria, sólo se relacionó con aspectos médicos a mediados de las década del 50. La historia de la HbA1c en la medicina, se remonta al año 1955 cuando Kunkel y Wallenius informaron la separación, mediante el uso de electroforesis, de varias fracciones menores de la hemoglobina humana [90], fracciones que tras subsecuentes estudios mediante cromatografía de intercambio catiónico, confirmaron la presencia de cinco picos menores que se denominaron HbA1a, HbA1b, HbA1c, HbA1d y HbA1e [91]. En 1962, Huisman y Dozy informaron el aumento en una de las fracciones menores de la hemoglobina en cuatro pacientes con diabetes y las relacionaron con el hecho que los pacientes

tomaban tolbutamida y que este medicamento podría estar produciendo el hallazgo [92], pero los esfuerzos por reproducir *in vitro* este fenómeno fueron infructuosos [92-93]. En 1968, Bookchin y Gallop la caracterizaron como una glucoproteína [94] y por la misma época, Rahbar durante un estudio de hemoglobinas anormales en la Universidad de Cambridge, en una muestra de cerca de 1.200 pacientes, observó que dos pacientes con antecedentes de diabetes mostraban una fracción anormal, hallazgo que lo llevó a estudiar, en los años 1968 y 1969, a 47 pacientes con diagnóstico de diabetes mal controlada y en todos observó la banda de hemoglobina anormal que denominó “una hemoglobina inusual en pacientes con diabetes”, por lo que originalmente se malinterpretó como una variable de la hemoglobina (hemoglobinopatía) que predisponía al desarrollo de la diabetes [95-96]. Por la misma época en que se descubría la HbA1c, la comunidad científica empezó a ser informada de las complicaciones vasculares que hoy se reconocen claramente relacionadas con el mal manejo de la hiperglucemia y a pedir a los investigadores herramientas que permitiesen tener una verdadera evaluación del control metabólico de la enfermedad [97]. Pero fue sólo hasta 1971, cuando Trivelli y colaboradores sugirieron por vez primera la relación entre las “hemoglobinas rápidas”, el promedio de la concentración de la glucosa y las complicaciones a largo plazo de la diabetes [98].

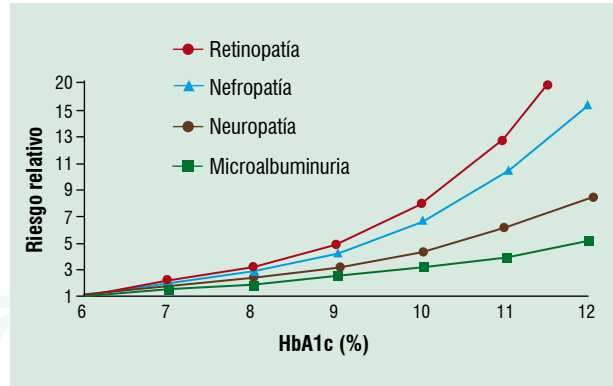


Figura 6. Relación de la concentración de la HbA1c y el desarrollo de complicaciones microvasculares [16].

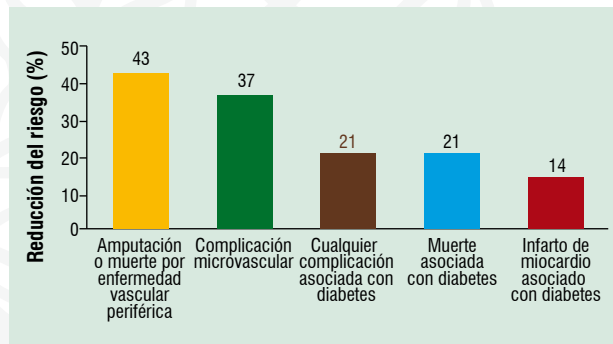


Figura 7. Reducción del riesgo de complicaciones de la diabetes mellitus tipo 2 por cada reducción de 1% en los niveles de la hemoglobina glicada, en pacientes del estudio UKPDS (estudio prospectivo de diabetes en el Reino Unido) [6].

Historia de la HbA1c

La HbA1c está disponible comercialmente como prueba de laboratorio para uso clínico desde finales de la década de los 70 [7-10], y en nuestro medio se introdujo por vez primera en el Laboratorio Clínico Hematológico S.A. en Medellín, en 1982 [99]. Las pruebas iniciales fueron un caos: no había calibradores, los pocos métodos disponibles para uso clínico no estaban estandarizados y los resultados de un laboratorio no eran comparables con los de los otros laboratorios, ni los de un método con los de otro método; sin embargo, se hacía lo mejor que se podía y desde ese momento se empezó a utilizarla como indicador de control metabólico en el tratamiento de la diabetes [7-10]. Para tener una idea del caos que se vivía alrededor de la HbA1c, un artículo de la época comparó cinco métodos en siete laboratorios clínicos en el Reino Unido y encontró un coeficiente de variación interensayo (entre una prueba y otra de diferente marca pero con el mismo método) por encima del 15% [100]. No fue hasta la década de los 90, cuando se demostró la utilidad de la HbA1c en el manejo de la diabetes con dos

grandes estudios: el DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) en pacientes con diabetes tipo 1 [3] y el UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*) en pacientes con diabetes tipo 2 [4], que la prueba empezó a tener protagonismo en el manejo de la diabetes.

Estandarización de la medición de la HbA1c

Como sucede con la mayoría de las pruebas de laboratorio, al principio se presentan muchos inconvenientes y la HbA1c no fue la excepción si se tiene en cuenta la gran variabilidad entre las diferentes pruebas, como ya se ha expresado [100]. Para 1992, el *College of American Pathologists* (CAP) publicó el primer estudio que mostrara la realidad analítica de la prueba en ese momento; el resultado no podía más desastroso: la variabilidad entre los resultados de diferentes laboratorios clínicos fue tan amplia que se podían tener resultados tan dispares para la misma muestra de sangre como del 4% al 8,1% [101], coeficiente que hoy no sería aceptable debido a que podría ubicar a un mismo individuo en un nivel de normoglucemia o compatible con el diagnóstico de una diabetes. Como respuesta a la situación y ante la necesidad de tener una prueba lo suficientemente confiable, la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) estableció un grupo de trabajo con el objetivo de estandarizar la medición de la HbA1c, incluida la preparación y evaluación de material de referencia y el desarrollo de un método de referencia internacional [102-104]. Después de varios años de trabajo, el sistema se fue desarrollando, siendo los avances más destacados la preparación y evaluación de un material de referencia [102, 104], el desarrollo de un método de referencia internacional [74] y su mantenimiento por una red de laboratorios de referencia continuamente monitoreados mediante estudios intercomparativos [105]; los resultados de doce de estos estudios realizados entre 2001 y 2006 han confirmado la capacidad del sistema para garantizar la estabilidad y continuidad del método de referencia internacional para HbA1c [106]. En 2007 se publicó la Declaración de Consenso entre estas principales Asociaciones y la IFCC, en el que se establece que el MR es la única ancla válida para implementar la estandarización y que los valores de HbA1c deben ser reportados mundialmente en unidades internacionales del MR (mmol/mol) y las derivadas del *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGS) usando la ecuación maestra IFCC-NGSP [107]. Finalmente, la ADA, gracias a la estandarización y la madurez de la prueba alcanzada en la última década, como lo verificó el Comité Internacional de Expertos [1], en la revisión del año 2010 de los “Estándares de Cuidado Médico en Diabetes”, la incorporó como el primer criterio de diagnóstico de diabetes [2].

El mismo Consenso señala que estas medidas deben ser adoptadas a la brevedad posible en todo el mundo y destacan: “este acuerdo contribuirá a la trazabilidad de los resultados mundialmente, paralelamente al progreso del conocimiento científico relacionado con las características bioquímicas y analíticas de la HbA1c” [107], Consenso que fue ratificado recientemente y ampliamente difundido en todos los medios especializados [108-112].

Glucemia media estimada

El nuevo término “glucemia media estimada” o “glucemia promedio estimada”, ADAG (por sus siglas en inglés de *A1c-Derived Average Glucose*) o eAG (por sus siglas en inglés de *Estimated Average Glucose*, se refiere a los resultados de la concentración de la HbA1c equivalentes a la concentración de la HbA1c [113]. No se trata de un nuevo parámetro, si no de una nueva forma de expresar el porcentaje de la HbA1c: se refiere a los resultados de la HbA1c convertida a un nivel promedio de glucosa en la sangre en unidades de medida (mg/dL) más familiares a los pacientes. Tanto la ADA como la *American Association for Clinical Chemistry* (AACC) esperan que el uso de este nuevo término ayude a los pacientes y a sus médicos a hacer los cambios necesarios en el tratamiento para mejorar el estado de salud en general del paciente [114-115].

Recientemente se han publicado los resultados del estudio sobre ADAG, éste presenta una relación lineal entre HbA_{1c} y la glucosa promedio (AG), aunque se aceptan algunas limitaciones, se propone convertir los valores de HbA_{1c} en un valor estimado del promedio de glucosa en mg/dL, mediante la siguiente ecuación: $eAG = 28,7 \times A1c - 46,7$ [113]. También se conoce la glucemia media estimada como glucemia media trimestral debido a que como la HbA_{1c}, expresa el nivel de la glucemia del último trimestre antes de tomar la muestra.

Para tener una idea más clara del concepto de la glucemia media estimada, es importante conocer algunos aspectos metodológicos del trabajo que correlacionó la HbA_{1c} con la glucemia promedio el cual dio origen a la fórmula que más tarde avalaron la ADA, la EASD y la IFCC [107]. Los participantes del estudio fueron reclutados en 11 centros de Estados Unidos y en países de Europa, África y Asia; 507 voluntarios, entre ellos 268 personas con diabetes tipo 1, 159 con diabetes tipo 2 y 80 personas sin diabetes, participaron en los análisis; los participantes tenían un control glucémico estable, tal y como demostraron dos mediciones de HbA_{1c} con un 1% de diferencia entre los mismos en los 6 meses anteriores al reclutamiento; se tomaron un promedio de 2.700 glucemias por cada participante, derivados a partir de al menos 2 días de monitorización continua de la glucosa, realizada cuatro veces, y de automonitoreos diarios en 7 puntos mediante mediciones de glucosa capilar realizadas como mínimo 3 días por semana, en momentos en los que no se estuviese realizando la monitorización continua de la glucosa [113]. De este estudio [113] hay que resaltar dos aspectos:

- Los valores de HbA_{1c} permanecieron por lo general estables; a lo largo del transcurso del estudio, y en el 96% de los casos, la HbA_{1c} no difirió más allá de un 1% de su valor al momento del inicio; y
- La estrecha correlación entre la HbA_{1c} al final del período de 3 meses del estudio y el promedio de glucosa calculada durante los 3 meses previos se puede expresar como la sencilla regresión lineal: promedio de glucosa en mg/dl = $28,7 \times HbA_{1c} - 46,7$, $R^2 = 0,84$, $P < 0,0001$, lo que permite calcular una promedio de glucosa en sangre estimada para los valores de la HbA_{1c}.

En la **tabla 2** se reproducen los valores de la glucemia media estimada derivados del antes citado estudio [113], valores que, de paso vale la pena aclarar, no coinciden con los valores informados en el laboratorio clínico en una muestra convencional o en los automonitoreos que practican los pacientes.

Valores de referencia

Tradicionalmente, se ha definido como valor de referencia, “la media, más o menos dos desviaciones estándar”, siendo para la HbA_{1c} entre 4% y 6% [116-117], cifra que puede variar de acuerdo con la tecnología utilizada y la población objeto de estudio [118]. Pero, como sucede en otras mediciones de laboratorio, por ejemplo en los estudios relacionados con lípidos, donde los valores de corte son diferentes de los valores de referencia pues reflejan niveles de decisión clínica y de riesgo epidemiológico en lugar de valores de distribución poblacional, como los que definen el valor de referencia como

Tabla 2. Glucemia media estimada [113]

% de HbA _{1c}	Glucemia media estimada (mg/dL)
5	97 (76-120)*
6	126 (100-152)
7	154 (123-185)
8	183 (147-217)
9	212 (170-249)
10	240 (193-282)
11	269 (217-314)
12	298 (240-347)

* Entre paréntesis el rango de la glucemia media estimada

tal, en el caso de la glucemia y la HbA1c en el diagnóstico de la diabetes, como resultado de múltiples estudios de grandes poblaciones de pacientes con o sin diabetes, a través de todo el mundo, la ADA, siguiendo las recomendaciones del Comité de Expertos Internacionales [1], estableció para el diagnóstico de diabetes los siguientes puntos de corte para la HbA1c [2], siempre y cuando la prueba se haga bajo condiciones claramente establecidas y estrictamente controladas, como se analizará más adelante, los siguientes criterios, dependiendo del objetivo de la prueba: como prueba de diagnóstico o como prueba de seguimiento.

Como prueba de diagnóstico

A partir del reconocimiento por parte del Comité Internacional de Expertos, en el 2009, de la HbA1c como prueba apta para el diagnóstico de la diabetes [1] y su inclusión en la revisión de los “Estándares de Cuidado Médico en Diabetes”, correspondiente al año 2010, como el primer criterio de diagnóstico de la diabetes en individuos asintomáticos o con sospecha clínica o epidemiológica [2], se han definido los siguientes puntos de corte para la HbA1c, con sus respectivos significados:

- Nivel no diabético: $\leq 5,6\%$; en la práctica descarta el diagnóstico de diabetes;
- Nivel prediabético (riesgo aumentado de diabetes o prediabetes): entre $5,7\%$ y $6,4\%$;
- Nivel diabético: $\geq 6,5\%$, que es compatible con el diagnóstico de diabetes.

Como prueba de seguimiento

Como se ha expresado, a pesar de las limitaciones analíticas de los primeros años, para la totalidad de los organismos y asociaciones del mundo relacionadas, directa o indirectamente, con el manejo de la diabetes la HbA1c, es el mejor criterio para monitorear el tratamiento instalado y en este sentido, se utilizan los siguientes criterios:

- La meta del tratamiento de la diabetes, de acuerdo con la ADA, es llevar la HbA1c a un porcentaje $\leq 7\%$ [2], con lo cual se logra reducir significativamente las complicaciones microvasculares y neuropáticas relacionadas con la diabetes. En caso de no alcanzar este porcentaje se debe revisar y ajustar el plan terapéutico del paciente.
- La meta de las guías europeas para la HbA1c es de $7,5\%$, tanto para la diabetes tipo 1 [119] como para la tipo 2 [120].
- La meta de la *International Diabetes Federation* (IDF) es de $6,5\%$ [121], valor que no parece tener mejores resultados que la meta de la ADA [2].
- La meta del *American College of Endocrinology* es $6,5\%$.
- En la **figura 8** se representan la HbA1c y la glucemia media estimada que permiten a manera de un termómetro medir el control metabólico alcanzado con tratamiento del paciente diabético.

Aspectos técnicos relacionados con la medición de la HbA1c

Determinar con qué instrumento y con qué tipo de prueba medir la HbA1c es una decisión de suma responsabilidad de parte del laboratorio clínico, máxime si se tiene en cuenta que en el mercado de los instrumentos y de las pruebas de laboratorio clínico hay una amplia gama de posibilidades; posibilidades que varían en la tecnología utilizada, el desempeño

analítico y el grado de automatización, circunstancias que tienen impacto en la calidad analítica del resultado y en el costo de la prueba. El conocimiento de los aspectos tecnológicos aquí plasmados es de vital importancia para tener pruebas confiables y aplicables a los pacientes, y por esto debe ser analizado con máximo cuidado tanto por los médicos, usuarios de las pruebas, como por los profesionales del laboratorio clínico, responsables de que las pruebas sean de óptima calidad, no las más baratas, como frecuentemente y en forma desatinada se presenta en el medio. Para alcanzar el objetivo, además de revisar los aspectos más relevantes de la tecnología disponible para hacer la prueba en los laboratorios clínicos, se analizarán los aspectos preanalíticos, analíticos y posanalíticos relacionados con la medición de la HbA1c. En el caso de la HbA1c no hay que perder de vista las recomendaciones del Comité de Expertos Internacionales y de la ADA en el sentido de que para que la prueba pueda ser utilizada como criterio de diagnóstico, debe ser realizada en un laboratorio clínico que utilice instrumentos y reactivos certificados por el NGSP y estandarizados de acuerdo con las especificaciones del DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) [1-2], además de que lleve estrictos controles de calidad tanto internos como externos, aspectos que deben ser incorporados en la práctica médica local. Hasta el momento no hay ningún laboratorio clínico certificado por el NGSP, como lo recomiendan las nuevas guías de diagnóstico de diabetes [1-2]; sin embargo, hay un laboratorio clínico privado cumpliendo con los trámites para lograr la certificación. Para obtener mayor información sobre aspectos tecnológicos, control de calidad y estandarización de la prueba puede accederse a la web del NGSP (www.ngsp.org).

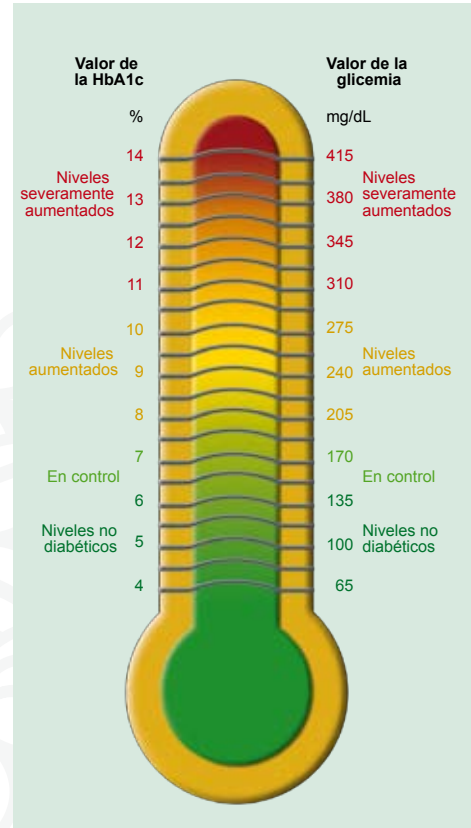


Figura 8. Termómetro del diabético. Valores equivalentes de la hemoglobina glicada y de la glicemia plasmática, y sus respectivos significados clínicos.

Metodología disponible para la determinación de la HbA1c

Desde el punto de vista de la disponibilidad que tiene el laboratorio clínico para medir la HbA1c es muy amplia: en el mercado de los instrumentos y los reactivos puede haber más de un centenar de posibilidades, posibilidades que varían considerablemente con relación a la instrumentación y al desempeño analítico. Para tener una idea, consultando en el NGSP, aparecen referenciados 88 métodos certificados por ese organismo, que dependiendo de la tecnología utilizada para la separación de la fracción glicada, de la no-glicada, tendrán mejor o peor desempeño analítico. En la práctica, definir con cual método y con qué reactivos trabajar depende de muchos factores, en donde debe primar el desempeño analítico (resultados precisos y exactos) sobre el menor precio, como infortunadamente se presenta en el medio, en donde se le da prioridad al menor costo.

En términos prácticos, los métodos para medir la hemoglobina glicada se basan en diferencias en las moléculas de la hemoglobina glicada y la hemoglobina no-glicada, ya sean

físicas, químicas o inmunológicas entre la fracción glicada, ya sea la HbA1 o sus fracciones como la HbA1c, y la fracción de la Hb0, esto es la fracción no-glicada.

Métodos basados en la diferencia de la carga eléctrica entre la hemoglobina glicada y la hemoglobina no-glicada

El principio se basa en el hecho de que la unión de glucosa en el caso de la HbA1c, o de otro azúcar, como puede ser la HbA1a o la HbA1b, a un amino terminal de las cadenas β de la HbA altera la carga total de la hemoglobina, haciendo que la fracción de hemoglobina glicada (Hb1) migre en forma diferente, usualmente más rápido, a la hemoglobina no-glicada (Hb0) cuando se pone en un campo eléctrico como sucede en los métodos electroforéticos, o en resinas de intercambio iónico como sucede en los métodos cromatográficos, permitiendo de esta manera separar las dos fracciones, como se analizará más adelante.

Métodos electroforéticos

Se basan en el hecho de que la molécula de HbA1c es diferente a la molécula de la HbA y esta característica hace que puesta la sangre en una corriente se desplace de acuerdo con sus características físico-químicas relacionadas con las cargas eléctricas. La electroforesis en el estudio de rutina de la HbA1c ha sido reemplazada por la cromatografía líquida de alta eficiencia, como se analizará más adelante.

Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se subdividen en dos grandes grupos diametralmente diferentes: la cromatografía de columna y la cromatografía líquida de alta eficiencia/eficacia.

Cromatografía de columnas

La cromatografía de columnas, también conocida como de minicolumnas, invadió los laboratorios clínicos en los años 80 porque es una prueba barata y de fácil acceso, y por esto mismo continúa disponible en el mercado latinoamericano, incluido el colombiano, usualmente en laboratorios clínicos de bajo volumen y pobre desarrollo tecnológico. Desde el punto de vista del desempeño analítico, aparte de que es dependiente del pH y la temperatura a la cual se hace la prueba, tiene problemas de calibración, baja reproducibilidad y muchas de ellas no miden la HbA1c sino la Hb1 (hemoglobina glicada total), [122], circunstancias que explicarían la gran discrepancia de los resultados de un laboratorio a otro laboratorio, razón por la cual no tiene justificación continuar con su utilización. Además, no están certificadas por el NGSP [123], como lo exigen los estándares internacionales para hacer la prueba [1-2], incluida la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) [24], situación que la ubicaría como una prueba “obsoleta”.

Cromatografía líquida de alta eficiencia

En los últimos años, los métodos basados en la cromatografía de columnas fueron sustituidos por sistemas automatizados más sólidos y entre ellos se destacan los métodos conocidos genéricamente como por cromatografía líquida de alta eficiencia o HPLC (del inglés, *High Performance Liquid Chromatography*) [124-126]. El método de cromatografía líquida de alta eficiencia de intercambio iónico fue el utilizado por el DCCT y se recomienda como un método de referencia para la determinación provisional de los organismos internacionales relacionados con la hemoglobina glicada hasta que decidan sobre el método de referencia definitivo [74, 127] y la comunidad científica relacionada con la diabetología considera a

la cromatografía líquida de alta eficiencia como el “estándar de oro” o prueba de referencia para la determinación de la HbA1c. Partiendo de la diferencia estructural que hay entre la hemoglobina glicada en general y de la HbA1c en particular, y la Hb0 es posible separar y cuantificar estas fracciones. Bajo esta premisa se tiene la cromatografía de afinidad que basada en la capacidad del ácido fenilborónico en solución alcalina de unirse con grupos cis-diol presentes en la HbA1c, que da como resultado la unión de la hemoglobina con la molécula de glucosa, con el ácido fenilborónico o sus derivados. En estos métodos, la hemoglobina glicada se une a una columna que contiene boronato en donde la fracción Hb0 es eluida primero. Este método no se afecta por el pH ni la temperatura, como tampoco se afecta por la presencia de hemoglobinopatías o falla renal por la presencia hemoglobina carbametilada, ni por la fracción lábil de la hemoglobina glicada [114, 126, 128-130], por lo cual puede ser considerado como un método de referencia para la medición de la HbA1c [74].

Estos sistemas utilizan una columna para eluir la solución en diferentes fracciones: la HbA1a, la HbA1b, la HbA1c y la HbA0, sucesivamente, utilizando diferentes tampones/búferes con diferencias en la fuerza iónica y en el pH. Estos métodos presentan una excelente precisión y permiten una separación rápida de la HbA1c. Tiene como inconveniente que el costo del equipo y su funcionamiento sólo lo pueden hacer los laboratorios grandes o instituciones de investigación; en contraposición a lo anterior, la HPLC tiene grandes ventajas con relación a los demás métodos disponibles para la medición de la HbA1c en el laboratorio clínico, como son el de que no interfiere ningún otro tipo de hemoglobinopatía (F, S, C, D, E) ni los procesos de carbamila-ción [114, 126]. En la **figura 9** se esquematiza la cromatografía líquida de alta eficiencia.

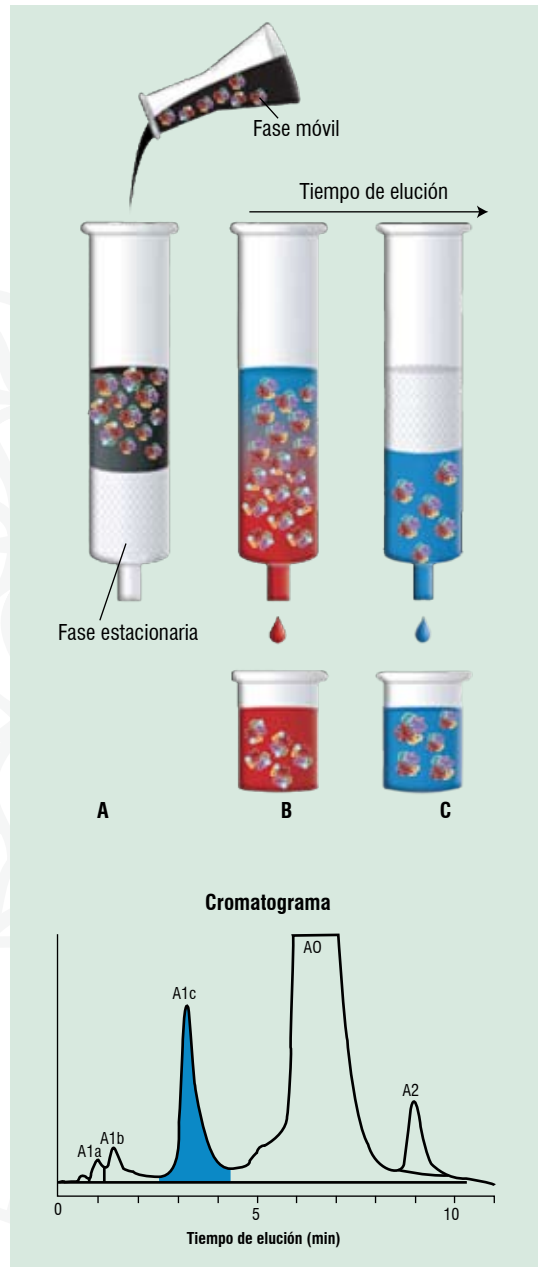


Figura 9. Determinación por cromatografía líquida de alta eficiencia de HbA1c. Para la determinación de la hemoglobina es necesario inicialmente hemolizar la muestra. Luego se mezcla con la fase móvil (búfer con pH y carga definida) y se inyecta a alta presión a través de una columna. La muestra pasa por un sistema de separación compuesto por un prefiltro y una columna que contiene la fase estacionaria. Según las características moleculares de las proteínas, fundamentalmente su masa y su carga, las diferentes moléculas de hemoglobina interactúan con la fase estacionaria, eluyendo las diferentes fracciones de manera separada, en términos de tiempo. Luego de eluir las muestras, cada pico de elución corresponde a una proteína diferente que puede ser cuantificada.

Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos utilizan anticuerpos contra una secuencia de aminoácidos que varían de 3 a 8 de la fracción N-terminal de la hemoglobina glicada. Tienen como ventaja el que son específicos contra la HbA1c y pueden ser incorporados a los autoanalizadores de química clínica ya sea por métodos de inmunoturbidimetría [131], como se esquematiza en la **figura 10**, o de inmunoanálisis enzimático [132] en donde se utiliza una proteasa para digerir la hemoglobina y producir fructosil-aminoácido que por la acción de una oxidasa produce peróxido de hidrógeno [133], como se esquematiza en la **figura 11**.

De acuerdo con los organismos internacionales relacionados con la diabetes, cuando en Estados Unidos el 60% de los laboratorios clínicos utiliza métodos inmunoquímicos, 30% cromatografía líquida de alta eficiencia y menos del 10% cromatografía de afinidad [134], los laboratorios clínicos europeos muestran una imagen en espejo en donde el 60% de los laboratorios clínicos utiliza la cromatografía líquida de alta eficiencia, 35% métodos inmunoquímicos y unos pocos cromatografía de afinidad [135]. En nuestro medio no se conoce la proporción, pero está disponible toda esta tecnología. Finalmente, antes de analizar los

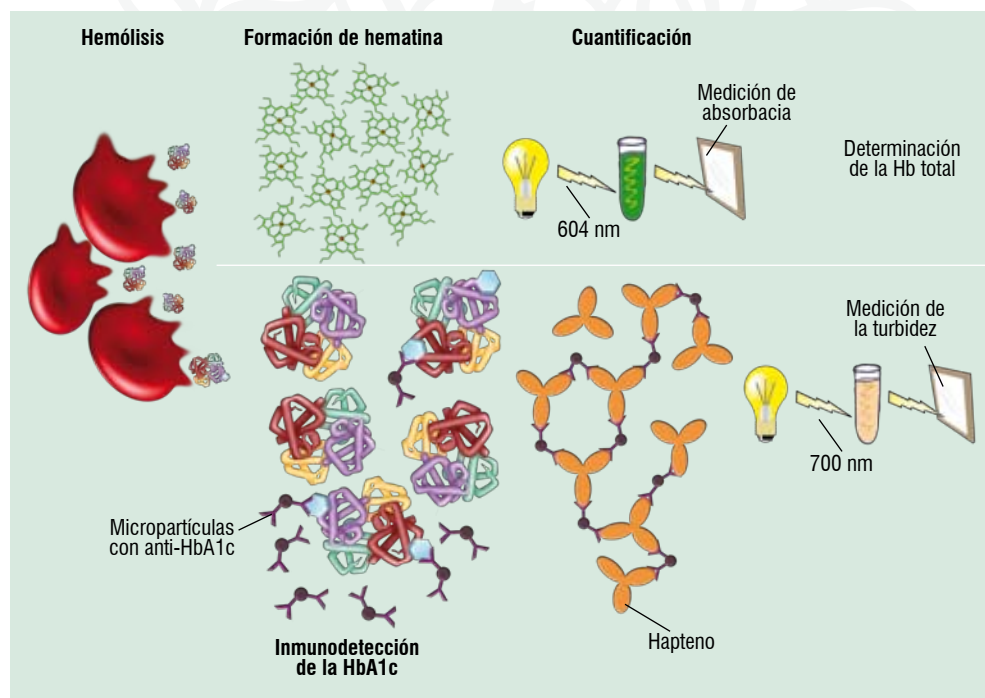


Figura 10. Determinación por inmunoturbidimetría de la HbA1c. En la determinación por esta técnica se cuantifican tanto la hemoglobina total como la HbA1c. Para la cuantificación de la hemoglobina total se hemoliza la muestra y la solución se somete a un búfer alcalino de un detergente no iónico, convirtiendo la hemoglobina en hematina y estabilizando la molécula. La hematina torna la solución de un color verde, que es cuantificado a una longitud de onda de 604 nanómetros (nm). Para la cuantificación de la HbA1c igualmente se debe hemolizar la muestra y se procede con dos pasos elementales: 1) la solución es incubada con micropartículas cubiertas con anticuerpos específicos dirigidos contra la HbA1c; en esta reacción se une un solo anticuerpo a cada sitio de glicación presente en la hemoglobina. 2) Una vez terminado este paso, se introduce en la solución un hapteno aglutinante que posee varios sitios inmunoreactivos, que unirá las micropartículas con anticuerpos que han quedado libres; en este paso se pueden unir varios anticuerpos a una sola molécula de haptenos y darse el fenómeno de aglutinación. La determinación requiere de la cuantificación de la turbidez de la suspensión a una longitud de onda de 700 nm. En este sentido a mayor aglutinación, mayor cantidad de anticuerpos libres y menor concentración de HbA1c disponible para unir las micropartículas a los anticuerpos, lo anterior como consecuencia de que la HbA1c compite con el hapteno por la unión del anticuerpo.

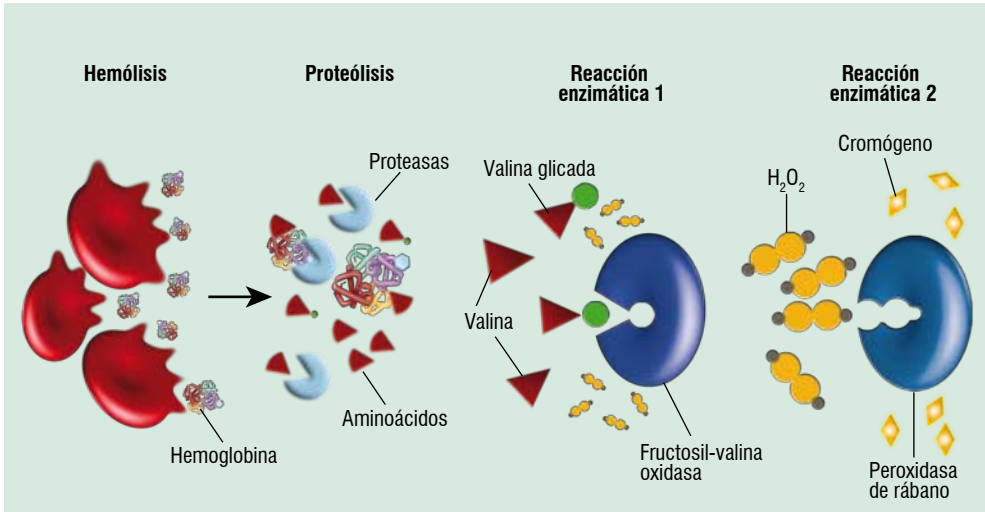


Figura 11. Determinación enzimática de la HbA1c. El principio de la prueba se puede resumir en cuatro pasos básicos: 1) hemólisis, se emplea una solución que permite la lisis de los eritrocitos y la reducción con agentes oxidantes de moléculas interferentes; 2) proteólisis, se somete la muestra a una digestión proteolítica donde las proteínas presentes en la solución, incluida la hemoglobina, liberan aminoácidos y péptidos; 3) reacción enzimática 1, la valina de la hemoglobina que está glicada, es el sustrato de la enzima específica fructosil-valina-oxidasa. En esta reacción se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2); 4) reacción enzimática 2, empleando la enzima peroxidasa de rábano se promueve la producción a partir del H_2O_2 de un cromógeno. La señal emitida por el cromógeno es cuantificada y es proporcional a la concentración de aminoácidos de valina glicosados presentes en la muestra. La determinación del porcentaje de HbA1c con esta técnica es directa y requiere de una curva estándar. Esta técnica no requiere la determinación de la concentración de la Hb total.

métodos para medir la HbA1c, es importante recordar que la glicohemoglobina es un grupo heterogéneo de moléculas formadas por reacciones no-enzimáticas de la hemoglobina con los azúcares presentes en la circulación sanguínea, y tener muy claro que los resultados de la HbA1c no son intercambiables de una metodología a otra [136].

Factores preanalíticos que afectan la medición de la HbA1c

Los factores preanalíticos corresponden a los aspectos relacionados con la secuencia de acontecimientos que tienen lugar antes de que la muestra sea sometida al proceso de análisis propiamente dicho [137-138]. Los factores preanalíticos van desde que el médico, tras una sospecha clínica, solicita la prueba, hasta que la muestra es sometida a análisis en el laboratorio clínico [139]. Actualmente, la fase preanalítica se considera como la fase más crítica de una prueba, ya que es en ella en donde más errores se producen en el laboratorio clínico y en donde se generan los mayores costos de no-calidad (errores) [137, 140-141], y la medición de la HbA1c no es la excepción [142]. Los factores preanalíticos pueden estar relacionados con el paciente, incluida su relación con el médico que solicita la prueba, o con el laboratorio clínico, como se analizará a continuación.

Factores preanalíticos relacionados con el paciente

Para efectos prácticos, el sexo, la raza, la dieta o la estación del año no influyen significativamente los resultados de la HbA1c [139]. Los efectos de la edad sobre la HbA1c son controvertidos, ya que algunos estudios antiguos mostraban un incremento de aproximadamente un 0,1% por década a partir de los 30 años en personas sanas, situación que podría explicarse por el aumento de la glucemia en ayunas y la disminución de la tolerancia a la glucosa que se observa con la edad, o también pudiera ser debida a la disminución en el recambio de

eritrocitos, como resultado de la reducción de la tasa metabólica asociada con el envejecimiento. Sin embargo, otros estudios más recientes con selección de controles sanos, mediante pruebas de tolerancia a la glucosa oral, no han demostrado que la edad afecte los niveles de HbA1c [143]. La variabilidad biológica intraindividual de la HbA1c oscila alrededor del 2% [144-145] y este es un factor preanalítico importante que explica variaciones mínimas en el resultado de la prueba en un mismo individuo realizadas en el mismo laboratorio clínico. Los factores preanalíticos, algunos de ellos íntimamente relacionados con factores analíticos, pueden dar origen a resultados falsos, con disminución o aumento de la HbA1c, como se analizará en los próximos dos subtítulos.

Disminución espuria de la HbA1c

Cualquier condición clínica que acorte la supervivencia de los eritrocitos o disminuya su vida media (hemorragia aguda, hemólisis, anemia ferropénica, transfusión sanguínea) puede dar resultados falsamente más bajos de la HbA1c [146], situación que se presenta aun en individuos no-diabéticos [147]. Numerosas hemoglobinopatías pueden influenciar el resultado de la HbA1c [148]; entre ellas, la forma homocigota de las hemoglobinopatías S y C, en donde no hay cadenas β y en algunas hemoglobinopatías, como la Hb Raleigh, que pueden interferir con la glicación de la hemoglobina, dando como resultado un valor inferior al que correspondería con los niveles promedio de glucosa sanguínea del paciente afectado [148-149]. Vale la pena anotar que la HPLC no tiene interferencia con las hemoglobinopatías anotadas [150], además de que permite identificarlas cuando existen mediante el cuidado análisis del cromatograma. También se puede presentar disminución espuria de la HbA1c en los pacientes con esferocitosis hereditaria [151], explicable por la disminución de la vida media de los eritrocitos [152]. La hemoglobina fetal (HbF) por debajo de 5% no afecta la medición de la HbA1c, pero si está por encima de 5% puede causar disminución espuria de la HbA1c [148, 153]; además, el aumento de la HbF se puede presentar en pacientes que reciben hidroxiurea, ya sea en el manejo de algunas hemoglobinopatías y en ciertas hematoopatías malignas [154].

La presencia de metahemoglobina puede acarrear resultados anormales con algunos métodos [155], en tanto que la ingestión crónica de aspirina y altas dosis de vitamina C y vitamina E, así como de otros antioxidantes, puede reducir la glicación y en consecuencia, el porcentaje de HbA1c [156-161], circunstancias que el médico debe conocer al momento de solicitar e interpretar la prueba [139, 162]. Además de los medicamentos antes citados, la HbA1c se puede reducir falsamente cuando se está bajo tratamiento con antirretrovirales [163] o se padece hipertrigliceridemia [164].

Aumento espurio de la HbA1c

La HbA1c puede estar falsamente elevada en los casos en donde la vida media de los eritrocitos puede "alargarse", como sucede cuando hay eritropoyesis disminuida; por ejemplo en la deficiencia de vitamina B12, en la deficiencia de hierro [147, 165] y, muy particularmente, en mujeres embarazadas con deficiencia de hierro concomitante [166]. También puede estar falsamente elevada en pacientes alcohólicos [167], en pacientes que reciben eritropoyetina [168] y en individuos consumidores crónicos de opiáceos [156] y otras drogas de abuso [169] como una evidencia de los estados hiperglucémicos relacionados con estas sustancias. Además de las causas antes citadas, la HbA1c puede estar falsamente elevada en pacientes con falla renal crónica por un aumento de la glicación, y en consecuencia, del porcentaje de la HbA1c [170-171]. Igualmente con la hiperbilirrubinemia [172] y la ingestión crónica de alcohol [173], debido a la formación de acetaldehído que aumenta artificialmente el porcentaje de HbA1c [174-175]. Otra condición médica en donde se puede elevar en forma espuria la

HbA1c es en pacientes con esplenectomía, situación que se presenta como resultado del aumento de la supervivencia de los eritrocitos [176], derivada de la falta de control esplénico sobre los eritrocitos envejecidos que no son removidos de la circulación sanguínea.

De éstas, la Hb-carbamilada es la más prevalente, corresponde a una forma estable que aparece en pacientes hiperurémicos debido a una reacción química entre el ácido isocianúrico producido en la disociación espontánea *in vivo* de la urea y el extremo N-terminal valina de la cadena β de la hemoglobina. Su concentración es proporcional a la concentración de urea del paciente [177], pudiendo alcanzar hasta el 3% de la concentración total de hemoglobina. Su punto isoelectrónico es similar al de la HbA1c por lo que puede interferir en los analizadores HPLC que no la detectan incrementando falsamente los niveles de HbA1c sobre todo cuando su concentración es superior al 2% [148]. La Hb-carbamilada interfiere significativamente con los análisis basados en la cromatografía líquida de alta eficiencia de intercambio iónico, situación que no se presenta con la hplc Affinity binding/ y con pruebas enzimáticas [178], situación particularmente grave cuando en la población objeto de los estudios hay pacientes con falla renal, como realmente acontece.

Otra situación se presenta cuando hay altas concentraciones de Hb-acetilada que puede aparecer en mutaciones raras del extremo N-terminal de la cadena β favoreciendo la formación de Hb-acetilada *in vivo*. También han sido descritos porcentajes relativamente altos en mujeres embarazadas no diabéticas (1.9 %), en individuos alcohólicos (2,7%) y tras la ingestión de ácido acetilsalicílico [177].

Factores preanalíticos relacionados con el laboratorio clínico

Como se ha expresado, a pesar de que la prueba no se afecta significativamente por la falta de ayuno, es preferible que la muestra se tome al paciente en ayunas y así estandarizar mejor la prueba y evitar resultados espurios derivados de la turbidez de la muestra, en relación con estados de dislipidemia relativamente frecuente en pacientes diabéticos [164]. La estabilidad de la muestra, tomada con EDTA (como anticoagulante) y conservada a 4°C, es de una semana [139].

Factores analíticos que afectan la medición de la HbA1c

Los factores analíticos son los aspectos relacionados con la secuencia de acontecimientos que tienen lugar en el proceso de la prueba, esto es, inmediatamente después de las variaciones preanalíticas e inmediatamente antes de las posanalíticas. En el caso de la medición de la HbA1c, los factores analíticos están relacionados con la instrumentación y los reactivos utilizados y los controles internos y externos de calidad, factores que en otras palabras, marcan las diferencias de un laboratorio clínico a otro. En este punto es importante que el laboratorio clínico que haga determinaciones de HbA1c cumpla a cabalidad las recomendaciones expedidas por los organismos reguladores de la diabetología, en donde garantice que utiliza instrumentos y reactivos certificados por el NGSP y un método estandarizado de acuerdo con el DCCT [1-2]. En el mercado del laboratorio clínico hay desde instrumentos manuales para aquellos laboratorios clínicos de baja tecnología y bajo volumen, hasta grandes equipos con alta tecnología y con capacidad para grandes volúmenes, como los que se presentan en los laboratorios clínicos de alta tecnología y alto volumen; lo importante es que estos instrumentos estén certificados de acuerdo con las normas citadas, se mantengan bien calibrados y se les tenga programas de calidad internos y externos. En relación al control de los factores analíticos es muy importante que los laboratorios clínicos tomen acciones preventivas y correctivas orientadas a mejorar el desempeño de la prueba y en la medida de sus posibilidades y a la mayor brevedad posible, migre a metodologías certificadas [123].

Factores posanalíticos relacionados con la medición de la HbA1c

Los factores posanalíticos son los aspectos relacionados con la interpretación de la prueba y la aplicación de los resultados al paciente [138]. Dentro de los factores posanalíticos se incluyen la transcripción de errores, los reportes incompletos y la interpretación inapropiada de los resultados, que tienen consecuencias adversas sobre la credibilidad del laboratorio y más importante aún, sobre el paciente. Para nada serviría que el laboratorio clínico ajustase los factores preanalíticos y analíticos, con aumento de costos directos e indirectos sobre la prueba, si la prueba no es interpretada en un contexto clínico y los resultados no son aplicados a la toma de decisiones con respecto al paciente objeto del estudio.

El laboratorio en el diagnóstico de la diabetes

Hasta principios del siglo XX, la única forma de establecer el diagnóstico de diabetes mellitus que poseía el médico era la clínica. La fundamentación del diagnóstico en pruebas de laboratorio la iniciaron, a finales de la década de los 50, Fajans y Conn, cuando para el estudio de la diabetes, en individuos sanos o con antecedentes familiares de diabetes, introdujeron la que en esa época denominaron curva de tolerancia a la glucosa después de administrar una carga de glucosa [179] y fue así como por muchos años el diagnóstico de la diabetes se fundamentó en los resultados de la glucemia a los 60, 90 y 120 minutos después de una carga oral de glucosa. A mediados de la década de los 70, Bennett y colaboradores observaron que en los indios Pima, una población con alta prevalencia de diabetes, las concentraciones de la glucemia tenían una distribución bimodal; es decir, dos distribuciones en forma de campana, las cuales se superponen [180-182]. La distribución en forma de campana inferior representaba las glucemias en la población no diabética, en tanto que la campana superior representaba las glucemias de la población diabética [180]. El *National Diabetes Data Group*, en 1979, buscó la concentración de glucemia que claramente pudiera diferenciar las dos poblaciones superpuestas, para establecer los criterios de diabetes para la glucemia basal (en ayunas) y la glucemia a las dos horas poscarga de glucosa [183], y se estableció como criterio diagnóstico de diabetes una glucemia en ayunas ≥ 140 mg/dL o una glucemia a las dos horas después de una carga de 75 g de glucosa con valores ≥ 200 mg/dL. También se clasificó entonces un nuevo grupo de pacientes que tenían “deterioro de la tolerancia a la glucosa”, si presentaban concentraciones de glucemia en ayunas ≤ 140 mg/dL y una glucemia a las dos horas poscarga entre 140 md/dL y 200 mg/dL [183]. En 1997, el *Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus* reevaluó estos valores, teniendo en cuenta la relación entre la glucemia y la presencia de complicaciones a largo plazo, específicamente la retinopatía diabética, para redefinir los valores de la glucosa en ayunas que se asociaran con un riesgo aumentado de retinopatía diabética. El Comité recomendó disminuir la glucemia en ayunas, como criterio de diagnóstico de diabetes, a un valor ≥ 126 mg/dL. Adicionalmente, recomendó que el diagnóstico de diabetes se hiciera sólo con base en el valor de la glucemia en ayunas, ya que esta prueba era más conveniente para los pacientes, menos costosa y con mayor reproducibilidad que la glucemia a las dos horas poscarga. Los criterios de aplicación de la HbA1c en el contexto de la diabetes varían de acuerdo al momento del paciente: si se usa para diagnóstico o para monitoreo del paciente con diagnóstico de diabetes.

La HbA1c en el diagnóstico de la diabetes

Como se ha expresado en múltiples oportunidades a través de este módulo, el diagnóstico y el manejo de la diabetes se fundamentan en el laboratorio clínico, de ahí la importancia y la responsabilidad que éste tiene en el contexto del manejo de la epidemia. De acuerdo con

la más reciente revisión de los “Estándares de Cuidado Médico en Diabetes” correspondiente al año 2010, que incorporó la HbA1c como el primer criterio de diagnóstico de la diabetes [2], dando cumplimiento a la recomendación del Comité Internacional de Expertos (*International Expert Committee*) para su introducción como prueba de diagnóstico de la diabetes en 2009 [1], los criterios de diagnóstico de la diabetes se modificaron sustancialmente, como se reproduce en la **tabla 3** [2], criterios y condiciones a los cuales se deben ajustar los médicos y los laboratorios clínicos que manejen pacientes con diabetes.

Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de diabetes [2]

1. HbA1c $\geq 6,5\%$. La prueba se debe realizar por un método certificado por el NGSP y estar estandarizado de acuerdo con el DCCT*

O

2. Glicemia ≥ 126 mg/dL después de un ayuno de 8 horas*

O

3. Glicemia 2 horas poscarga con 75 g de glucosa ≥ 200 mg/dL durante una prueba de tolerancia a la glucosa. La prueba se debe hacer como lo establece la Organización Mundial de la Salud, utilizando 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua*

O

4. En pacientes con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglicémica: una glicemia al azar, en cualquier momento sin estar en ayunas, ≥ 200 mg/dL

* En ausencia inequívoca de hiperglicemia, los puntos 1-3 se deben confirmar repitiendo la prueba

Con relación a la utilización de la HbA1c como criterio de diagnóstico de la diabetes, es importante enfatizar algunos aspectos, tales como:

- Para que la prueba pueda ser utilizada como criterio de diagnóstico, se debe realizar en un laboratorio clínico que utilice instrumentos y reactivos certificados por el NGSP y estandarizado de acuerdo con las especificaciones del DCCT [1-2].
- De acuerdo con la ADA y con la mayoría de las organizaciones y autores reconocidos en el manejo de la prueba, la HbA1c se debe realizar en el laboratorio clínico convencional, no siendo aceptada la tecnología conocida como “*point-of-care instruments*” [1-2, 142, 184], como los que se usan en el monitoreo de la glucosa en casa, debido a que estos instrumentos y reactivos aún no tienen suficiente desempeño analítico [2, 185];
- La incorporación de la HbA1c como criterio de diagnóstico de la diabetes no excluye el uso de los criterios convencionales basados en la glucemia, como la glucemia en ayunas, la glucemia poscarga de glucosa y la glucemia en cualquier momento en individuos con síntomas de diabetes [2], particularmente aplicable en donde no se dispone de tecnología para la HbA1c, o las mediciones que se tienen no son confiables desde el punto de vista analítico [2, 186];
- La HbA1c puede ser utilizada como criterio de diagnóstico tanto de la diabetes tipo 1 como de la diabetes tipo 2 [2, 187];
- La HbA1c no se acepta como prueba de diagnóstico de la diabetes gestacional, en donde la ADA recomienda mantener las pruebas convencionales [2, 142];
- Para confirmar un resultado positivo, particularmente por la trascendencia del diagnóstico y las implicaciones que éste tiene tanto en el paciente como en su entorno, la prueba debe ser repetida en un día diferente [2]; y, finalmente,

- Quizás, lo más importante, que el laboratorio clínico que haga la prueba garantice que lleva estrictos controles de calidad que le permitan tener resultados con índices de variabilidad intralaboratorio menores de 2% e interlaboratorio menores de 3%, como claramente lo establecen las guías y recomendaciones sobre el laboratorio clínico en el diagnóstico y manejo de la diabetes [139], idealmente participando en programas de calidad internacionales como los que se llevan con el Colegio Americano de Patología (CAP) [114] y, sobre todo, dando cumplimiento a las condiciones establecidas por los organismos internacionales como utilizar un método y una instrumentación certificados por el NGSP y estandarizados de acuerdo con las especificaciones del DCCT [2], y con un método de referencia internacional, de acuerdo con la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) [106].

La HbA1c en el monitoreo de la diabetes

A partir del momento en que se dispuso de metodología para medir en el laboratorio clínico la HbA1c a finales de la década de los 70 [7-10], unos años más adelante, luego de que grandes estudios poblacionales demostraron su relación con el control de la diabetes tipo 1 [3] y de la diabetes tipo 2 [4] y, más recientemente, gracias a la estandarización y la armonización alrededor de los instrumentos y los reactivos para hacer la prueba en los últimos 5 años [109, 188], la HbA1c se ha consolidado como el “estandar de oro” para medir el efecto de las diferentes opciones de tratamiento y de pronóstico y, sobre todo, la mejor manera de seguir el curso del paciente diabético y hacer los ajustes terapéuticos del día a día en estos pacientes [189-194].

La determinación periódica de la HbA1c está ampliamente incorporada a la práctica médica para evaluar el control de la glucemia a largo plazo, ya que como se mencionó, mide la concentración acumulada a lo largo de la vida del eritrocito, esto es por 120 días [195], y hay consenso en calificar a la prueba como el mejor indicador en el control del diabético y como la mejor manera para prevenir o retrasar el desarrollo de las complicaciones derivadas de la hiperglucemia en el paciente con diagnóstico de diabetes [3-4, 194, 196]. Se considera que la reducción de 1% en el valor de la HbA1c produce un descenso del 14% en la aparición de un infarto de miocardio, y una reducción en la mortalidad global del % [5], como se representa en la **figura 7** [5].

Con relación a la utilización de la HbA1c como criterio de seguimiento y manejo de la diabetes, es importante ratificar algunos aspectos, tales como:

- Que para que la prueba pueda ser utilizada como herramienta de seguimiento y manejo, similar a su utilización como criterio de diagnóstico, la prueba se debe realizar en un laboratorio clínico que utilice instrumentos y reactivos certificados por el NGSP y estandarizados con las especificaciones del DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*) [1-2].
- Que de acuerdo con la ADA y con la mayoría de los organismos y los autores reconocidos en el manejo de la prueba, ésta se debe realizar en el laboratorio clínico convencional, no siendo reconocida la tecnología conocida como “*point-of-care instruments*” hasta el momento [1-2, 142, 184], como los que se usan en el monitoreo de la glucosa en casa, debido a que aún estos instrumentos y reactivos no tienen suficiente desempeño analítico [185];
- La frecuencia con la cual se debe medir la HbA1c depende de la evolución del paciente, y en este caso, la ADA recomienda:

- La frecuencia recomendada para medir la HbA1c a los pacientes con diabetes es de cada 3 a 6 meses en pacientes con enfermedad estable y sin cambios en el esquema de tratamiento [14].
- Medir la HbA1c cada 3 meses en los pacientes en quienes se hagan cambios en el manejo terapéutico o en los cuales no se alcance un nivel de glucemia determinado.
- Los objetivos de los indicadores de laboratorio se deben individualizar, a pesar de que la mayoría de los organismos considera una buena meta para los pacientes con diabetes tipo 2, una HbA1c menor a 7% para reducir el riesgo de complicaciones microvasculares [4, 15] y complicaciones macrovasculares [5].
- La meta de las guías europeas para la hba1 es de 7,5%, tanto para la diabetes tipo 1 [119] como para la tipo 2 [120].
- Para lograr una HbA1c menor a 7%, los pacientes con diabetes tipo 2 deberían tratar de lograr una glucemia plasmática en ayunas o una glucemia plasmática preprandial entre 72 mg/dL y 126 mg/dL, y una glucemia posprandial a las dos horas entre 90 mg/dL y 180 mg/dL [4-5].
- Si puede lograrse de manera segura, se debe tratar de disminuir los niveles de glucemia plasmática hacia el rango normal [197] (HbA1c menor a 6%; glucemia en ayunas o preprandial entre 72 mg/dL y 108 mg/dL); situación que ha sido cuestionada en los estudios ACCORD (*The Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) y ADVANCE (*Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and Diamicron Modified Release Controlled Evaluation*), al menos en lo que se relaciona con las enfermedades cardiovasculares asociadas con la diabetes [198].

Conclusiones

La humanidad enfrenta una epidemia de diabetes. La medición de la HbA1c es el eje central del control de los pacientes con diabetes, debido a que con base en estos valores se han establecido las metas para el control y tratamiento de los pacientes con esta enfermedad y el control de las complicaciones a mediano y largo plazo. Además, gracias a los procesos de estandarización y armonización de la prueba, a partir del presente año (2010) la ADA la incorporó como el primer criterio de diagnóstico de diabetes en población sana como prueba de tamizaje y en pacientes con antecedentes familiares o sintomatología compatible con este diagnóstico. La comunidad médica debe familiarizarse con el manejo de la prueba, siguiendo las guías que las organizaciones internacionales y regionales han establecido claramente para el manejo de la prueba, y los laboratorios clínicos deben hacer los cambios para alcanzar las metas de desempeño analítico que los mismos han establecido participando activamente en programas de calidad a nivel nacional e internacional para cumplir el requerimiento de los organismos internacionales, como es la instrumentación y los materiales utilizados certificados por el NGSP (*National Glycohemoglobin Standardization Program*) y estandarizados de acuerdo con las especificaciones del DCCT (*Diabetes Control and Complications Trial*). El uso de la HbA1c en el diagnóstico y manejo de la diabetes es costoso, pero se lograría una reducción significativa de la morbilidad y mortalidad asociada con esta enfermedad pero, para alcanzar estos objetivos es indispensable afinar las herramientas que como la HbA1c han demostrado a la sociedad su bondad.

Abstract: Humanity is facing a diabetes epidemic with uncontrolled progress. According to the World Health Organization, the world's diabetic population has risen from 30 million in 1985, to 220 million in 2009, and is expected that by 2030 this figure will reach 336 million. Diabetes is defined as hyperglycemia that over the years is manifested by to multiple organ failure, being the primary cause of blindness, kidney failure and amputations in adults, and a major cause of heart disease and thrombosis. Since its discovery, hemoglobin A1C (HbA1c) has been the most accurate indicator for monitoring diabetic patients and due to its standardization in recent years, the American Diabetes Association (ADA) recently has incorporated it as the first diagnostic criteria for asymptomatic diabetes or when the disease is suspected. The ADA has defined three cutoff points for HbA1c: $\leq 5.6\%$, non-diabetic level; between 5.7% and 6.4% , pre-diabetic level; and $\geq 6.5\%$, compatible with the diagnosis of diabetes. Similarly, the ADA maintains as the goal in treated patients an $\text{HbA1c} \leq 7\%$. Furthermore, the ADA emphasizes on the need for these test to be made in a clinical laboratory with instruments and reagents certified by the NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) and standardized according to the specifications of the DCCT (Diabetes Control and Complications Trial). The module analyzes clinical and epidemiological aspects of diabetes mellitus and historical aspects of the assay, the bases of glycation as a non-enzymatic biochemical phenomenon, the available methods, and the pre-analytical, analytical and post-analytic factors that could affect the assay, and that both the physician and the clinical laboratory should be aware when requesting or running a test, respectively.

Keywords: diabetes, glycated hemoglobin, HbA1c, diagnosis and management of diabetes, methods for measuring HbA1c, pre-analytical factors, analytical factors, post-analytic factors.

Campuzano-Maya G, Latorre-Sierra G. HbA1c in the diagnosis and management of diabetes. *Medicina & Laboratorio* 2010; 16: 211-241.

Module 1 (Clinic and laboratory), number 80. Editora Médica Colombiana S.A., 2010®.

Received on June 5, 2010; accepted on June 22, 2010.

Bibliografía

1. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 1327-1334.
2. Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care* 2010;33 Suppl 1: S11-61.
3. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
4. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet* 1998; 352: 837-853.
5. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ* 2000; 321: 405-412.
6. Cheung N, Mitchell P, Wong TY. Diabetic retinopathy. *Lancet* 2010; 376: 124-136.
7. Gonen B, Rubenstein A, Rochman H, Tanega SP, Horwitz DL. Haemoglobin A1: An indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet* 1977; 2: 734-737.
8. Davis JE, McDonald JM, Jarett L. A high-performance liquid chromatography method for hemoglobin A1c. *Diabetes* 1978; 27: 102-107.
9. Beccaria L, Chiumello G, Gianazza E, Luppis B, Righetti PG. Hemoglobin A1C separation by isoelectric focusing. *Am J Hematol* 1978; 4: 367-374.
10. Poynard JP, Malgrange D, Couchot J, Caron J, Leutenegger M, Maquart FX, et al. Dosage

par micromethode de l'hémoglobine A1c chez les diabetiques. Premiers resultats. *Nouv Presse Med* 1978; 7: 1648-1649.

11. Effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the Diabetes Control and Complications Trial. *Am J Cardiol* 1995; 75: 894-903.
12. **Turner RC.** The U.K. Prospective Diabetes Study. A review. *Diabetes Care* 1998; 21 Suppl 3: C35-38.
13. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2000; 23 Suppl 1: S32-42.
14. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28 Suppl 1: S4-S36.
15. Standards of medical care in diabetes-2007. *Diabetes Care* 2007; 30 Suppl 1: S4-S41.
16. Standards of medical care in diabetes--2008. *Diabetes Care* 2008; 31 Suppl 1: S12-54.
17. Standards of medical care in diabetes--2009. *Diabetes Care* 2009; 32 Suppl 1: S13-61.
18. **Harris SB, Lank CN.** Recommendations from the Canadian Diabetes Association. 2003 guidelines for prevention and management of diabetes and related cardiovascular risk factors. *Can Fam Physician* 2004; 50: 425-433.
19. **Bhattacharyya OK, Shah BR, Booth GL.** Management of cardiovascular disease in patients with diabetes: the 2008 Canadian Diabetes Association guidelines. *CMAJ* 2008; 179: 920-926.
20. **Holt RI, Jacklin PB, Round JA, Mugglestone MA, Hughes RG.** Gestational diabetes mellitus: NICE for the U.S.? A comparison of the American Diabetes Association and the American College of Obstetricians and Gynecologists Guidelines With the U.K. National Institute for Health and clinical excellence guidelines: response to Simmons et al. *Diabetes Care* 2010; 33: e46-47; author reply e48.
21. **Nelson RG, Tuttle KR.** The new KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and CKD. *Blood Purif* 2007; 25: 112-114.
22. **Sheehy AM, Flood GE, Tuan WJ, Liou JI, Coursin DB, Smith MA.** Analysis of guidelines for screening diabetes mellitus in an ambulatory population. *Mayo Clin Proc* 2010; 85: 27-35.
23. **Ryden L, Standl E, Bartnik M, Van den Berghe G, Betteridge J, de Boer MJ, et al.** Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: executive summary. The Task Force on Diabetes and Cardiovascular Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Eur Heart J* 2007; 28: 88-136.
24. **Asociación Latinoamericana de Diabetes.** Guías ALAD de diagnóstico, control y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 2007.
25. **Dyck R, Osgood N, Lin TH, Gao A, Stang MR.** Epidemiology of diabetes mellitus among First Nations and non-First Nations adults. *CMAJ* 2010; 182: 249-256.
26. **Cowie CC, Rust KF, Ford ES, Eberhardt MS, Byrd-Holt DD, Li C, et al.** Full accounting of diabetes and pre-diabetes in the U.S. population in 1988-1994 and 2005-2006. *Diabetes Care* 2009; 32: 287-294.
27. **Li C, Ford ES, Zhao G, Mokdad AH.** Prevalence of pre-diabetes and its association with clustering of cardiometabolic risk factors and hyperinsulinemia among U.S. adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2006. *Diabetes Care* 2009; 32: 342-347.
28. **Ramlo-Halsted BA, Edelman SV.** The natural history of type 2 diabetes. Implications for clinical practice. *Prim Care* 1999; 26: 771-789.
29. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33 Suppl 1: S62-69.
30. **Smyth S, Heron A.** Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nature Medicine* 2005; 12: 75-80.
31. **King H, Aubert RE, Herman WH.** Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
32. **Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.** Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047-1053.
33. **Hildebrand P, Beglinger C.** Nondispersive infrared spectrometry: a new method for the detection of *Helicobacter pylori* infection with the 13C-urea breath test. *Clin Infect Dis* 1997; 25: 1003-1005.
34. <http://www.idf.org/fact-sheet-impaired-glucose-tolerance-igt>.
35. **Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW.** Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care* 1992; 15: 815-819.
36. **Young TK, Mustard CA.** Undiagnosed diabetes: does it matter? *CMAJ* 2001; 164: 24-28.
37. **Wee CC, Hamel MB, Huang A, Davis RB, Mittelman MA, McCarthy EP.** Obesity and undiagnosed diabetes in the U.S. *Diabetes Care* 2008; 31: 1813-1815.

38. **Hernandez-Mijares A, Sola-Izquierdo E, Ballester-Mecho F, Mari-Herrero MT, Gilbert-Moles JV, Gimeno-Clemente N, et al.** Obesity and overweight prevalences in rural and urban populations in East Spain and its association with undiagnosed hypertension and Diabetes Mellitus: a cross-sectional population-based survey. *BMC Res Notes* 2009; 2: 151.
39. **Sayer AA, Dennison EM, Syddall HE, Gilbody HJ, Phillips DI, Cooper C.** Type 2 diabetes, muscle strength, and impaired physical function: the tip of the iceberg? *Diabetes Care* 2005; 28: 2541-2542.
40. **Wright PR, Lawrence SM, Campbell DA, Colman PG.** Retrospective data for diabetic foot complications: only the tip of the iceberg? *Intern Med J* 2006; 36: 197-199.
41. **Keegan MT, Goldberg ME, Torjman MC, Coursin DB.** Perioperative and critical illness dysglycemia--controlling the iceberg. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 1288-1291.
42. **Andrade F.** Estimating diabetes and diabetes-free life expectancy in Mexico and seven major cities in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 2009; 26: 9-16.
43. **Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS, et al.** Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1C criteria in the U.S. population in 1988-2006. *Diabetes Care* 2010; 33: 562-568.
44. **Harris MI.** Undiagnosed NIDDM: clinical and public health issues. *Diabetes Care* 1993; 16: 642-652.
45. **Mooy JM, Grootenhuys PA, de Vries H, Valkenburg HA, Bouter LM, Kostense PJ, et al.** Prevalence and determinants of glucose intolerance in a Dutch caucasian population. The Hoorn Study. *Diabetes Care* 1995; 18: 1270-1273.
46. **Hadaegh F, Bozorgmanesh MR, Ghasemi A, Harati H, Saadat N, Azizi F.** High prevalence of undiagnosed diabetes and abnormal glucose tolerance in the Iranian urban population: Tehran Lipid and Glucose Study. *BMC Public Health* 2008; 8: 176.
47. **Cases A.** Enfermedad macro y microvascular en la diabetes mellitus tipo 2. *Nefrologia* 2002; 22: 406-411.
48. **King KD.** Microvascular and macrovascular complications of diabetes mellitus. *Am J Pharm Educ* 2005; 69: 1-10.
49. **Donaghue KC, Chiarelli F, Trotta D, Allgrove J, Dahl-Jorgensen K.** Microvascular and macrovascular complications associated with diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes* 2009; 10 Suppl 12: 195-203.
50. **Aiello LP, Gardner TW, King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL, 3rd, et al.** Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 1998; 21: 143-156.
51. **Frank RN.** Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 2004; 350: 48-58.
52. **Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P.** Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002; 346: 1145-1151.
53. **Shlipak M.** Diabetic nephropathy. *Clin Evid (Online)* 2009; 2009.
54. **Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar AP, Thomazelli FC, Matos JD, Canani LH.** Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* 2009; 1: 10.
55. **Joseph AJ, Friedman EA.** Diabetic nephropathy in the elderly. *Clin Geriatr Med* 2009; 25: 373-389.
56. **Johannesson A, Larsson GU, Ramstrand N, Turkiewicz A, Wirehn AB, Atroschi I.** Incidence of lower-limb amputation in the diabetic and nondiabetic general population: a 10-year population-based cohort study of initial unilateral and contralateral amputations and reamputations. *Diabetes Care* 2009; 32: 275-280.
57. **Said G.** Diabetic neuropathy-a review. *Nat Clin Pract Neurol* 2007; 3: 331-340.
58. **Bloomgarden ZT.** Diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 2008; 31: 616-621.
59. **Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL.** Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 2008; 120: 1-34.
60. **Vinik AI, Strotmeyer ES, Nakave AA, Patel CV.** Diabetic neuropathy in older adults. *Clin Geriatr Med* 2008; 24: 407-435, v.
61. **Mahmood D, Singh BK, Akhtar M.** Diabetic neuropathy: therapies on the horizon. *J Pharm Pharmacol* 2009; 61: 1137-1145.
62. **Bekler HI, Ertav A.** Preclinical symptoms of the diabetic foot. *J Am Podiatr Med Assoc* 2009; 99: 114-120.
63. **Wukich DK.** Current concepts review: diabetic foot ulcers. *Foot Ankle Int* 2010; 31: 460-467.
64. **Sanjeev Kumar G, Panda S, Surya Kumar S.** The etiopathogenesis of the diabetic foot: an unrelenting epidemic. *Int J Low Extrem Wounds* 2010; 9: 127-131.
65. **Adeniyi AF, Adeleye JO, Adeniyi CY.** Diabetes, sexual dysfunction and therapeutic exercise: a 20 year review. *Curr Diabetes Rev* 2010; 6: 201-206.

66. **Ziaei-Rad M, Vahdaninia M, Montazeri A.** Sexual dysfunctions in patients with diabetes: a study from Iran. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 50.
67. **Lorenzi M.** Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diabetes Metab Rev* 1992; 8: 85-103.
68. **Carnethon MR, Biggs ML, Barzilay J, Kuller LH, Mozaffarian D, Mukamal K, et al.** Diabetes and coronary heart disease as risk factors for mortality in older adults. *Am J Med* 2010; 123: 556 e551-559.
69. **Colwell JA.** Vascular thrombosis in type II diabetes mellitus. *Diabetes* 1993; 42: 8-11.
70. **Roberts JD, Oudit GY, Fitchett DH.** Acute coronary thrombosis in a patient with diabetes and severe hyperglycemia. *Can J Cardiol* 2009; 25: e217-219.
71. **Hu G, Sarti C, Jousilahti P, Peltonen M, Qiao Q, Antikainen R, et al.** The impact of history of hypertension and type 2 diabetes at baseline on the incidence of stroke and stroke mortality. *Stroke* 2005; 36: 2538-2543.
72. **Stern MP.** Diabetes and cardiovascular disease. The "common soil" hypothesis. *Diabetes* 1995; 44: 369-374.
73. **Fore WW.** Noninsulin-dependent diabetes mellitus. The prevention of complications. *Med Clin North Am* 1995; 79: 287-298.
74. **Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al.** Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 78-89.
75. **Jenkins M, Ratnaik S.** Capillary electrophoresis of hemoglobin. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 747-754.
76. **Saxena S, Mitchell P, Rohtchina E.** Five-year incidence of cataract in older persons with diabetes and pre-diabetes. *Ophthalmic Epidemiol* 2004; 11: 271-277.
77. **Koga M, Kasayama S.** Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J* 2010.
78. **Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, Little R, England J, Peterson CM.** What is hemoglobin A1c? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. *Clin Chem* 1998; 44: 1951-1958.
79. **Inaba M, Okuno S, Kumeda Y, Yamada S, Imanishi Y, Tabata T, et al.** Glycated albumin is a better glycemic indicator than glycated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effect of anemia and erythropoietin injection. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 896-903.
80. **Lu L, Pu LJ, Xu XW, Zhang Q, Zhang RY, Zhang JS, et al.** Association of serum levels of glycated albumin, C-reactive protein and tumor necrosis factor-alpha with the severity of coronary artery disease and renal impairment in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2007; 40: 810-816.
81. **Armbruster DA.** Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. *Clin Chem* 1987; 33: 2153-2163.
82. **Lim HS.** Fructosamine and diabetes. *Singapore Med J* 1988; 29: 541, 543.
83. **Youssef D, El Abbassi A, Jordan RM, Peiris AN.** Fructosamine--an underutilized tool in diabetes management: case report and literature review. *Tenn Med* 2008; 101: 31-33.
84. **Doery JC, Regan J, Healy D, Bishop S, Tippet C.** Fructosamine in gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1635-1636.
85. **Fitzgibbons JF, Koler RD, Jones RT.** Red cell age-related changes of hemoglobins Ala+b and Alc in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1976; 58: 820-824.
86. **Bunn HF, Haney DN, Kamin S, Gabbay KH, Gallop PM.** The biosynthesis of human hemoglobin A1c. Slow glycosylation of hemoglobin *in vivo*. *J Clin Invest* 1976; 57: 1652-1659.
87. **Tahara Y, Shima K.** The response of GHb to stepwise plasma glucose change over time in diabetic patients. *Diabetes Care* 1993; 16: 1313-1314.
88. **Tahara Y, Shima K.** Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care* 1995; 18: 440-447.
89. **Maillard LC.** Condensation des acides aminés sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique. *CR Acad Sci Paris* 1912; 154: 66-68.
90. **Kunkel HG, Wallenius G.** New hemoglobin in normal adult blood. *Science* 1955; 122: 288.
91. **Allen DW, Schroeder, W. A., Balog, J.** Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin: A study of the effects of crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *Journal of the American Chemical Society* 1958; 80: 1628-1634.
92. **Huisman TH, Sydenstricker VP.** Difference in gross structure of two electrophoretically identical 'minor' haemoglobin components. *Nature* 1962; 193: 489-491.

93. **Huisman TH, Dozy AM.** Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *J Lab Clin Med* 1962; 60: 302-319.
94. **Bookchin RM, Gallop PM.** Structure of hemoglobin Alc: nature of the N-terminal beta chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun* 1968; 32: 86-93.
95. **Rahbar S.** An abnormal hemoglobin in red cells of diabetics *Clinica Chimica Acta* 1968; 22: 296-298.
96. **Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM.** Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1969; 36: 838-843.
97. **Knowles HC, Jr.** The problem of the relation of the control of diabetes to the development of vascular disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 1964; 76: 142-147.
98. **Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT.** Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971; 284: 353-357.
99. **Campuzano-Maya G.** Utilidad de la hemoglobina glicosilada en diabetes. *Temas de Laboratorio* 1982; 1: 2-6.
100. **Boucher BJ, Burrin JM, Gould BJ, John PN, Lewis G, Owens C, et al.** A collaborative study of the measurement of glycosylated haemoglobin by several methods in seven laboratories in the United Kingdom. *Diabetologia* 1983; 24: 265-271.
101. **Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Wilke AL, Rohlfing CL, Wians FH, Jr., et al.** Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. *Clin Chem* 1992; 38: 2472-2478.
102. **Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, van der Slik W.** Evaluation of a reference material for glycated haemoglobin. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996; 34: 67-72.
103. **Kobold U, Jeppsson JO, Dulffer T, Finke A, Hoelzel W, Miedema K.** Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping. *Clin Chem* 1997; 43: 1944-1951.
104. **Finke A, Kobold U, Hoelzel W, Weykamp C, Miedema K, Jeppsson JO.** Preparation of a candidate primary reference material for the international standardisation of HbA1c determinations. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36: 299-308.
105. **Hoelzel W, Miedema K.** Development of a reference system for the international standardization of HbA1c/glycohemoglobin determinations. *J Int Fed Clin Chem* 1996; 9: 62-64, 66-67.
106. **Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO, et al.** The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: a 6-year progress report. *Clin Chem* 2008; 54: 240-248.
107. **Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement: the American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, and the International Diabetes Federation.** *Diabetes Care* 2007; 30: 2399-2400.
108. **Hanas R, John G.** 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin a1c measurement. *Clin Chem* 2010; 56: 1362-1364.
109. **Hanas R, John G.** 2010 Consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A(1c) measurement. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 775-776.
110. **Hanas R, John G.** 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. *Diabet Med* 2010; 27: 737-738.
111. **Hanas R, John G.** 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1c measurement. *Pediatr Diabetes* 2010; 11: 209-211.
112. **Hanas R, John G.** 2010 consensus statement on the worldwide standardization of the hemoglobin A1C measurement. *Diabetes Care* 2010; 33: 1903-1904.
113. **Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ.** Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008; 31: 1473-1478.
114. **Weykamp C, John WG, Mosca A.** A review of the challenge in measuring hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 439-445.
115. **Borg R, Kuenen JC, Carstensen B, Zheng H, Nathan DM, Heine RJ, et al.** Associations between features of glucose exposure and A1C: the A1C-Derived Average Glucose (ADAG) study. *Diabetes* 2010; 59: 1585-1590.
116. **Goodall I.** HbA1c standardisation destination--global IFCC Standardisation. How, why, where and when--a tortuous pathway from kit manufacturers, via inter-laboratory lyophilized and whole blood comparisons to designated national comparison schemes. *Clin Biochem Rev* 2005; 26: 5-19.
117. **John WG, Mosca A, Weykamp C, Goodall I.** HbA1c standardisation: history, science and politics. *Clin Biochem Rev* 2007; 28: 163-168.

118. **Weykamp CW, Penders TJ, Miedema K, Muskiet FA, van der Slik W.** Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. *Clin Chem* 1995; 41: 82-86.
119. A desktop guide to Type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. European Diabetes Policy Group 1998. *Diabet Med* 1999; 16: 253-266.
120. A desktop guide to Type 2 diabetes mellitus. European Diabetes Policy Group 1999. *Diabet Med* 1999; 16: 716-730.
121. **International Diabetes Federation.** Clinical Guidelines Task Force. Global guideline for Type 2 diabetes. Brussels, 2005.
122. **Camargo JL, Zelmanovitz T, Paggi A, Friedman R, Gross JL.** Accuracy of conversion formulae for estimation of glycohaemoglobin. *Scand J Clin Lab Invest* 1998; 58: 521-528.
123. List of NGSP certified methods. Disponible en: <http://www.ngsp.org/prog/index.html>, accesado en junio de 2010.
124. **John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G.** Evaluation of the Menarini-Arkray HA 8140 hemoglobin A1c analyzer. *Clin Chem* 1997; 43: 968-975.
125. **Gibb I, Parnham A, Fonfrede M, Lecock F.** Multicenter evaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer. *Clin Chem* 1999; 45: 1833-1841.
126. **Higgins TN, Blakney GB, Dayton J.** Analytical evaluation of the Bio-Rad variant II automated HbA(1C) analyzer. *Clin Biochem* 2001; 34: 361-365.
127. **Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB, Goldstein DE.** The National Glycohemoglobin Standardization Program: a five-year progress report. *Clin Chem* 2001; 47: 1985-1992.
128. **Klenk DC, Hermanson GT, Krohn RI, Fujimoto EK, Mallia AK, Smith PK, et al.** Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. *Clin Chem* 1982; 28: 2088-2094.
129. **Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, Ospina M, Safar-Pour S, Roberts WL.** Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits. *Clin Chem* 2005; 51: 264-265.
130. **Little RR, Roberts WL.** A review of variant hemoglobins interfering with hemoglobin A1c measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 446-451.
131. **Wilson DH, Bogacz JP, Forsythe CM, Turk PJ, Lane TL, Gates RC, et al.** Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott IMx analyzer: novel approaches for separation and detection. *Clin Chem* 1993; 39: 2090-2097.
132. **John WG, Edwards R, Price CP.** Laboratory evaluation of the DCA 2000 clinic HbA1c immunoassay analyser. *Ann Clin Biochem* 1994; 31 (Pt 4): 367-370.
133. **Sakurabayashi I, Watano T, Yonehara S, Ishimaru K, Hirai K, Komori T, et al.** New enzymatic assay for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2003; 49: 269-274.
134. National Glycohemoglobin Standardization Program Protocol. Disponible en: <http://www.ngsp.org/prog/protocol/prot.html>, accesado en junio 2010.
135. European Reference Laboratory. Disponible en: <http://www.euroreflab.com>, accesado en junio 2010.
136. **Bruns DE.** Standardization, calibration, and the care of diabetic patients. *Clin Chem* 1992; 38: 2363-2364.
137. **Narayanan S.** The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 429-452.
138. **Lippi G, Fostini R, Guidi GC.** Quality improvement in laboratory medicine: extra-analytical issues. *Clin Lab Med* 2008; 28: 285-294, vii.
139. **Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M.** Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48: 436-472.
140. **Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F.** Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002; 48: 691-698.
141. **Valenstein PN, Sirota RL.** Identification errors in pathology and laboratory medicine. *Clin Lab Med* 2004; 24: 979-996, vii.
142. **Herman WH, Fajans SS.** Hemoglobin A1c for the diagnosis of diabetes: practical considerations. *Pol Arch Med Wewn* 2010; 120: 37-40.
143. **Wiener K, Roberts NB.** Age does not influence levels of HbA1c in normal subject. *QJM* 1999; 92: 169-173.
144. **Nuttall FQ.** Effect of age on the percentage of hemoglobin A1c and the percentage of total glycohemoglobin in non-diabetic persons. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 451-453.
145. **Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Little R, Grotz VL, Tennill A, England J, et al.** Biological variation of glycohemoglobin. *Clin Chem* 2002; 48: 1116-1118.

146. Kim C, Bullard KM, Herman WH, Beckles GL. Association between iron deficiency and A1C levels among adults without diabetes in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Diabetes Care* 2010; 33: 780-785.
147. Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol* 2004; 112: 126-128.
148. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-163.
149. Schnedl WJ, Lahousen T, Lang T, Lipp RW, Yonehara S, Fukunaga S, et al. Determination of glycated hemoglobin in clinically silent hemoglobin variants. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 460-465.
150. Moridani MY, Verjee Z, Allen IC. Analytical evaluation of hemoglobin A(1c) dual kit assay on Bio-Rad Variant II: an automated HPLC hemoglobin analyzer for the management of diabetic patients. *Clin Biochem* 2003; 36: 317-320.
151. Liew CF, Cheah JS. Hereditary spherocytosis, a pitfall in the assessment of glycaemic control. *Singapore Med J* 2003; 44: 94-97.
152. Panzer S, Kronik G, Lechner K, Bettelheim P, Neumann E, Dudczak R. Glycosylated hemoglobins (GHb): an index of red cell survival. *Blood* 1982; 59: 1348-1350.
153. Rohlfing CL, Connolly SM, England JD, Hanson SE, Moellering CM, Bachelder JR, et al. The effect of elevated fetal hemoglobin on hemoglobin A1c results: five common hemoglobin A1c methods compared with the IFCC reference method. *Am J Clin Pathol* 2008; 129: 811-814.
154. Karsegard J, Wicky J, Mensi N, Caulfield A, Philippe J. Spurious glycohemoglobin values associated with hydroxyurea treatment. *Diabetes Care* 1997; 20: 1211-1212.
155. Albright ES, Ovalle F, Bell DS. Artificially low hemoglobin A1c caused by use of dapsone. *Endocr Pract* 2002; 8: 370-372.
156. Ceriello A, Giugliano D, Dello Russo P, Sgambato S, D'Onofrio F. Increased glycosylated hemoglobin A1 in opiate addicts: evidence for a hyperglycaemic effect of morphine. *Diabetologia* 1982; 22: 379.
157. Nathan DM, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on determinations of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29: 466-469.
158. Davie SJ, Gould BJ, Yudkin JS. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. *Diabetes* 1992; 41: 167-173.
159. Camargo JL, Felisberto M, Gross JL. Effect of pre-analytical variables on glycohemoglobin measurements in routine clinical care. *Clin Biochem* 2004; 37: 836-839.
160. Selvaraj N, Bobby Z, Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of hemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2006; 366: 190-195.
161. Camargo JL, Stiff J, Gross JL. The effect of aspirin and vitamins C and E on HbA1c assays. *Clin Chim Acta* 2006; 372: 206-209.
162. Camargo JL, Gross JL. [Glycohemoglobin (GHb): clinical and analytical aspects]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48: 451-463.
163. Robertson M. Artificially low HbA1c associated with treatment with ribavirin. *BMJ* 2008; 336: 505.
164. Garrib A, Griffiths W, Eldridge P, Hatton R, Worsley A, Crook M. Artificially low glycated haemoglobin in a patient with severe hypertriglyceridaemia. *J Clin Pathol* 2003; 56: 394-395.
165. Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A1c in type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Int* 1999; 41: 357-362.
166. Hashimoto K, Noguchi S, Morimoto Y, Hamada S, Wasada K, Imai S, et al. A1C but not serum glycated albumin is elevated in late pregnancy owing to iron deficiency. *Diabetes Care* 2008; 31: 1945-1948.
167. Proto G, De Marchi S, Cecchin E. Glycosylated hemoglobin in chronic alcoholics. *Drug Alcohol Depend* 1983; 12: 299-302.
168. Ng JM, Jennings PE, Laboi P, Jayagopal V. Erythropoietin treatment significantly alters measured glycated haemoglobin (HbA1c). *Diabet Med* 2008; 25: 239-240.
169. Passare G, Fastbom J, Torring O, Viitanen M. Drug use and increased HbA1c levels in non-diabetic very elderly persons: the Kungsholmen project. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; 60: 121-126.
170. De Boer MJ, Miedema K, Casparie AF. Glycosylated haemoglobin in renal failure. *Diabetologia* 1980; 18: 437-440.
171. Selvaraj N, Bobby Z, Sridhar MG. Increased glycation of hemoglobin in chronic renal failure: [corrected] potential role of oxidative stress. *Arch Med Res* 2008; 39: 277-284.
172. Blincko S, Anzette J, Edwards R. Measurement of glycated haemoglobin in whole blood by a novel fluorescence quenching assay. *Ann Clin Biochem* 2000; 37 (Pt 4): 492-497.

173. **Hoberman HD, Chiodo SM.** Elevation of the hemoglobin A1 fraction in alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1982; 6: 260-266.
174. **Stevens VJ, Fantl WJ, Newman CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM.** Acetaldehyde adducts with hemoglobin. *J Clin Invest* 1981; 67: 361-369.
175. **Koskinen LK, Korpela MM, Lahtela JT, Laippala PJ, Pikkarainen PH, Koivula TA.** Effect of acetaldehyde and acetylsalicylic acid on HbA1c chromatography in the FPLC method with Mono S cation exchanger. *Clin Chim Acta* 1998; 275: 53-61.
176. **McCready F, Cundy T.** Effects of splenectomy for hereditary spherocytosis on glycated haemoglobin in a woman with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2009; 26: 570-571.
177. **Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W.** Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem* 1993; 39: 138-142.
178. **Weykamp CW, Miedema K, de Haan T, Doelman CJ.** Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. *Clin Chem* 1999; 45: 438-440.
179. **Fajans SS, Conn JW.** The early recognition of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 1959; 82: 208-218.
180. **Rushforth NB, Bennett PH, Steinberg AG, Burch TA, Miller M.** Diabetes in the Pima Indians. Evidence of bimodality in glucose tolerance distributions. *Diabetes* 1971; 20: 756-765.
181. **Rushforth NB, Bennett PH, Steinberg AG, Miller M.** Comparison of the value of the two- and one-hour glucose levels of the oral GTT in the diagnosis of diabetes in Pima Indians. *Diabetes* 1975; 24: 538-546.
182. **Bennett PH, Rushforth NB, Miller M, LeCompte PM.** Epidemiologic studies of diabetes in the Pima Indians. *Recent Prog Horm Res* 1976; 32: 333-376.
183. **Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance.** National Diabetes Data Group. *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
184. **Kramer CK, Araneta MR, Barrett-Connor E.** A1C and diabetes diagnosis: The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care* 2010; 33: 101-103.
185. **Lenters-Westra E, Slingerland RJ.** Six of eight hemoglobin A1c point-of-care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria. *Clin Chem* 2010; 56: 44-52.
186. **Delaronde S.** Barriers to A1C testing among a managed care population. *Diabetes Educ* 2005; 31: 235-239.
187. **Agus MS, Alexander JL, Wolfsdorf JL.** Utility of immediate hemoglobin A1c in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 2010.
188. **Sacks DB.** Global harmonization of hemoglobin A1c. *Clin Chem* 2005; 51: 681-683.
189. **Aldasouqi SA, Gossain VV.** Hemoglobin A1c: past, present and future. *Ann Saudi Med* 2008; 28: 411-419.
190. **Kilpatrick ES.** Haemoglobin A1c in the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus. *J Clin Pathol* 2008; 61: 977-982.
191. **Saudek CD, Brick JC.** The clinical use of hemoglobin A1c. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 629-634.
192. **Pozzilli P, Leslie RD, Chan J, De Fronzo R, Monnier L, Raz I, et al.** The A1C and ABCD of glycaemia management in type 2 diabetes: a physician's personalized approach. *Diabetes Metab Res Rev* 2010; 26: 239-244.
193. **Matsushita K, Blecker S, Pazin-Filho A, Bertoni A, Chang PP, Coresh J, et al.** The Association of Hemoglobin A1c with Incident Heart Failure among Persons without Diabetes: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes* 2010.
194. **Kalyani RR, Saudek CD, Brancati FL, Selvin E.** Association of diabetes, comorbidities, and A1C with functional disability in older adults: results from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2006. *Diabetes Care* 2010; 33: 1055-1060.
195. **Sikaris K.** The correlation of hemoglobin A1c to blood glucose. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3: 429-438.
196. **Nakagami T, Tajima N, Oizumi T, Karasawa S, Wada K, Kameda W, et al.** Hemoglobin A1c in predicting progression to diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 87: 126-131.
197. **Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, Yusuf S.** The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 1999; 22: 233-240.
198. **Dluhy RG, McMahon GT.** Intensive glycemic control in the ACCORD and ADVANCE trials. *N Engl J Med* 2008; 358: 2630-2633.