

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacología (Farmacognosia y
Farmacología Experimental)



Glicación no enzimática de proteína: importación en el
diagnóstico y control de la gestante diabética

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cristina Grande Aragón

Director

Luis Felipe Pallardo Sánchez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

"GLICACION NO ENZIMATICA DE PROTEINAS: IMPORTACION EN EL
DIAGNOSTICO Y CONTROL DE LA GESTANTE DIABETICA"

MEMORIA que para optar al grado
de Doctor en Farmacia presenta
Dña. CRISTINA GRANDE ARAGON.

Madrid, Febrero, 1992.

Prof. D. LUIS FELIPE PALLARDO SANCHEZ, Profesor Titular de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Prof. D. FRANCISCO ZARAGOZA GARCIA, Catedrático de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Alcalá de Henares de Madrid.

CERTIFICA: Que Dña. CRISTINA GRANDE ARAGON ha realizado bajo su dirección el trabajo "Glicacion no enzimática de proteínas: importancia en el diagnóstico y control de la gestante diabética."

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Madrid a diez de Febrero de mil novecientos noventa y dos.

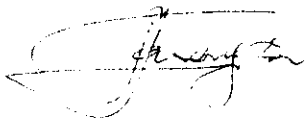
Director



Fdo: Dr. D.L.F. Pallardo Sánchez

Director del Departamento de
Farmacología

Coodirector



Fdo. Dr. D. F. Zaragoza García.

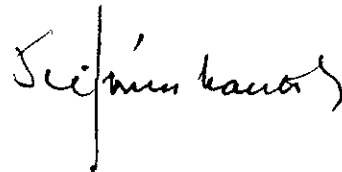


Fdo: D.A. Villar del Fresno.

Dr. D. JOSE M^a. GOMEZ MANTILLA, Jefe de Departamento de Laboratorio del Hospital "La Paz" de Madrid.

CERTIFICA: Que la tesis titulada "Glicación no enzimática de las proteínas: importancia en el diagnóstico y control de la gestante diabética", ha sido realizada por Dña. CRISTINA GRANDE ARAGON en el Servicio de Bioquímica de mi Departamento.

Madrid, 10 de Febrero de 1992.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José M. Gómez Mantilla', written in a cursive style.

Fdo: Dr. D. José M^a. Gómez Mantilla.

A mi familia.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a una serie de personas sin cuyos conocimientos, apoyo, estímulo, colaboración y amistad nunca hubiera podido realizarse este trabajo.

A todas las gestantes, porque su embarazo hizo posible esta tesis.

Al Dr. D. J. M^a. Gómez Mantilla porque siempre me atendió solícita y amablemente.

Al Prof. D. Angel Villar del Fresno por haber aceptado ser ponente de esta tesis.

Al Prof. D. L. F. Pallardo Sánchez, director de la misma, porque con su enorme bagaje científico, constante dedicación e infatigable vocación docente me introdujo y estimuló en el estudio de la diabetes.

Al Prof. F. Zaragoza García por el interés demostrado en la codirección de esta tesis. Sus consejos y orientaciones han sido de gran ayuda para su consecución.

Al Dr. R. Gasalla Chacón por su apoyo incondicional ya que desde el principio me motivó hacia este trabajo y me facilitó los medios para llevarlo a cabo.

Al Dr. Angel Hernanz por la infinita paciencia derrochada en el tratamiento estadístico de los datos. Siempre estuvo dispuesto a solucionarme con rapidez y amabilidad todos los problemas surgidos.

A la Dra. Angeles Zapata Ferrer por su amistad y ayuda constante. Ella me enseñó la metodología lipídica de este trabajo y participó en el desarrollo del mismo.

A la Dra. P. González Gancedo y todos mis compañeros del servicio de Bioquímica, con los que he compartido muchas horas de trabajo, distracción y en muchos casos de crítica apasionada.

Por último, hago constar mi agradecimiento más especial a mi hermana Clotilde, por su generoso tiempo dedicado en la elaboración del texto pero quizás lo más importante a su comprensión y cariño.

	Página.
1 - INTRODUCCION.	
1.1 - VIAS METABOLICAS NO INSULINDEPENDIENTES.	2.
1.1.1 Glicosilación protéica.	2.
1.1.2 Glicación protéica.	3.
1.1.3 Vía del sorbitol.	3.
1.2 - GLICACION NO ENZIMATICA DE PROTEINAS.	4.
1.2.1 Química de la glicación no enzimática.	4.
1.2.2 Glicación de la hemoglobina.	8.
1.2.2.1 Estructura de la hemoglobina glicada.	8.
1.2.2.2 Síntesis de HbA _{1c} .	11.
1.2.3 Glicación de otras proteínas.	15.
1.2.4 Factores que modifican la glicación no enzimática.	15.
1.3 - GLICACION NO ENZIMATICA DE PROTEINAS EN LA DIABETES.	19.
1.3.1 Glicación no enzimática en el diagnóstico de la diabetes.	19.
1.3.2 Glicación no enzimática en el control de la diabetes.	25.
1.3.3 Glicación no enzimática y complicaciones de la diabetes.	31.
1.4 - GLICACION NO ENZIMATICA EN LA GESTANTE DIABETICA.	40.
1.4.1 Control metabólico de la diabetes.	40.
1.4.2 Despistaje de la diabetes gestacional.	46.
2 - OBJETIVO DEL TRABAJO.	49.
3 - MATERIAL Y METODOS.	52.
3.1 - PROTOCOLOS DE ESTUDIO.	53.
3.1.1 Valoración de glucemia y proteínas glicadas a lo largo del embarazo en gestantes normales, diabéticas gestacionales y diabéticas pregestacionales.	53.
3.1.1.1 Gestantes normales.	53.
3.1.1.2 Diabéticas gestacionales.	56.
3.1.1.3 Diabéticas pregestacionales.	56.
3.1.2 Relación de proteínas con morbilidad fetal.	57.
3.1.2.1 Macrosomía fetal.	57.
3.1.2.2 Malformaciones congénitas.	58.
3.1.2.3 Madurez pulmonar fetal.	59.
3.1.3 Análisis de las proteínas glicadas en la estrategia diagnóstica de la diabetes gestacional.	59.

	Página.
3.2 - METODOS ANALITICOS.	61.
3.2.1 Glucosa.	61.
3.2.2 Proteínas glicadas.	61.
3.2.2.1 Revisión de métodos.	61.
3.2.2.2 Metodología utilizada.	72.
3.2.2.2.1 Cuantificación de la HbA _{1c} .	72.
3.2.2.2.2 Cuantificación de la glicohemoglobina.	74.
3.2.2.2.3 Cuantificación de fructosamina.	75.
3.2.2.2.4 Cuantificación de proteínas plasmáticas glicadas.	76.
3.2.3 Fosfolípidos en líquido amniótico.	80.
3.3 - METODOS ESTADISTICOS.	82.
3.3.1 Descripción de los resultados.	82.
3.3.2 Comparación de dos medias.	82.
3.3.2.1 Datos apareados.	82.
3.3.2.2 Datos no apareados.	83.
3.3.3 Comparación de varias medias.	83.
3.3.4 Comparación de variables cualitativas.	83.
3.3.5 Correlación y regresión.	83.
3.3.6 Sensibilidad, especificidad y valor predictivo.	84.
4 - RESULTADOS.	85.
4.1 - VALORACION DE GLUCEMIA Y PROTEINAS GLICADAS A LO LARGO DEL EMBARAZO EN GESTANTES NORMALES DIABETICAS GESTACIONALES Y DIABETICAS PREGESTACIONALES.	86.
4.1.1 Evolución de la glucemia y proteínas glicadas a lo largo del embarazo.	86.
4.1.2 Correlación entre proteínas glicadas y su relación con glucemias previas.	109.
4.2 - RELACION DE PROTEINAS GLICADAS CON MORBILIDAD FETAL.	120.
4.2.1 Macrosomía fetal.	120.
4.2.1 Malformaciones congénitas.	127.
4.2.3 Madurez pulmonar fetal.	131.
4.3 - ANALISIS DE LAS PROTEINAS GLICADAS EN LA ESTRATEGIA DIAGNOSTICA DE LA DIABETES GESTACIONAL.	135.
5 - DISCUSION.	144.
5.1 - EVOLUCION DE GLUCEMIA Y PROTEINAS GLICADAS A LO LARGO EMBARAZO EN GESTANTES NORMALES, DIABETICAS GESTACIONALES Y DIABETICAS PREGESTACIONALES.	145.

	Página.
5.2 - RELACION DE PROTEINAS GLICADAS CON MORBILIDAD FETAL.	155.
5.2.1 Macrosomía.	155.
5.2.2 Malformaciones congénitas.	158.
5.2.3 Madurez pulmonar fetal.	161.
5.3 - ANALISIS DE LAS PROTEINAS GLICADAS EN LA ESTRATEGIA DIAGNOSTICAS DE LA DIABETES GESTACIONAL.	164.
6 - CONCLUSIONES.	169.
7 - BIBLIOGRAFIA.	173.

-

ABREVIATURAS

Albumina (A)
Albumina glicada (AG)
Area bajo la curva (ABC)
Coeficiente de variación (CV)
Curva de rendimiento diagnóstico (CRD)
Desviación estándar (DS)
Diabéticas gestacionales (DG)
Diabetes mellitus insulín dependiente (DMID)
Diabetes mellitus no insulín dependiente (DMNID)
Diabéticas pregestacionales (DP)
Error estándar de la media (ESM)
Fosfatidil glicerol (PG)
Fructosamina (F)
Fructosamina corregida (Fc)
Gestantes normales (GN)
Glicohemoglobina (GHb)
Glucemia basal (GB)
Glucemia media (GM)
Glucemia postprandial (GP)
Hemoglobina fetal (HbF)
Hidroxi metil-furfural (HMF)
Índice ponderal fetal (IPF)
Intolerancia glucídica (IG)
Lecitina/Esfingomielina (L/E)
Media aritmética (\bar{X})
National Diabetes Data Group (NDDG)
Número de casos (n)
Productos avanzados de glicación (PAG)
Proteínas totales (PT)
Proteínas totales glicadas (PG)
Síndrome de distress respiratorio (SDR)
Sobrecarga oral de glucosa (SOG)
Suma de glucemias (ΣG)
Test de despistaje (TD)
Test de screening de glucosa (TS)
World Health organization (WHO)

1.- INTRODUCCION.

La diabetes es un síndrome caracterizado por hiperglucemia crónica, condicionada por factores genéticos y ambientales, que afecta concomitantemente al metabolismo lipídico y proteico, que propende al desarrollo de complicaciones vasculares específicas (microangiopatía) o inespecíficas (arteriosclerosis), neuropatía, etc. y que tiene como raíz última un defecto en la secreción y/o actividad periférica de la insulina (Pallardo, 1989).

La glucosa elevada en el paciente diabético mal controlado, tiende a metabolizarse a través de diferentes vías no insulino-dependientes (Figura 1) que a continuación analizaremos (Shafrir, 1987).

1.1 - VIAS METABOLICAS NO INSULINO-DEPENDIENTES.

1.1.1 - GLICOSILACION PROTEICA.

La deficiencia de insulina y/o la hiperglucemia aumentan la actividad de las enzimas implicadas en la síntesis de glicoproteínas. La glucosa, junto con otras hexosas, se une a grupos hidroxilo de determinados aminoácidos.

Los grupos aceptores son principalmente, serina, treonina y en especial 5 hidroxilisina, presente a nivel del colágeno y que se origina a partir de una hidroxilación post-translacional de la lisina por acción de una lisina-hidroxilasa.

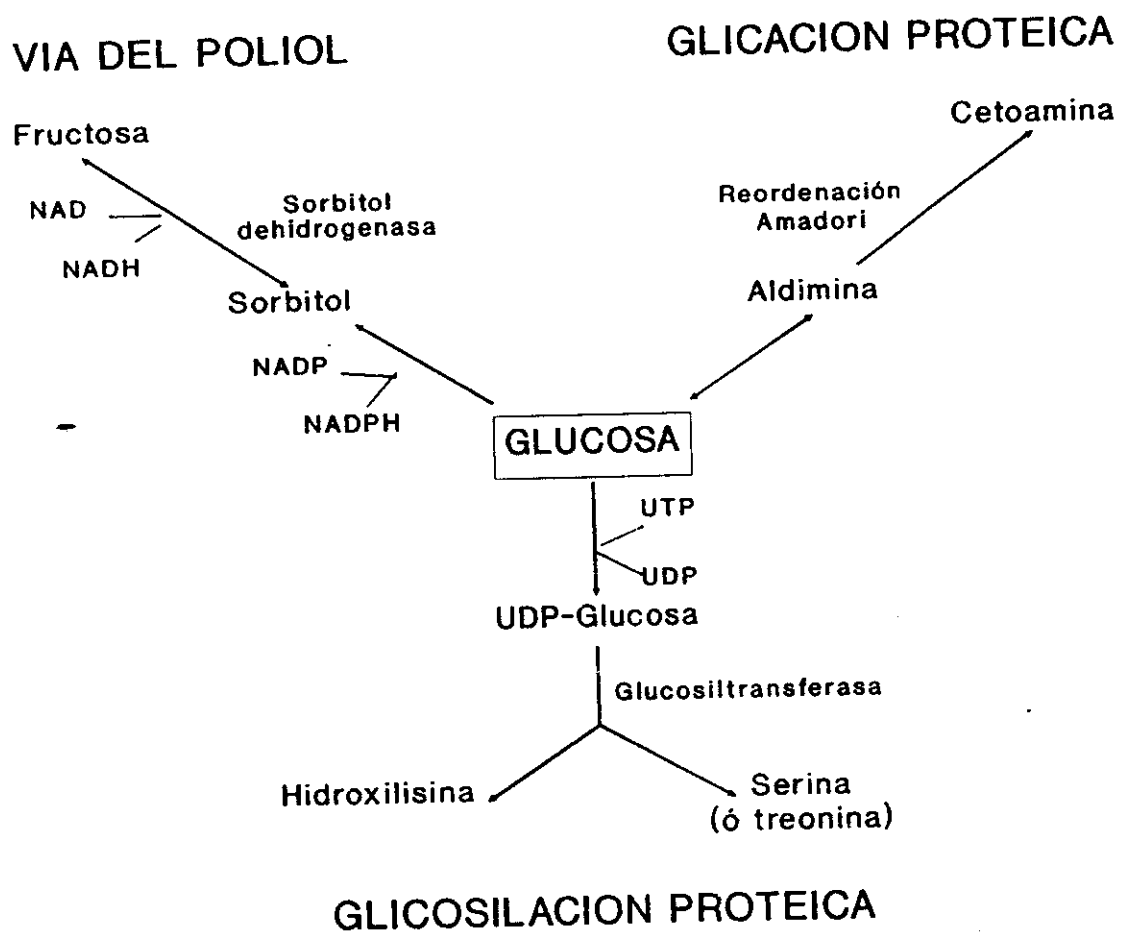


Figura 1.- Vías metabólicas no insulino-dependientes.

La glicosilación implica la formación previa de UDP glucosa a partir de UTP y glucosa 1 fosfato mediante una pirofosforilasa, seguida de la transferencia del residuo glucosa al hidroxilo del aminoácido aceptor por acción de una glucosil transferasa.

La glicosilación proteica juega un importante papel en el engrosamiento de la membrana basal capilar, factor patogénico fundamental en determinadas complicaciones vasculares de la diabetes (Spiro, 1976).

1.1.2 - GLICACION PROTEICA.

El término glicación, implica la unión no enzimática de glucosa a los grupos amino de las proteínas mediante dos reacciones. En la primera se origina una aldimina inestable, que posteriormente sufre un lento y espontáneo reordenamiento interno, obteniéndose una unión covalente y estable o cetoamina.

Esta glicación afecta tanto a proteínas circulantes como estructurales y como más adelante discutiremos va a ofrecer recursos importantes para la valoración del control y diagnóstico de la diabetes, así como ha abierto nuevas vías de investigación en lo referente a la génesis de las complicaciones crónicas de la misma (Jovanovic, 1981a; Lester, 1985; Cerami 1988).

1.1.3 - VIA DEL SORBITOL.

La glucosa en exceso puede entrar en determinadas células (cristalino, células de Schwann, células endoteliales) ricas en aldosa reductasa y transformarse en un polialcohol o sorbitol, que atraviesa con difícil-

tad la membrana, si no se convierte mediante una sorbitol deshidrogenasa, en fructosa.

El acúmulo intracelular de sorbitol, junto con su acción osmótica produce una inhibición de la actividad Na^+/K^+ ATPasa ligada a una reducida captación de mioinositol, polialcohol cíclico precursor de reacciones metabólicas que intervienen de manera primordial en la conducción nerviosa. Esta vía del sorbitol tiene una importancia especialmente manifiesta en el desarrollo de las cataratas y la polineuropatía diabética (Gabbay, 1976a; Clements, 1979), habiéndose utilizado inhibidores de la aldosa reductasa en el tratamiento y prevención de estas manifestaciones (Yaspan, 1983).

1.2 - GLICACION NO ENZIMATICA DE PROTEINAS.

1.2.1 - QUIMICA DE LA GLICACION NO ENZIMATICA.

La reacción de aminoácidos, principalmente lisina y valina, con azúcares que tienen grupos reductores se conoce desde 1912 en el campo de la nutrición como reacción del Maillard o reacción "browning" (Maillard, 1912). Esta, es la responsable del fenómeno de oscurecimiento que tiene lugar en los alimentos con gran contenido en proteínas y carbohidratos, cuando se calientan (Ellis, 1959; Lee, 1982).

La reacción de Maillard implica tres etapas (Figura 2), las dos primeras son secuenciales y la tercera como consecuencia de reacciones paralelas (Hodge, 1955; Finot, 1982; Saltmarch, 1982).

En la PRIMERA ETAPA reacciona un grupo amino de aminoácido (NH_2 terminal de valina o Σ amino grupos de lisina) con el grupo aldehído de un azúcar reductor acíclico (glucosa), vía unión nucleofílica para formar una base de Schiff o aldimina. Unión que es bastante lábil y fácilmente disociable la cual sufre posteriormente una reordenación

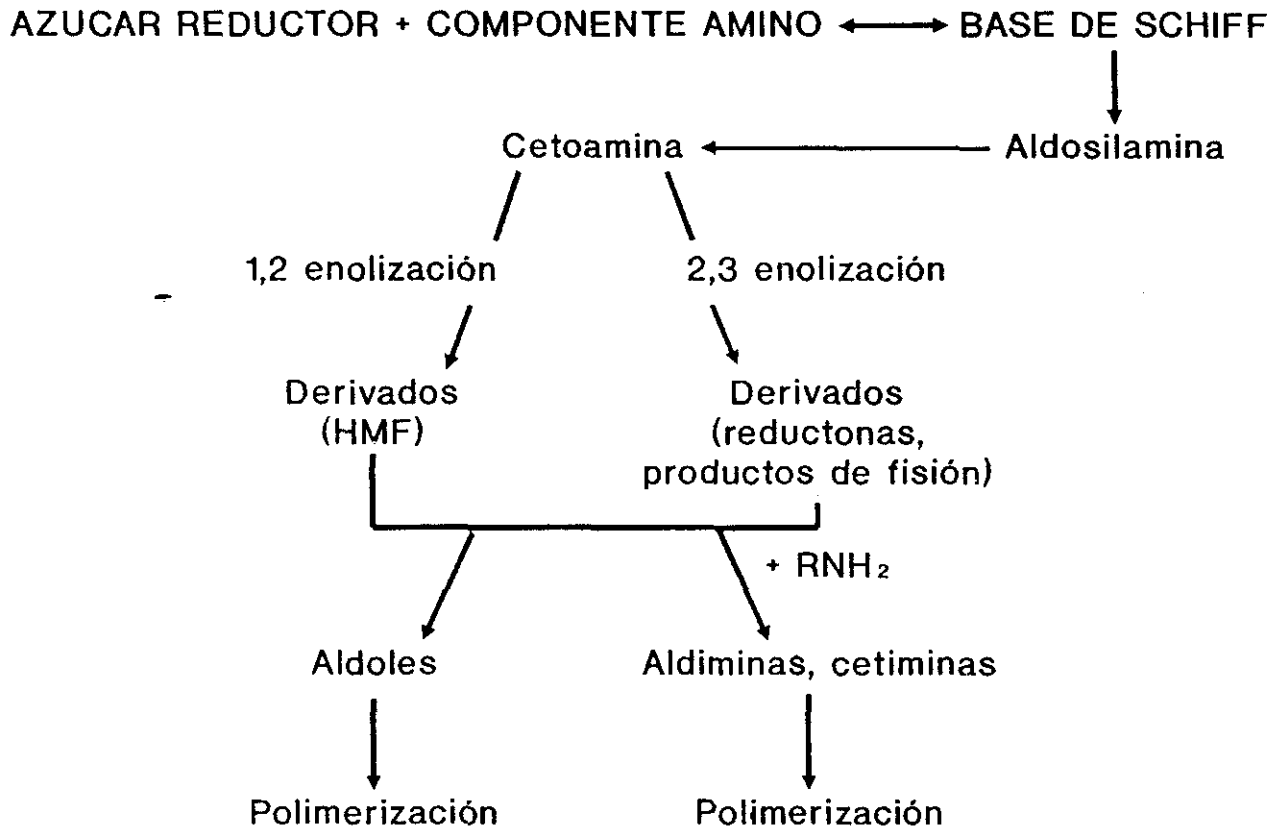


Figura 2.- Esquema simplificado de la reacción de Maillard.

de Amadori que origina el compuesto 1 amino-2 deoxy-fructosa o cetoamina estable el cual a su vez se puede ciclar a estructura en anillo que le añade estabilidad.

La glicación no enzimática no está limitada a la glucosa y una variedad de azúcares y azúcares fosfato se pueden unir covalentemente a las proteínas (Hanney, 1976; Dolhofer, 1978; Bunn, 1981a). La glicación es por consiguiente un término genérico, mientras que glucación se refiere específicamente a la condensación de glucosa con proteínas. Roth en 1983 recomendó la denominación de proteína glicada, aunque el término incorrecto glicosilada sea ampliamente utilizado en la literatura.

Las aldopentosas (ribosa) son más reactivas que las aldehexosas y éstas más que las cetohehexosas. Esto es debido a que el grupo aldehído es más electrofílico que el grupo cetona. La reactividad del monosacárido individualmente está influida por la cantidad de él que existe en forma acíclica la cual a su vez depende del equilibrio entre la configuración abierta o en anillo.

La SEGUNDA ETAPA implica la eliminación de grupos amino mediante reacciones de enolización 1, 2, ó 2, 3 seguida por reacciones de deshidratación, ciclación y fisión que generan productos secundarios tales como, hidroximetilfurfural, reductonas, aldehidos y diacarbonilos.

En la TERCERA ETAPA ocurren reacciones de polimerización obteniendo productos libres de nitrógeno si proceden de complejos que derivan del hidroximetilfurfural y polimeros que contienen nitrógeno, cuando los productos secundarios reaccionan con los grupos aminos para formar aldminas y cetiminas conocidas como melanoíginas.

1.2.2 - GLICACION DE LA HEMOGLOBINA.

Fuera de la industria alimentaria, la proteína donde desde el punto de vista biológico, mas ampliamente se ha estudiado la reacción de la glicación no enzimática, ha sido la hemoglobina. La hemoglobina y la glucosa permanecen como prototipos de reactantes en la mayoría de los estudios llevados a cabo en este sentido.

Es bien conocido desde hace 30 años que la célula roja contiene hemoglobinas diferentes de la $A(\alpha_2\beta_2)$, $A_2(\alpha_2\beta_2)$ y $F(\gamma_4)$. Estas incluyen a componentes minoritarios conocidos como A_1 los cuales tienen movilidad electroforética más rápida (Allen, 1958).

Schroeder y Holmquist en 1968 identificaron la HbA_{1C} como un componente normal y constante en el hematíe y ésta comprendía de un 5 a un 7% de su hemoglobina total, siendo el más abundante de los componentes minoritarios.

En el mismo año Rahbar informó que la HbA_{1C} sufría una elevación en los pacientes diabéticos, siendo sus niveles el doble aproximadamente de los sujetos normales. Inmediatamente se demostró (Broochin, 1968) que en la HbA_{1C} , una hexosa de identidad no definida estaba unida a la valina terminal de las cadenas β de la hemoglobina.

Estudios durante los 10 años siguientes, revelaron que la HbA_{1C} se produce de una glicación no enzimática de la HbA (Bunn, 1976; Stevens, 1977; Mc Donald, 1978).

1.2.2.1 - ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA GLICADA.

El término hemoglobina glicada engloba a un grupo de hemoglobinas, que llevan unidos restos de azúcares (Baynes, 1984) y que son modificaciones postsintéticas de la fracción principal que es la denominada HbA $(\alpha_2\beta_2)$

Estos compuestos minoritarios se originan por la unión de glucosa y azúcares fosfatos al aminoácido valina terminal así como a los Σ amino grupos de lisina de las cadenas α y β de la hemoglobina.

Las valinas terminales y sobre todo las β valina son más reactivas que los Σ amino grupos debido a su más bajo pK que las hacen más eficaces nucleófilos para la formación de la adimina inicial. La subsiguiente cetoamina desciende el punto isoeléctrico de la proteína, lo que la hace más negativa, favoreciendo la separación de estos compuestos por diversas metodologías (Bunn, 1979).

La α valina es menos reactiva posiblemente debido a la presencia de difosfoglicerato unido a β Val 1 por lo que el producto que se forma (HbA_{1d3}) es sólo ligeramente más rápido de movilidad que la HbA (Abraham, 1983).

Las uniones a los residuos lisina se pueden originar en una o más de las siguientes posiciones α Lys 7, α Lys 16, α Lys 40, α Lys 61, β Lys 8, β Lys 17, y β Lys 66 (Abraham, 1983). Estas no modifican su carga y así la cromatografía a pH 7 no las separa.

Para diferenciar estos compuestos glicosados se utiliza distinta nomenclatura y así las modificaciones NH₂ terminales junto con las no terminales se las reconoce como HEMOGLOBINA GLICADA TOTAL O GLICOHEMOGLOBINA (GHb) y a las modificaciones NH₂ terminales como HbA₁. (Cohen, 1986).

Las diferentes fracciones de la HbA₁ fueron separadas por técnicas cromatográficas o electroforéticas y su estructura queda reflejada en la tabla 1.

TABLA 1

ESTRUCTURA DE LA HEMOGLOBINA A₁

Fracción	Modificación	Porcentaje
A _{1a1}	(B-N-fructosa 1-6 disfosfato) ₂	0,3
A _{1a2}	(B-N-glucosa 6 fosfato) ₂	0,3
A _{1b}	(B-N-carbohidrato) ₂	1
A _{1c}	(B-N-glucosa) ₂ ?	4-6%
A _{1d}	?	trazas
A _{1e}	?	trazas

La HbA_{1a1} y HbA_{1a2} tienen unidos azúcares fosfato, concretamente fructosa 1-6 difosfato y glucosa 6 fosfato respectivamente (Hanney, 1976; Mc Donald, 1977). La HbA_{1b} lleva modificada una de las cadenas polipeptídicas probablemente por desamidación de glutamina o asparagina (Krishnamoor, 1977) y la HbA_{1c} lleva un resto glucosa (Broochin, 1968; Koenig, 1977).

La HbA_{1d} es el producto de la reacción de intercambio de disulfuro de la HbA con el glutatión oxidado. (Abraham, 1983). La HbA_{1e} no ha sido caracterizada todavía.

Utilizando largas columnas de intercambio catiónico de Bio-Rex a 4º C. y con un gradiente exponencial de fosfato sódico, Abraham y cols. en 1983 demostraron la separación de las diferentes fracciones de la HbA₁, las cuales siguen el orden siguiente de evolución: A_{1a1}, A_{1a2}, A_{1b1}, A_{1b2}, A_{1b3}, A_{1c}, A_{1d1}, A_{1d2} y A_{1d3} (Figura 3). La HbA_{1c} era la que estaba en mayor proporción y le seguía la HbA_{1d3} que representa el 40% de la HbA_{1c}, ambas estaban aumentadas en los pacientes diabéticos.

1.2.2.2 - SINTESIS DE HbA_{1c} (Figura 4).

La formación de HbA_{1c} es un proceso en dos etapas. La primera reacción es rápida y se origina una aldmina o intermediario lábil, fácilmente dissociable (pre A_{1c}), el cual sufre una reordenación de Amadori para formar mediante una unión covalente una cetoamina (A_{1c}) que es prácticamente irreversible (Bunn, 1981a).

NORMAL

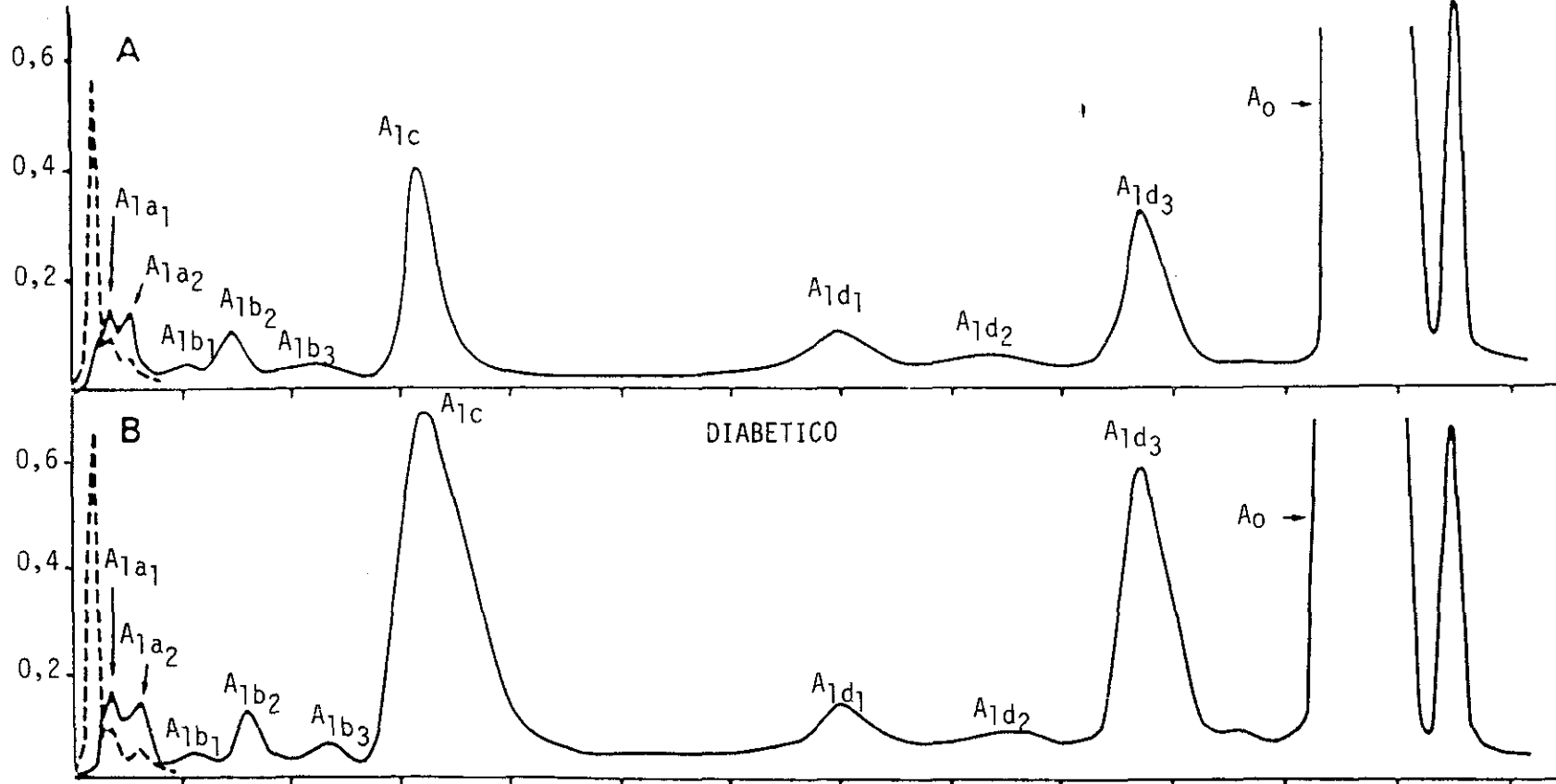


Figura 3.- Separación sobre Bio-Rex 70 de las diferentes fracciones de la HbA₁ en un sujeto normal (A) y en un paciente diabético (B) (Abraham, 1983)

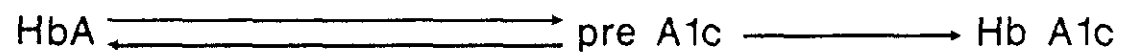
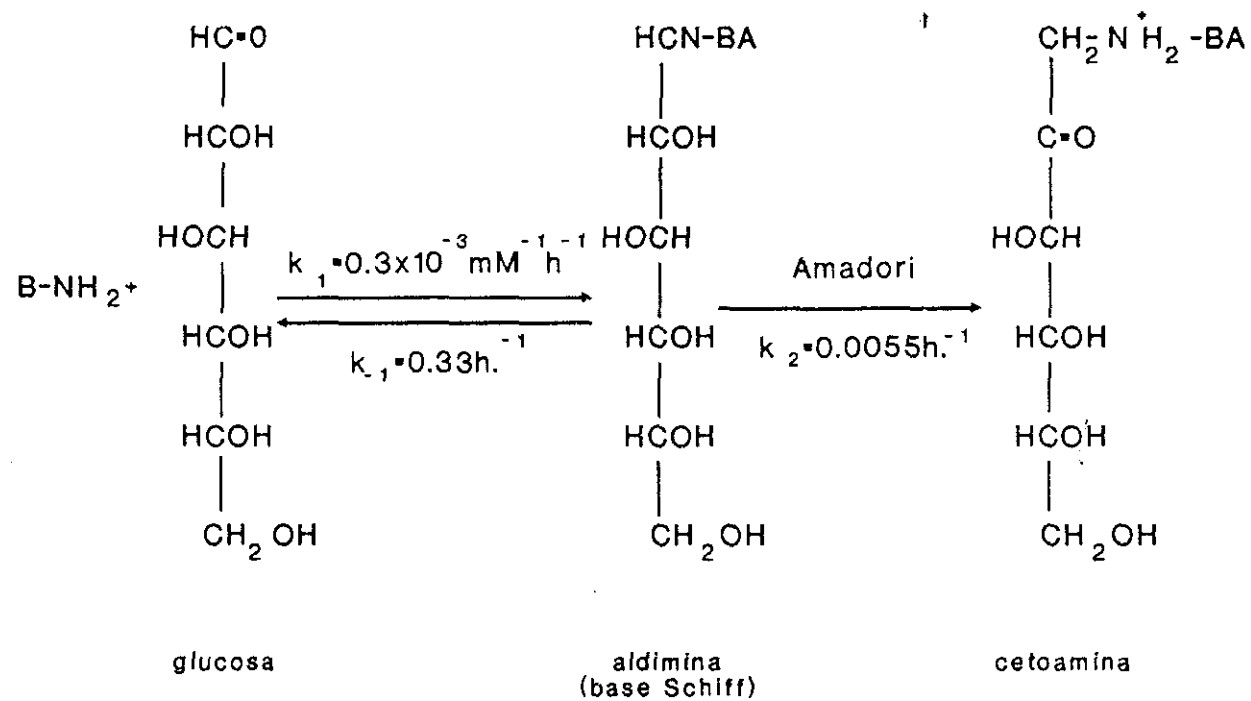


Figura 4.- Síntesis de la HbA_{1c}

La tasa de reordenación de Amadori es aproximadamente 1/60 de la de disociación de la aldimina a glucosa y hemoglobina, siendo por tanto limitante para la formación de HbA_{1c}. Esta alcanza su nivel estable a las 3-4 semanas de un cambio en la concentración de glucosa. (Higgins, 1981).

La HbA_{1c} in vivo se forma lenta y continuamente durante la vida del hematíe. Esto fue demostrado en 1976 por Bunn y cols. inyectando transferrina marcada con Fe⁵⁹ a individuos sanos, mediante lo cual observó que la actividad específica de los componentes minoritarios (HbA_{1a}, HbA_{1b} y HbA_{1c}) aumentaban progresivamente con el tiempo y excedían a la HbA aproximadamente en el día 60. Esto es compatible con el hecho de que sea un proceso lento e irreversible.

El que la glicación de la HbA_{1c} es un proceso no enzimático, fue demostrado por Flückiger y cols. (1976), el cual, sintetizó HbA_{1c} a partir de HbA pura y glucosa marcada con C₁₄. La HbA_{1c} que obtuvo, tenía propiedades estructurales y comportamiento cromatográfico idéntico al observado para la HbA_{1c} in vivo así como su velocidad de síntesis era prácticamente similar a la calculada con el estudio cinético de Bunn (1976).

Se han descrito no obstante otros mecanismos para la formación de HbA_{1c} independientes del concepto clásico de glicación no enzimática que implica la transferencia de glucosa desde un glucoconjugado de la membrana y que es operativo durante los primeros días de la vida del hematíe (Gillery, 1984).

Existen otras variantes diferentes de la HbA que pueden sufrir la glicación como son la HbA₂ (Tegos, 1980), HbF (Cauchi, 1982), HbC, HbD, HbE, HbG y HbS (Aleyassine, 1980; Tegos, 1981; Kraus, 1983). Las hemoglobinas glicadas de todas estas variantes muestran movilidad diferente y se separan claramente del patrón de la hemoglobina.

1.2.3 - GLICACION DE OTRAS PROTEINAS.

Mas de 200 proteínas plasmáticas de las cuales alrededor de 100 han sido identificadas bioquímicamente, contribuyen a la concentración total de proteínas cuya media es de 7,2 g/l.

Estas proteínas sufren el proceso de glicación no enzimática originando una cetoamina (1 amino y 1 deoxy fructosa) que se conoce genericamente como fructosamina, y así los términos de albúmina glicada o proteínas glicadas usadas comunmente en la literatura, son ejemplos de fructosaminas.

En 1979 se describió la albúmina glicada como un constituyente normal de la sangre y su elevación en los pacientes diabéticos (Day, 1979; Dolhofer, 1980; Austin, 1987). La albúmina se glica en múltiples sitios pero fundamentalmente en los Σ amino grupos de los residuos lisina 199 y 525 con bajo pKa (Bunn, 1981; Garlick, 1983; Iberg, 1986).

Se ha descrito glicación de muchas proteínas plasmáticas: Inmunoglobulinas, transferrina, ceruloplasmina, fibrinógeno, antitrombina III, lipoproteínas, etc. (Gonen, 1981; Mc Verry, 1981; Kemp, 1984; Austin, 1987); así como estructurales: Membrana eritrocitaria, colágeno, proteínas del cristalino, proteínas de mielina etc. (Cohen, 1980; Schleicher, 1981; Vlassara, 1981; Kohn, 1982; Mandel, 1983).

1.2.4 - FACTORES QUE MODIFICAN LA GLICACION NO ENZIMATICA.

La glicación no enzimática tiene lugar bajo condiciones fisiológicas en los individuos normales, no obstante existen factores que influyen en la cantidad absoluta y en el porcentaje en el que una proteína se glica (Cohen, 1986; Austin, 1987). (Tabla 2).

TABLA 2

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA GLICACION PROTEICA.

- Grado y duración de la hiperglucemia.
- Vida media de la proteína circulante o tisular.
- Permeabilidad del tejido a glucosa.
- Porcentaje de carbohidrato de la proteína.
- Número de aminoácidos libres.
- Accesibilidad y pK de los grupos aminos en la estructura protéica.

Ya que la concentración de proteínas permanece bastante estable, el principal factor que influye en el grado de glicación es la concentración de glucosa y el tiempo de exposición de la proteína a la elevada concentración de la misma, lo que se traduce in vivo por **grado y duración de la hiperglucemia**.

Algunos como el pH y la T^a son importantes in vitro, otros son de gran significatividad in vivo, principalmente en cuanto a los potenciales uniones en la hiperglucemia crónica.

Ya que los productos de reacción son acumulativos, el nivel de glicación de una proteína con bajo turnover, tal como el colágeno puede aumentar con la edad a pesar de concentraciones normales de glucosa (Schnider, 1980). Por otra parte la reducción en la **vida media de una proteína** o de su estancia en circulación puede disminuir el grado de glicación sin el correspondiente cambio en los niveles de glucosa.

Un buen ejemplo es el descenso en el contenido de HbA_{1C} en los pacientes con anemia hemolítica, así como en los sujetos normales con pérdida aguda de sangre (Bunn, 1976; Starman, 1983). Contrariamente los eritrocitos viejos contienen más HbA_{1C} que los jóvenes (Fitzgibbons, 1976; Gillery, 1984).

Similar hecho ocurre en las proteínas plasmáticas donde las de vida media más larga como la albúmina e IgG se glican en mayor proporción que aquellas con vida media más corta, ej. fibrinógeno, transferrina etc. (Austin, 1987). En situaciones clínicas asociadas a patología proteica o disproteinemia (nefropatía, fallo hepático, hipertiroidismo, hipotiroidismo, etc) (Lloyd, 1985; Van Dieijen-Visser, 1986a; Dominiczak, 1989) existe una alteración en la glicación proteica.

La permeabilidad de diferentes tejidos a la glucosa influye en el grado de glicación no enzimática.

En algunas especies animales como el cerdo, la glucosa no se transporta al hematíe y por lo tanto el nivel de hemoglobina glicada es bajo. En el organismo humano la célula roja es permeable a glucosa y es entre las especies estudiadas la que presenta mayores niveles de hemoglobina glicada (67). La tasa de glicación de otras proteínas que están expuestas a glucosa como la albúmina es similar en una variedad de especies (Rendell, 1985a).

En cuanto al porcentaje de carbohidrato que contiene la proteína, se sabe que cuanto mayor sea este, la proteína se glica en menor proporción. Así la IgG que tiene bajo contenido en carbohidrato, se glica hasta un 20%, mientras que la antitripsina con un gran porcentaje del mismo, se glica ligeramente (Austin, 1987).

La glicación in vivo no depende del número de grupos amino libres (lisina) sino también de su reactividad. La reactividad de los grupos amino libre en una proteína no es uniforme y depende de la accesibilidad, pK y factores microambientales tales como la disponibilidad de grupos carboxilo que aceleran la reordenación de Amadori.

Esto puede explicar la preferencia de varios residuos lisina en una proteína determinada y el hecho de que algunas proteínas se glican más que otras así como la diferencia entre la glicación que ocurre "in vivo" e "in vitro". (Shapiro, 1980). La glicación in vitro de la HbA ocurre preferentemente en β Val 1, α Lys 16, β Lys 66, β Lys 17, α Val 1, α Lys 7, y β 20, mientras que in vivo el orden es: β Val 1, β Lys 66, β Lys 61, β Lys 17, α Val 1.

1.3 - GLICACION NO ENZIMATICA DE PROTEINAS EN LA DIABETES.

1.3.1 - GLICACION NO ENZIMATICA EN EL DIAGNOSTICO DE LA DIABETES.

El diagnóstico de la diabetes mellitus se ha concretado en los últimos años, acogiéndose a los criterios del National Diabetes Data Group (NDDG) (1979) ó a las recomendaciones más simplificadas y tal vez más utilizadas de la World Health Organization (WHO) (1985). Para el diagnóstico de diabetes mellitus y de intolerancia glucídica (IG). Según la WHO, sólo será preciso la cuantificación de las glucemias basales y/o a las 2 horas de la sobrecarga oral de 75 g. de glucosa, mientras que de acuerdo con el NDDG sería también necesario tener en cuenta las glucemias en los tiempos intermedios entre la basal y 2 h. de la referida sobrecarga. En la tabla 3 se expresan comparativamente los citados criterios diagnósticos.

Como alternativa a estas determinaciones glucémicas, en los últimos años se ha comenzado a estudiar el posible papel de las proteínas glicadas en el diagnóstico y/o despistaje de la diabetes mellitus, existiendo un cierto confusionismo en los diferentes trabajos de la literatura a la hora de la utilización de los términos "diagnóstico y "despistaje".

La hemoglobina glicada, se sugirió desde hace tiempo (Koenig, 1976; Santiago, 1978) como una alternativa idónea para el reconocimiento de la diabetes, debido a que es una extracción única de muestra e independiente de la hora del día, ingesta previa, enfermedad intercurrente, etc. Posteriormente han sido numerosas las investigaciones llevadas a cabo en orden a comprobar la utilidad de la hemoglobina glicada en el diagnóstico y despistaje de la diabetes mellitus (Dods, 1979; Forrest, 1987; Lester, 1989; Singer, 1989), siendo los resultados desalentadores.

TABLA 3

COMPARACION DE CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE NDDG (1979) Y WHO (1985)

CLASE	GLUCEMIA mg/dl (m mol/L)			
	Ayunas	0 - 2h.		2 horas.
NDDG (1979)				
- NORMAL	<115 (<6,4) y	< 200 (< 11,1)	y	< 140 (<7,8)
- IG*	<140 (<7,8) y	≥ 200 (≥ 11,1)	y	140 - 199 (7,8 - 11,1)
- DIABETES	≥140 (≥7,8) ó	≥ 200 (≥ 11,1)	y	≥200 (≥11,1)
WHO (1985)				
- NORMAL	< 140 (<7,8)	--	y	< 140 (<7,8)
- IG*	< 140 (<7,8)	--	y	140 - 199 (7,8 - 11,1)
- DIABETES	> 140 (>7,8)	--	ó	≥200 (≥11,1)

IG* Intolerancia glucídica.

En diferentes estudios, en los que se ha comparado en determinadas poblaciones los niveles de hemoglobina glicada con el grado de tolerancia glucídica, definido tras la sobrecarga oral de glucosa (SOG), se ha podido comprobar como los resultados son variables, tal vez bajo la influencia de los criterios diagnósticos considerados, la metodología para la cuantificación de la hemoglobina glicada, etc. (Forrest, 1988; Little, 1988). Por lo general suele existir diferencia significativa en los valores medios de hemoglobina glicada, entre los grupos de sujetos clasificados normal, intolerancia glucídica (IG) y diabetes mellitus; si bien, es frecuente la presencia de solapamiento al examinar individualmente los resultados (Verillo, 1983; Hall, 1984; John, 1986; Goldstein, 1989). Por otra parte, se ha objetivado una frecuente correlación entre los niveles de hemoglobina glicada y los diferentes parámetros glucémicos analizados: Glucemia basal, glucemia 2 h. postsobrecarga, área glucémica y sumatorio de glucemias (Santiago, 1978; Goldstein, 1989; Lester, 1989).

En este sentido Little y cols. en 1988 refirieron cómo sujetos con sobrecarga oral de glucosa patológica y HbA_{1c} normal, tienen valores más bajos de glucemia basal y a las 2h. postglucosa que los que tienen HbA_{1c} elevada. Modan y cols. en el mismo año encuentran de 648 individuos con tolerancia normal a la glucosa, un 12,1% con porcentajes elevados de HbA_{1c} ($\geq 8\%$), circunstancia que se ha tratado de relacionar con la metodología, ingesta (Verillo, 1983), ejercicio físico (Berntorp, 1984), factores constitucionales ("glicadores rápidos"), hábito de fumar y presencia de arteroesclerosis (Modan, 1988), etc, todo lo cual contribuye a depreciar el papel de esta proteína glicada en el diagnóstico de la diabetes.

En cuanto a sus sensibilidad y especificidad Guillausseau y cols. en 1990 estudiando un grupo de 144 sujetos en los que se valoró la HbA_{1c} mediante minicolumna de intercambio iónico, confirmaron para la misma, una especificidad diagnóstica del 100% y una sensibilidad del 15% acudiendo a niveles críticos de $X + 2DS$. De manera similar en estudio realizado en 381 indios Pima, con gran prevalencia de diabetes

(Little, 1988; Goldstein, 1989), objetivan para la HbA_{1c} cuantificada por HPLC una especificidad del 91% y una sensibilidad para el grupo de sujetos diabéticos de 85% y para los intolerantes a glucosa 30%.

En resumen, puede comprobarse que la hemoglobina glicada como parámetro diagnóstico de diabetes mellitus, presenta una aceptable especificidad, pero una baja sensibilidad.

En un estudio epidemiológico, el Islington Diabetes Survey, llevado a cabo por Forrest y cols. en 1987 se trató de comparar como test de despistaje en el diagnóstico de la diabetes, la hemoglobina glicada frente a la glucemia basal, a las 2 h. de sobrecarga oral de 75 g. de glucosa, o la glucosuria; pudiéndose confirmar como era más adecuada que esta última y discretamente inferior a la glucemia basal y a las 2 h. hecho que ha sido puesto de manifiesto por otros autores (Simon, 1985). Posteriormente y dentro de este mismo estudio (Forrest, 1988), pudo confirmar mediante la utilización de las curvas de rendimiento diagnóstico, mejores resultados cuando se acudió a la cuantificación de la hemoglobina glicada por cromatografía de afinidad, frente a la electroforesis o isoelectroenfoque.

A pesar de lo hasta aquí expresado, Singer y cols. (1989) proponen la hemoglobina glicada como test de despistaje en el diagnóstico de la diabetes, de acuerdo con el esquema de la figura 5. Este esquema está basado en el hecho de que valores de hemoglobina glicada superiores a $\bar{x} + 3DS$ son altamente específicos (99%) frente a una discreta sensibilidad (48%), al tiempo que valores de la misma inferiores a la media, son muy difíciles de observar en diabéticos no tratados.

Goldstein y cols. (1989) dentro de una línea de trabajo parecida, defienden la práctica anual como test de despistaje de una determinación de hemoglobina glicada en adultos de más de 40 años. Si el porcentaje es superior a $\bar{x} + 3DS$, se considera positivo, confirmándose el diagnóstico de diabetes posteriormente, mediante una glucemia basal.

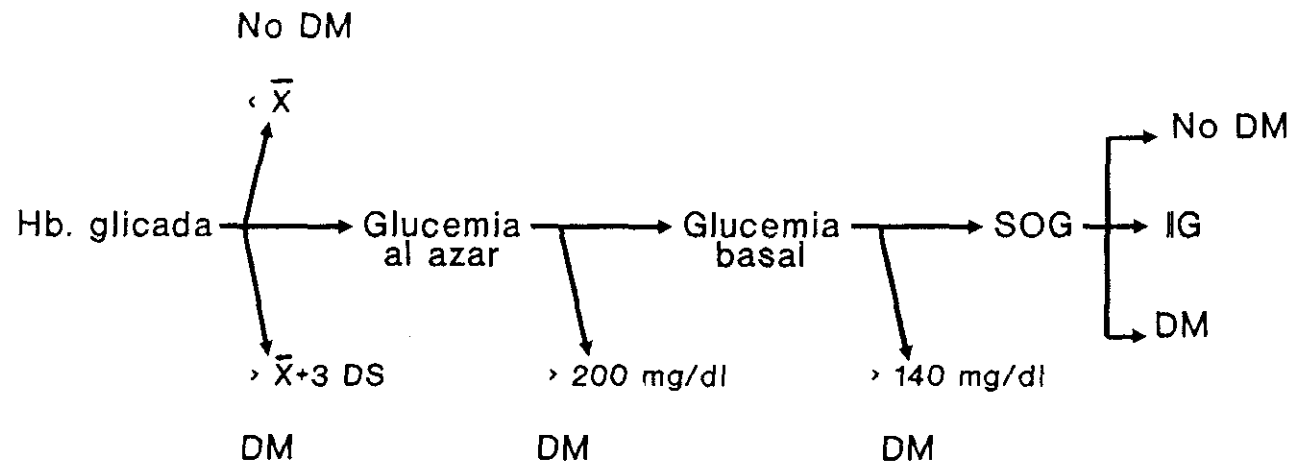


Figura 5.- Esquema para el diagnóstico de la diabetes.

Esta recomendación parece estar basada en la consideración de que niveles elevados de hemoglobina glicada podrían ser mejores predictores de riesgo que la propia elevación de los niveles glucémicos.

Por último la presencia de HbA_{1c} elevada en sujetos con episodio agudo de infarto de miocardio (Soler, 1981; Oswald, 1987) puede discriminar entre una verdadera diabetes de una intolerancia glucídica subsiguiente al cuadro de necrosis miocárdica.

En cuanto a las **proteínas plasmáticas glicadas** se refiere, son menos frecuentes los estudios llevados a cabo sobre su papel como test diagnóstico o de despistaje de la diabetes mellitus (Hodden, 1984; Hall, 1984; Swai, 1988; Windeler, 1990). Los resultados, si bien variables, apuntan hacia el hecho de reconocer a la fructosamina escasa importancia como parámetro diagnóstico.

En sujetos sometidos a SOG y determinación en paralelo de fructosamina, se ha podido comprobar una correlación entre éstas y los valores de glucemia basal, 2h postglucosa y área glucémica bajo la curva (Hall, 1984). Asimismo al tiempo que algunos estudios realizados, muestran diferencias en los niveles medios de fructosamina entre los grupos con tolerancia normal a la glucosa, intolerancia glucídica y diabetes mellitus (Hall, 1984), otros solo la encuentran entre los sujetos normales y los diabéticos (Baker, 1983; Guillausseau, 1990), no existiendo variación entre los que presentan intolerancia y alguno de los otros dos grupos. La situación es más compleja sin consideramos individuos aislados, pues entonces es frecuente la superposición de valores de fructosamina entre los tres grupos antes referidos. En resumen la fructosamina arroja una buena especificidad (97%) y escasa sensibilidad (19%) como test diagnóstico (Guillausseau, 1990).

Swai y cols. en 1988 en estudios llevados a cabo en Tanzania y comparando fructosamina y glucemia basal como test de despistaje, encuentran pobres resultados para ambos mostrando por lo que a la fructosamina se refiere, una especificidad del 99%, sensibilidad 22% y valor predictivo positivo de 44%. A su vez Baker y cols (1988) en una población de 7094 personas en Kawerau (Nueva Zelanda), llega a la conclusión de la posible utilidad de la fructosamina en el despistaje de la diabetes, cuando se limita a grupos étnicos caracterizados por una mayor prevalencia de dicha enfermedad.

Por último la hemoglobina glicada y la fructosamina, han sido utilizadas en la práctica forense como posibles métodos diagnósticos postmortem de diabetes (Hindle, 1985a; Maruna, 1989).

1.3.2 - GLICACION NO ENZIMATICA EN EL CONTROL DE LA DIABETES.

El control del paciente diabético, debe abarcar en la práctica diaria los siguientes aspectos:

- Buen estado físico y psíquico.
- Peso corporal óptimo.
- Normalización de las alteraciones metabólicas.
 - . Parámetros del metabolismo glucídico: Glucosuria, glucemia basal y/o postprandial, y perfil glucémico.
 - . Parámetros del metabolismo lipídico: Cetonuria, triglicéridos y colesterol.
 - . Parámetros del metabolismo protéico. Proteínas glicadas.

Dentro de las proteínas glicadas, se han barajado como elementos de control la hemoglobina glicada, la fructosamina, proteínas totales glicadas o algunas de sus fracciones plasmáticas. (albúmina glicada, transferrina glicada y fibrinógeno glicado).

A la hora de verificar la existencia de una buena compensación metabólica de la diabetes la **hemoglobina glicada** constituye el parámetro de elección en la clínica habitual, (Goldstein, 1982; Mayer, 1983; Ashby, 1985) o en estudios prospectivos de investigación (DCCT Group, 1987; D'Antonio, 1989).

La citada hemoglobina glicada refleja una integración de la glucemia en relación con la vida media de la hemoglobina, que suele abarcar a 4-8 semanas precedentes (Jovanovic, 1982; Goldstein, 1982; Baynes, 1984).

Se ha comprobado su correlación positiva con la glucemia basal, postprandial (Gonen, 1977), glucosuria de 24 h. (Gabbay, 1976b), colesterol y triglicéridos plasmáticos (Peterson, 1977), habiéndose objetivado como sus variaciones son más sensibles al deterioro que a la mejoría del control glucémico (Verillo, 1983), debido al carácter irreversible de la cetoamina.

Partiendo de los niveles de HbA_{1c}, algunos autores como Nathan y cols. (1984a), han tratado de deducir los niveles de glucemia media previa, calculado mediante la recta de regresión lineal: Glucemia media (mg/dl) = 33,3 x HbA_{1c} (%) - 86, planteamiento rechazado por otros autores (Modan, 1988), al considerar que puede llevar a sobrevaloración o infravaloración de resultados en muchos individuos.

La presencia en el paciente diabético de niveles normales de Hb glicada puede ser un factor predictivo de posibles hipoglucemias, al tiempo que valores elevados de la misma son más frecuentes de hallar en sujetos con mayor duración de su diabetes (Goldstein, 1982).

Los valores de hemoglobina glicada considerados como buen control metabólico, van a estar influidos como es lógico por la metodología utilizada. Goldstein y cols. en 1982 propusieron inicialmente como nivel entre lo ideal y lo posible de una buena compensación metabólica una HbA_{1c} inferior a 9%. Posteriormente se han admitido por diferentes grupos (Schleicher, 1984; Alberti, 1988) como índices de buen control de la diabetes, valores de hemoglobina glicada, inferior a $\bar{X} + 2DS$.

Si bien para la modificación del tratamiento de la diabetes en general y del tratamiento insulínico en particular, es imprescindible la valoración de los perfiles glucémicos del pacientes, en orden a comprobar la marcha evolutiva de su control, la cuantificación de la hemoglobina glicada constituye un método de primera línea (Bunn, 1981b; Tattersall, 1987; Lester, 1989). Es interesante comentar los datos referidos por Larsen y cols. en 1990, en el sentido de que el mero conocimiento de los niveles periódicos de hemoglobina glicada, ejercen una gran importancia en la motivación del paciente y de la consecución de una normalización del control metabólico de su diabetes.

La comprobación por el clínico de niveles glucémicos normales con valores simultáneos elevados de hemoglobina glicada, puede ser debido a la existencia de una diabetes en fase inicial de mejoría metabólica, que aun no ha repercutido en el descenso de dicha proteína, o bien un intento fraudulento del paciente al suministrar resultados falsos de glucemias.

En este último sentido, la cuantificación de esta proteína glicada, se comporta como una verdadera "conciencia crítica" del grado de control metabólico.

Por otra parte, hemos de reseñar como la presencia reiterada en el seno de una diabetes descompensada con niveles hiperglucémicos e hipoglucémicos habituales, puede seguirse de la observación engañosa de valores de hemoglobina glicada próximos a la normalidad, al haberse contrarrestado las oscilaciones glucémicas (Mayer, 1983).

En cuanto a la frecuencia de determinaciones de la proteína anteriormente citada, se han propuesto diferentes pautas, siendo una de las más aceptables la de Singer y cols. (1989) que propone su cuantificación en Diabetes mellitus insulínica (DMID) con terapia insulínica convencional cada 3 ó 4 meses en los mismos pacientes con terapia insulínica intensiva cada 1 ó 2 meses y en Diabetes mellitus no insulínica (DMNID) una vez cada 6 meses. En este último grupo de pacientes, algunos autores como Mc Cance y cols. en 1988, llegaron a considerar superflua la determinación de hemoglobina glicada, ya que pudiera ser sustituida con éxito por la simple glucemia basal.

La **fructosamina**, como índice de glicación no enzimática de proteínas plasmáticas, está en relación con la vida media de las mismas, aceptándose en general que es un reflejo de la glucemia integrada en las 1-3 semanas previas (Lim, 1985; Ashby, 1988). Su concentración se correlaciona positivamente en primer lugar con la glucemia basal, seguida de la glucemia media (Baker, 1985a; Koskinen, 1987) y en menor grado con la glucemia post-ingesta previa (Mosca, 1987).

La fructosamina se ha utilizado en la monitorización del control de la diabetes, tratando de comparar su eficacia con la hemoglobina glicada (Kennedy, 1981; Ross, 1986; Smart, 1988; Howey, 1989). En la evolución del control metabólico del sujeto diabético, las variaciones glucémicas repercuten más rápidamente en la fructosamina que en la hemoglobina glicada (Schleicher, 1984; Ashby, 1988; Winocour, 1989).

Por otra parte, si bien se han comprobado correlaciones aceptables entre HbA_{1c} y fructosamina (Koskinen, 1987; Jerntorp, 1988), éstas son mejores entre proteínas glicadas de similar vida media (fructosamina, albúmina, inmunoglobulinas) (Mosca, 1987).

Las determinaciones de hemoglobina glicada y fructosamina son complementarias (Schleicher, 1984; Koskinen, 1987) ya que reflejan un control a largo (4-8 semanas) y a medio plazo (2 semanas), si bien dado que las frecuencias de consulta de las pacientes, oscila normalmente de 1 a 3 meses, es más pragmático el uso de la hemoglobina glicada (Ashby, 1988).

Existen no obstante situaciones en que puede ser defendible la utilización de la fructosamina como parámetro de control metabólico (Ashby, 1988) como son: Presencia de alteraciones hematológicas (hemoglobinopatías, anemia hemolítica, anemia ferropénica, etc.), embarazo, ya que la periodicidad de las visitas es quincenal, o bien para comprobar cambios en la glucemia a más corto plazo ante la instauración de una nueva terapia.

Se ha propagado su uso debido a que su cuantificación es automatizable, rápida y económica, sin embargo estaría contraindicada en aquellas situaciones asociadas con alteraciones del turnover proteico. (cirrosis, neoplasias, síndrome nefrótico, etc) (Van Dieijen-Visser, 1986a; Ashby, 1988; Dominiczak, 1989).

Finalmente y tratando de valorar conjuntamente los resultados obtenidos mediante la determinación de HbA_{1c} y fructosamina, Henrichs, ha publicado en 1991 un índice o cociente de glicación, (GR, Glycation ratio) cuyo valor superior a 100 refleja la existencia de una evidente descompensación metabólica.

$$GR = \frac{\text{Fructosamina } (\mu \text{ mol/l}) \times 2.2}{\text{HbA}_{1c} (\%)}$$

La albúmina glicada, con una vida media de 19 días (Austin, 1987), refleja los cambios glucémicos de 2-3 semanas previas y muestra una evidente correlación con los niveles de glucemia basal, glucemia media y valor M (Jones, 1983, Ziel 1987; Winocour, 1989).

Winocour y cols. comprobaron en DMID como la albúmina glicada es más sensible que la fructosamina y la hemoglobina glicada a los cambios de la glucemia observados tras la instauración del tratamiento. Por el contrario, Ziel y Davidson (1987) observaron como en los diabéticos estables, los cambios de albúmina glicada son poco acentuados y ofrecen un comportamiento similar a los de la hemoglobina glicada.

La transferrina glicada, cuya vida media es de 7 días (Austin, 1987) ha sido utilizada por Kemp y cols. en 1989 para la valoración de la compensación metabólica en un grupo de 73 niños con DMID, tras 10 días de estancia en una colonia de vacaciones, mostrando ser más sensible a este efecto que la albúmina glicada, con la que no obstante, muestra buena correlación.

El fibrinógeno glicado, proteína de vida media 2,5 días (Austin, 1987), se ha ensayado como reflejo de control glucémico a muy corto plazo, confirmándose un descenso de sus niveles a partir de los tres días de instaurado el oportuno tratamiento en diabéticos recién diagnosticados, antes de que pudiera comprobarse disminución de la hemoglobina y albúmina glicada, con las que por otra parte, presenta una evidente correlación (Hammer, 1989; Ardawi, 1990).

Como curiosidad, es necesario por último referir el hecho de la cuantificación a nivel de pelo (Paisey, 1984) y uñas (Bakan, 1985) de la glicación no enzimática de proteínas, es el resumen integrado de la glucemia preexistente en uno o dos años previos.

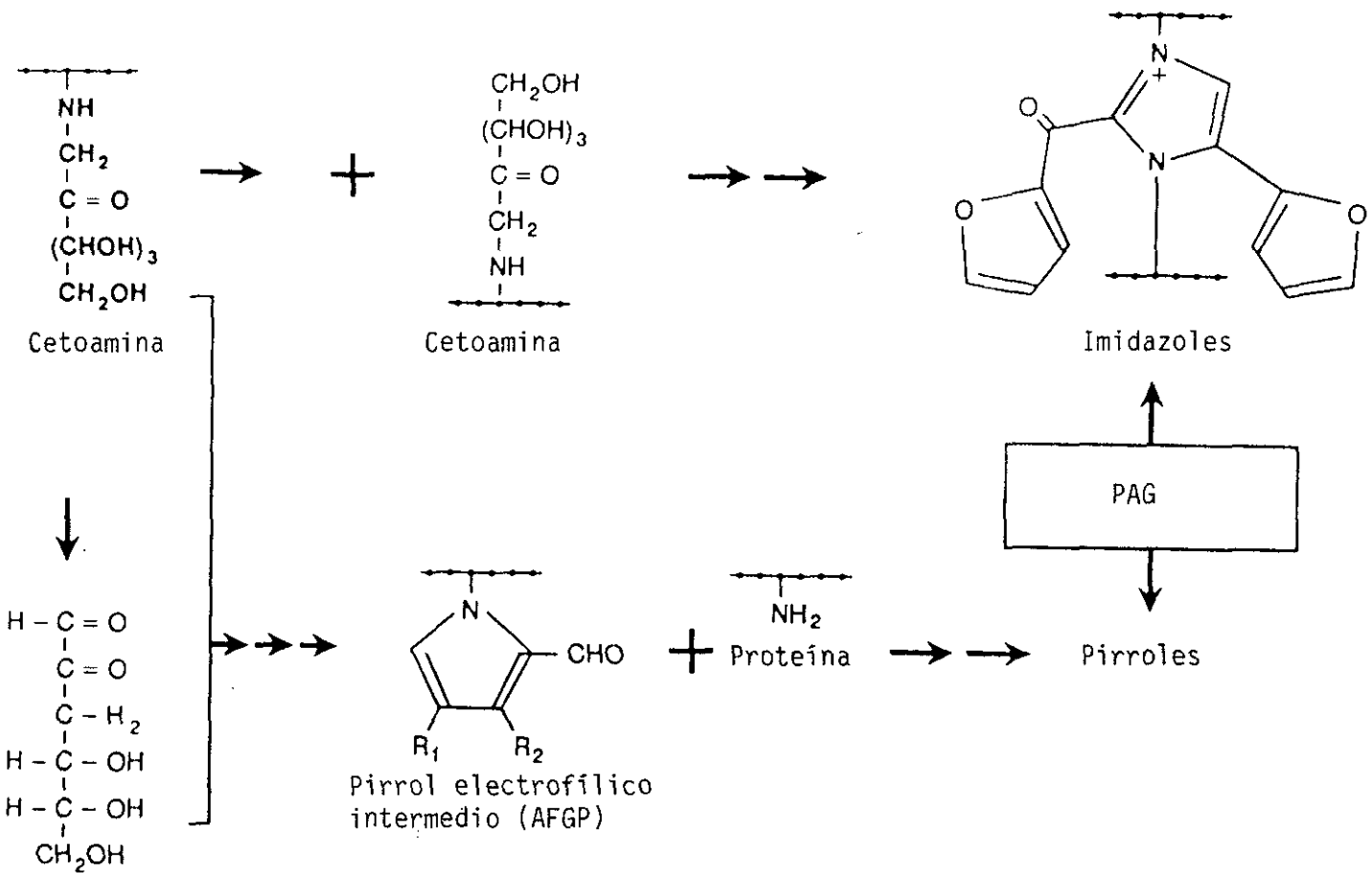
1.3.3 - GLICACION NO ENZIMATICA Y COMPLICACIONES DE LA DIABETES.

La glicación no enzimática de proteínas como hemos descrito al principio origina una cetoamina que puede sufrir posteriores reacciones químicas dependiendo de la vida media de la proteína. Si su turnover es lento, se originan productos avanzados de glicación (PAG) ó "advanced glycosylation end products" (AGE), caracterizados por pigmentación marrón, fluorescencia y capacidad para originar reacciones de entrecruzamiento entre proteínas (cross-linking).

Monnier y cols. en 1984 comprobaron por primera vez que la acumulación de PAG, estaba asociado a la diabetes y a la edad, mediante estudios llevados a cabo en colágeno de dura, circunstancia que se confirmó posteriormente en colágeno de piel, aorta y membrana basal renal (Monnier, 1986).

La identificación química de los PAG ha sido difícil. En virtud de la fluorescencia específica asociada a los complejos PAG-proteínas, Pongor y cols. en 1984 fueron capaces de aislar y determinar la estructura del primer PAG como un 2-furoil-4(5)-(2-furanil)-1H-imidazol (FFI), producto de la condensación de 2 cetoaminas, el cual no obstante solo representa un componente menor del total de PAG encontrados en las proteínas (< 1%). Una mayor fracción de los mismos se formaría a través de una estructura básica intermedia tipo 1-alkil 2-formil, 3, 4-diglucozilpirrol (AFGP) (Brownlee, 1990), que se origina de la reacción entre una cetoamina con el derivado de ésta, 3 desoxiglucosona. (Figura 6).

La glicación no enzimática de proteínas, va a repercutir en diversas complicaciones de la diabetes, tanto en la afectación de proteínas de vida media corta, como en las de vida media larga o presencia de PAG (Dominiczak, 1991). En la tabla 4 se muestran las proteínas en las que se ha objetivado la presencia de glicación, así como las alteraciones funcionales que de ello se derivan.



3 - Deoxiglucosona

Figura 6.- Formación de productos avanzados de glicación (PAG) a partir de cetoamina.

Por lo que a la **glicación de proteínas de vida media corta** se refiere, la repercusión parece materializarse principalmente a diversos niveles tales como:

- Alteración en la unión a ciertas moléculas reguladoras. La hemoglobina glicada reduce su interacción con el 2,3 DPG, con la consiguiente disminución en la liberación de oxígeno (Samaja, 1982). La antitrombina III glicada, dificulta su unión a la heparina, lo que motiva una disminución de su actividad. (Brownlee, 1984).
- Disminución de actividad enzimática. En relación con una doble posibilidad: glicación de la lisina, integrante del centro activo del enzima (ribonucleasas, decarboxilasas, aldolasas, catepsina B, etc.) ó bien cambio de conformación molecular de la proteína (N-acetil-D-glucosaminidasa). (Eble, 1983).
- Descenso en la susceptibilidad a la proteólisis. Fibrina glicada (Brownlee, 1983)
- Desarrollo de inmunogenicidad LDL-glicada (Witztum, 1983).

En cuanto a las **proteínas de vida media larga o estructurales**, la formación de productos avanzados de glicación (PAG) a los que antes hemos hecho referencia, van a condicionar una serie de alteraciones morfológicas y funcionales que ahora comentaremos (Brownlee, 1988; Dominiczak, 1991).

- Entrecruzamiento de proteínas plasmáticas extravasadas con componentes de la matriz colágena. A nivel arterial, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) atraviesan la íntima y quedan atrapadas en el seno de la pared vascular, al unirse a la matriz colágena mediante los PAG. (Brownlee, 1985). Esto parece favorecer como es obvio al desarrollo de la arteroesclerosis en el paciente diabético.

TABLA 4

ALTERACIONES FUNCIONALES DE DIFERENTES PROTEINAS GLICADAS

PROTEINA	ALTERACION FUNCIONAL
HEMOGLOBINA	Intercambio oxígeno.
MEMBRANA ERITROCITARIA	Deformabilidad eritrocitaria disminuida y rigidez aumentada.
PROTEINAS PLASMATICAS	
Albúmina	Disminuida capacidad de unión a sustancias apolares, alteración en la regulación osmótica.
Lipoproteínas	
LDL	Disminución de degradación.
HDL	Aceleración del catabolismo.
Fibrinógeno	Aumento de viscosidad y coagulación.
Fibrina	Resistencia proteolítica aumentada frente a plasmina.
Antitrombina III	Disminución de actividad inducida por heparina.
Fibronectina.	Disminución de afinidad hacia colágeno y fibrina.
ENZIMAS	
Ribonucleasa	Inhibición.
Catepsina B	"
Papaina	"
N acetil BD glucosaminidasa	"
INSULINA	Disminución de afinidad por el receptor.
FERRITINA	?
QUERATINA	?
FETUINA	?
PROTEINAS OSEAS.	Disminución de capacidad de fijar Ca ⁺⁺
PROTEINAS DE MEMBRANA DE CELULAS ENDOTELIALES.	Integridad de la pared vascular.

TABLA 4 (continuación)

ALTERACIONES FUNCIONALES DE DIFERENTES PROTEINAS GLICADAS

PROTEINA	ALTERACION FUNCIONAL
COLAGENO	
Membrana basal de pequeños vasos (tipo IV)	Aumento de permeabilidad, depósito de proteínas solubles, disminución de susceptibilidad protéica.
Tendones (tipo I)	Disminución de elasticidad.
Aorta (tipo I y III)	" " "
CRISTALINO	Opacificación.
PROTEINAS NEURALES	
Mielina	Aumento de degradación, disminución de conducción eléctrica en nervios periféricos.
Tubulina	Formación alterada de citoesqueletos de las células nerviosas.
ACIDOS NUCLEICOS	Alteraciones cromosómicas, rupturas de cadenas de DNA, mutaciones, defectos de transcripción, etc.

Modificado de Krantz y cols. 1986

A nivel microvascular, albúmina, IgG e IgM se acumulan en la membrana basal PAS +, riñón, retina, vasos endoneurales, etc. uniéndose a la matriz proteica a través de PAG. y originando como consecuencia estrechamiento luminal, formación de inmunocomplejos y liberación de radicales libres con acción tóxica tisular (Brownlee, 1990).

- Entrecruzamiento entre sí de los componentes insolubles de la matriz colágena. Como resultado de la interacción de PAG con las proteínas insolubles de la matriz, se forman uniones covalentes termoestables entre ellas, lo que va a propiciar la aparición de las siguientes manifestaciones:

- . Interferencia en la conformación estructural de la membrana basal.
- . Disminución de la susceptibilidad de la matriz protéica a sufrir degradación enzimática.
- . Hipertrofia e hiperplasia celular por disminución irreversible en la afinidad de unión de heparan sulfato (inhibidor de crecimiento).

Como consecuencia final de estos cambios, surgirán a nivel vascular cambios tales como; engrosamiento y rigidez parietal, disminución luminal y aumento de permeabilidad.

- Interacción de PAG con receptores específicos macrofágicos. (Figura 7). Los PAG. se ligan a receptores macrofágos, constituidos por dos subunidades peptídicas (83.000 y 36.000 c/daltons) induciendo la síntesis y secreción de citoquinas tales como: IL-1 (Interleukina 1) y caquectina/TNF (tumor necrosis factor); las cuales pueden actuar por diferentes mecanismos:

- . Estimulo de células mesenquimales, liberándose colagenasas y proteasas extracelulares que intervienen en la degradación de la matriz tisular proteica.

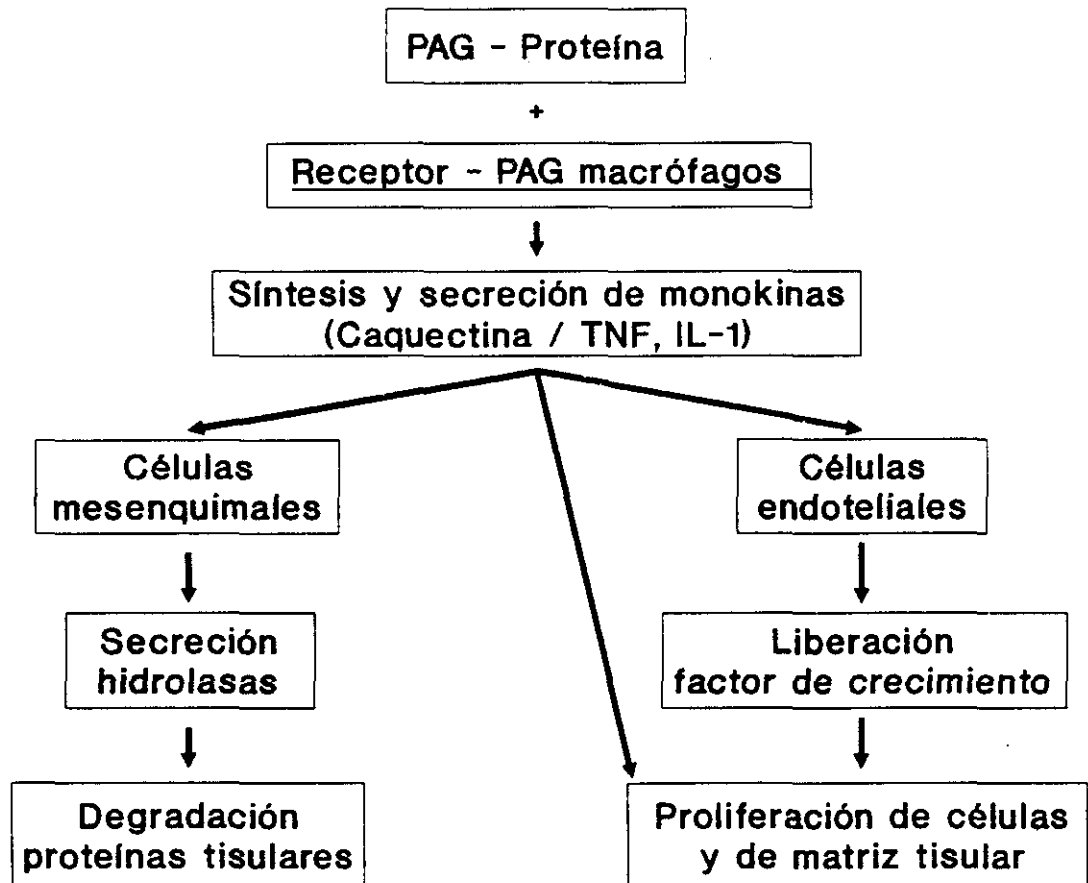


Figura 7.- Interacción de PAG con receptores específicos macrofálicos.

- . Proliferación celular (fibroblastos, células mesangiales y células musculares lisas) e incremento de la síntesis de colágeno tipo I, II y IV, a través de una acción directa de las citoquinas ó de un estímulo de las células endoteliales que originan liberación de factores de crecimiento.
- . El TNF unido a receptores específicos de la superficie de las células endoteliales, induce al desarrollo de cambios procoagulantes y a un incremento de la permeabilidad vascular (Brownlee, 1990).

En resumen, podemos comprobar como en la citada interacción entre PAG. y receptores de macrófagos se produce un equilibrio entre dos fenómenos contrapuestos de deposición y degradación de complejos PAG-proteínas a nivel de la pared vascular. Con la edad y elevación de los niveles glucémicos, el equilibrio antes comentado se rompe, al dificultarse el fenómeno de degradación y se produce una acumulación progresiva de los precitados productos, lo que constituye un elemento patogénico importante en el desarrollo de las complicaciones vasculares de la diabetes, y posiblemente en el propio proceso de envejecimiento (Schnider, 1980; Cerami, 1988).

- Efecto de PAG. en la estructura y función del ADN. Los PAG. formados a partir de los grupos aminos de las bases de los correspondientes nucleótidos, originan a nivel nuclear una serie de alteraciones que podemos resumir en:

- . Alteraciones cromosómicas.
- . Aumento de frecuencia de mutaciones.
- . Disminución de expresividad genética.

Estos eventos pueden en parte servir de explicación de una mayor morbilidad cancerosa en la diabetes, o de una mayor frecuencia de malformaciones congénitas en hijos de madres diabéticas.

Dado que la glicación no enzimática de proteínas, puede ser un factor importante en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes (Cerami, 1988; Brownlee, 1990) y posiblemente en el propio envejecimiento (Schnider, 1980) se vienen describiendo diferentes productos o fármacos en orden a frenar esta vía metabólica. Así, un derivado hidrazínico, la aminoguanidina, parece bloquear selectivamente los grupos carbonilo reactivos en las fases tempranas de glicación, inhibiendo la formación posterior de PAG y su correspondiente entrecruzamiento con proteínas plasmáticas solubles ó con la matriz protéica colágena (Brownlee, 1986).

En experimentos recientes, Brownlee y cols. (1990) comprobaron en ratas diabéticas aloxánicas, como la administración de aminoguanidina (25 mg/Kg peso) se sigue de una disminución del contenido de PAG. y de entrecruzamientos de proteínas solubles e insolubles del colágeno a nivel de tejido aórtico y de la membrana basal glomerular, así como del engrosamiento de la citada membrana.

La vitamina E, a dosis de 1200 mg/día, reduce la glicación de proteínas en sujetos diabéticos, independientemente de los cambios de glucosa, debido a una inhibición de la primera etapa de la reacción de Maillard (Ceriello, 1991). La acción parece, estar basada en la capacidad antioxidante de la vitamina E, que interfiere la autooxidación de la glucosa, mecanismo participante en la formación de enlaces covalentes de la glucosa con las proteínas.

Con anterioridad se han notificado en estudios in vivo e in vitro, como la vitamina C, también agente antioxidante parece reducir la glicación no enzimática de proteínas. (Stolba, 1987)

En el mismo sentido, se ha barajado el posible empleo de ácido acetilsalicílico y lisina, si bien ésta última no parece de entrada ser aceptable por los efectos tóxicos que conlleva la hiperlisinemia (Ceriello, 1984).

1.4 - GLICACION NO ENZIMATICA EN LA GESTANTE DIABETICA.

El término de gestante diabética, engloba dos tipos fundamentales de pacientes, las denominadas diabéticas pregestaciones (DP) cuyo trastorno metabólico es previo a la instauración del embarazo, y las diabéticas gestaciones (DG), en las que el diagnóstico del referido proceso tiene lugar durante la gestación.

De manera similar a lo que se ha comentado en la diabetes en general, en la gestante diabética la cuantificación de las proteínas glicadas se ha venido considerando bajo dos aspectos: control metabólico de la diabetes (pregestacional y gestacional) y test de despistaje de la diabetes gestacional.

1.4.1 - CONTROL METABOLICO DE LA DIABETES.

La diabetes condiciona una alteración metabólica compleja que distorsiona el medio ambiente en que el feto se desarrolla llevando a la aparición de un incremento de la mortalidad fetal perinatal y de determinadas complicaciones neonatales: malformaciones congénitas, macrosomía, hipoglucemia, policitemia, etc. (Freinkel, 1980).

Esta mortalidad y morbilidad fetal, ha descendido crecientemente desde la instauración de la insulino-terapia intensiva que ha conllevado a un mejor control metabólico, sin olvidar por otra parte el importante papel jugado por las nuevas técnicas de vigilancia y monitorización fetal (Gabbe, 1986).

Dejando a un lado la opinión aislada de algunos autores como Leveno y cols. (1979), la mayoría de ellos parece confirmar como de un más estricto control metabólico de la diabetes, se sigue de un mejor porvenir fetal (Karlson, 1972; Jovanovic, 1980; Reece, 1988; Pallardo, 1990a). Así, Karlsson y Kjellmer en 1972 observaron como la mortalidad fetal se relacionó con los niveles de glucemia media durante el tercer trimestre, siendo de 23,6, 15,3 y 3,8% cuando estas fueron de > 150, 100 a 150 y < 100 mg/dl, respectivamente. Jovanovic y Peterson en 1980 por su parte, comprobaron como con una glucemia media durante la gestación de 84 mg/dl el riesgo de mortalidad fetal en diabéticas pregestaciones es similar al que se establece en la población general. En cuanto a la morbilidad fetal, parece objetivarse como la euglucemia estricta en diabéticas pregestacionales se sigue de una práctica ausencia de la misma (Gabbe, 1986).

El control metabólico de la gestante diabética, para ser efectivo debería abarcar las siguientes fases:

a) **Control preconcepcional.**

El control de la diabetes en el momento de la fecundación y en las ocho primeras semanas de gestación (período de embriogénesis) es indispensable para evitar la posible aparición de anomalías congénitas fetales, ya que independientemente de otros factores metabólicos ó vasculares, parece ser la hiperglucemia el factor condicionante fundamental de la teratogénesis (Grace, 1989;

Sadler, 1989). De aquí el interés y la importancia en la creación de clínicas preconcepcionales, encargadas de programar y planificar las gestaciones de todas aquellas mujeres diabéticas de edad fértil, con objeto de conseguir una normoglucemia previa a la instauración del embarazo (Steel, 1988).

b) Control gestacional.

Resulta imprescindible para corregir la hiperglucemia materna y demás alteraciones metabólicas presentes en el transcurso del embarazo. El paso transplacentario de glucosa y otros metabolitos, tales como aminoácidos gluconeogénicos (alanina) de madre al feto, originan un hiperinsulinismo fetal (Freinkel, 1980), factor básico en la génesis de las manifestaciones de morbilidad fetal en el hijo de madre diabética, tales como macrosomía, síndrome de distress respiratorio, hipoglucemia, etc. (Susa, 1984; Coustan, 1986).

c) Control parto.

Es preciso tener en cuenta que niveles glucémicos elevados en el parto inmediato, pueden potenciar el anteriormente citado hiperinsulinismo fetal, contribuyendo a una mayor frecuencia de hipoglucemia neonatal. De aquí la trascendencia de una adecuada normalización de la glucemia en esta circunstancia.

En la valoración del control metabólico de la diabetes durante el embarazo, se han barajado los siguientes parámetros.

- **Glucosurias.** Su determinación carece de valor en la gestación, dada la disminución del umbral renal para la glucosa en esta situación.

- **Cetonurias.** De interpretación en ocasiones equívoca, pueden traducir la presencia de una descompensación metabólica de la diabetes, o bien la falta de aporte de carbohidratos en la dieta.
- **Glucemia basal y/o postprandial.** Constituyen determinaciones aisladas que no reflejan el grado de control de la diabetes, ni para ajustar exactamente su tratamiento.
- **Perfil glucémico.** Constituye el método fundamental para juzgar la situación metabólica de la gestante diabética. Se lleva a cabo, por la propia paciente mediante tiras reactivas de glucosa-oxidasa (autocontrol glucémico) (Espersen, 1985), verificándose el resultado por lectura visual, o a través de un reflectómetro.

A la hora de analizar los perfiles glucémicos es importante considerar los adecuados criterios de control metabólico, siendo los más aceptados los establecidos por Skyler y cols. en 1981 (Tabla 5).

- **Péptido C en líquido amniótico.** La cuantificación del mismo con motivo de las amniocentesis practicadas en diabéticas pregestacionales para evaluar la madurez pulmonar fetal, constituye un evidente reflejo del hiperinsulinismo del hijo de madre diabética y por lo tanto del mal control metabólico materno (Sosenko, 1979; Diez, 1988).
- **Proteínas glicadas.** La valoración de diferentes proteínas glicadas (hemoglobina glicada, fructosamina, albúmina glicada, etc) a lo largo del embarazo en diabéticas gestacionales y pregestacionales, ha proporcionado diversa información sobre el grado de control metabólico de la diabetes (Fadel, 1979; Leiper, 1985; Nelson, 1985; Morris, 1986a; Grande, 1989).

TABLA 5

CRITERIOS DE CONTROL METABOLICO

GLUCEMIA	mg/dl
Basal	60-90
Preprandial	60-105
1 h postprandial	70-140
2 h postprandial	60-120
2:00 am - 4:00 am	> 60

Skyler y cols. 1981

Asimismo, son numerosos los estudios que han tratado de relacionar en gestantes diabéticas los niveles de hemoglobina glicada con la presencia de gestosis (Cardona, 1982), abortos espontáneos (Miodovnik, 1986; Hanson, 1990), retraso en el crecimiento fetal, (Pedersen, 1984), macrosomía (Widness, 1978; Madsen, 1981; Ylinen, 1981), malformaciones congénitas (Miller, 1981; Mills, 1988; Greene, 1989), patología placentaria (Firpo, 1981).etc.

En cuanto a la cuantificación de la hemoglobina glicada en la gestante normal, se han referido en la literatura valores inferiores (Lind, 1979), superiores (Schwartz, 1976; Vintzileos, 1980; Pallardo, 1981) y generalmente iguales (Leslie, 1978; Pollak, 1979; John, 1985a) a los hallados en mujeres no gestantes, habiéndose discutido en ocasiones la posible influencia del paso transplacentario hemoglobina fetal (HbF) que podría interferir en determinadas metodologías: (cromatografía de intercambio iónico, electroforesis, etc.), incrementando los niveles de HbA₁, ó HbA_{1c} (Schwartz, 1976; Kjaergaard, 1979). El problema puede ser resuelto usando métodos en los cuales los niveles de HbF no interfieren (cromatografía de afinidad, HPLC, isoelectroenfoque, TBA) (Goldstein, 1986).

Los estudios realizados en sangre de cordón, suelen mostrar correlación con los correspondientes valores en sangre materna (Sosenko, 1982; Zeller, 1983), aunque significativamente disminuidos. Este descenso de hemoglobina glicada a nivel fetal, se ha tratado de explicar por diferentes factores (Worth, 1983; Pollak, 1986): mayor tasa de producción de eritrocitos y menor vida media de los mismos, descenso en la glucemia, acetilación previa de la hemoglobina fetal en un 10-20% que impide su posterior glicación, etc.

En cuanto a las proteínas plasmáticas glicadas no parecen ser diferentes entre gestantes normales y mujeres no gestantes (Frandsen, 1988) observándose al igual que con la hemoglobina glicada, valores inferiores de las mismas en sangre fetal en relación con sangre materna (Pollak, 1986).

1.4.2 - DESPISTAJE DE LA DIABETES GESTACIONAL.

Se considera diabetes gestacional, la intolerancia glucídica de intensidad variable que aparece o se reconoce durante el embarazo, independientemente del tipo de tratamiento, o de su persistencia después de finalizado el mismo (Second International Workshop Conference on Gestational Diabetes Mellitus, 1985).

Esta clase de diabetes afecta alrededor del 3% de la población gestante (Braverman, 1988) oscilando su prevalencia en relación con la estrategia diagnóstica utilizada. Si bien, en menor grado, que la diabetes pregestacional, puede dar lugar asimismo a diversas complicaciones fetales: macrosomía, hipoglucemia, policitemia, etc., al tiempo que constituye a su vez un factor de riesgo, en orden al posible desarrollo posterior en la mujer de una diabetes mellitus; de ahí la importancia de su detección y tratamiento oportuno. O'Sullivan comprobó en 1984 un seguimiento de 22 a 28 años, como el 50% de diabéticas gestacionales desarrollaban diabetes mellitus, frente a cifras del 7% en gestantes normales.

En el diagnóstico de la diabetes gestacional, previamente a la sobrecarga oral de glucosa, se realiza un test de despistaje (TD), mediante el cual se selecciona a la gestante que debe ser sometida a la referida sobrecarga.

Como test de despistaje se han utilizado la valoración de ciertos factores de riesgo, deducibles de la historia previa de la gestante, o bien la cuantificación de parámetros bioquímicos tales como: glucemia basal, al azar o postprandial, glucemia 1 hora después de la administración oral de 50 g. de glucosa o test de screening de glucosa clásico (TS) y valoración de proteínas glicadas. La utilidad de los diferentes tests de despistaje ha sido ampliamente discutida (O'Sullivan, 1973; Lavin, 1985), siendo el protocolo diagnóstico más admitido en la actualidad, el recomendado por el Second International Workshop Conference on Gestational Diabetes que consiste en:

- Realización a todas las gestantes a las 24-28 semanas de embarazo, un test de screening de glucosa. Se considera positivo este test, cuando la glucemia obtenida a la hora de la administración de la glucosa es igual o superior a 140 mg/dl.

- En los casos positivos, se practica posteriormente una sobrecarga oral de 100 g. de glucosa considerándose diagnóstico de diabetes gestacional cuando se cumplen los criterios de la tabla 6 que son los establecidos por el National Diabetes Data Group en 1979 (58), adaptados y modificados de los de O'Sullivan y Mahan, en 1964.

Con objeto de aumentar la rentabilidad diagnóstica, en los últimos años, se vienen realizando diferentes estrategias (Corcoy, 1988; Diez, 1989) siendo la de nuestro grupo la que recoge la figura 8.

Por lo que respecta al papel de las proteínas glicadas como test de despistaje, existen en la literatura un amplio número de trabajos llevados a cabo con la cuantificación de hemoglobina glicada y fructosamina, que junto a algunos resultados que manifiestan cierta utilidad (Morris, 1986b; Roberts, 1986), existen otros, tal vez la mayoría que arrojan una respuesta negativa (Cousins, 1984; Mc Farland, 1984; Bourgeois, 1986; Comtois, 1989), si bien dadas las peculiaridades de los diferentes estudios, es difícil obtener una conclusión definitiva.

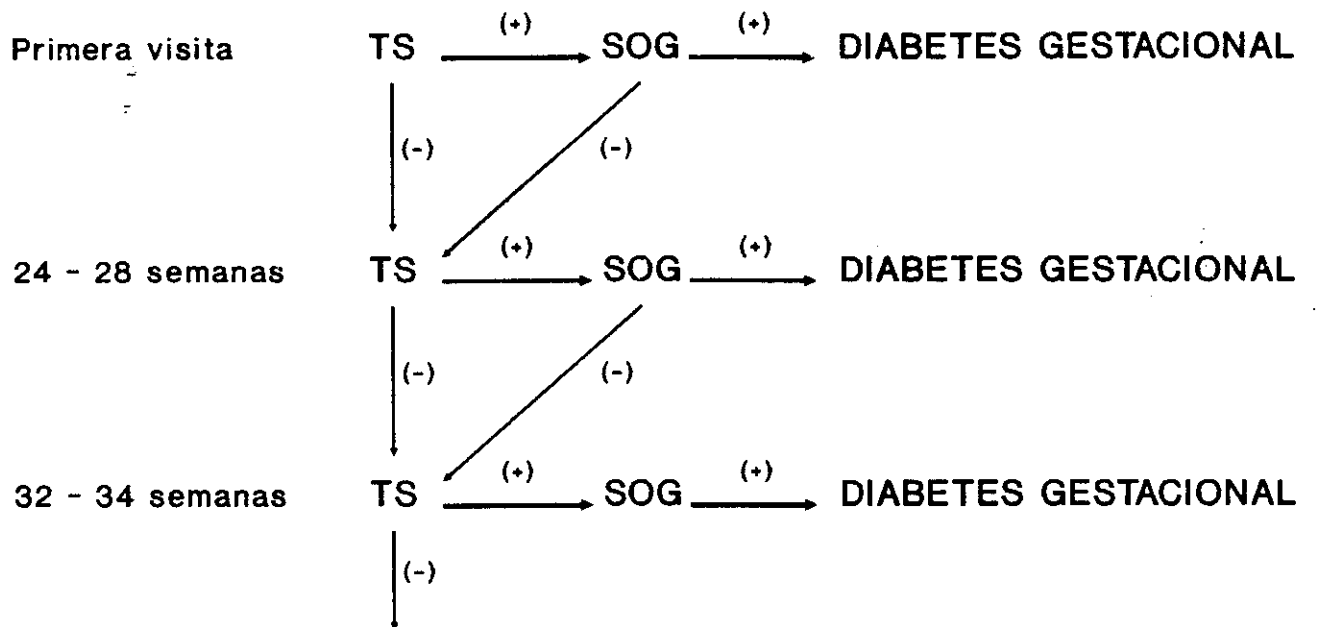


Figura 8.- Estrategia diagnóstica de la diabetes gestacional.

2.- OBJETIVO DEL TRABAJO.

La glicación no enzimática de proteínas es una vía de metabolización de la glucosa en ausencia de actividad insulínica, que en el paciente diabético viene adquiriendo gran relevancia en los últimos años como parámetro de control metabólico y diagnóstico de la diabetes, al tiempo que como posible mecanismo patogénico de las complicaciones específicas (microangiopatía y neuropatía) e inespecíficas de la diabetes (arteroesclerosis).

Desde el punto de vista de evaluación del control metabólico y del diagnóstico se vienen manejando la determinación de la hemoglobina glicada (HbA_{1c}, HbA_{1c}, hemoglobina glicada total, etc.) ó de las proteínas plasmáticas glicadas (fructosamina, proteínas totales glicadas, albúmina glicada etc.) de acuerdo con diferentes métodos de cuantificación.

El embarazo en la mujer diabética, previamente conocida (diabetes pregestacional), constituye una situación en la que el estricto control del trastorno metabólico es vital para el porvenir fetal, influyendo directamente en la mortalidad fetal y en la existencia de complicaciones tales como malformaciones congénitas, macrosomía, hipoglucemia, síndrome de distress respiratorio, hipocalcemia, etc.

Asimismo el embarazo, puede ser el momento preciso en que se detecta por primera vez la existencia de una diabetes (diabetes gestacional) que si bien en menor cuantía que la diabetes pregestacional, también entraña un efecto negativo en cuanto a las perspectivas fetales, por lo cual el diagnóstico y tratamiento precoz de la misma constituye un objetivo de gran trascendencia sanitaria.

Los objetivos de la presente tesis son:

- A) Estudio de la utilidad de las diferentes proteínas glicadas como parámetro de control de la diabetes durante el embarazo, tanto por lo que se refiere a la diabetes pregestacional como a la diabetes gestacional.

- B) Relación de las proteínas glicadas con determinados aspectos de la morbilidad fetal (malformaciones congénitas, macrosomía, etc.).

- C) Análisis de las diferentes proteínas glicadas en la estrategia diagnóstica de la diabetes gestacional.

3.- MATERIAL Y METODOS.

3.1 - PROTOCOLOS DE ESTUDIO.

3.1.1 - PROTOCOLO A.

VALORACION DE GLUCEMIA Y PROTEINAS GLICADAS A LO LARGO DEL EMBARAZO EN GESTANTES NORMALES, DIABETICAS GESTACIONALES Y DIABETICAS PREGESTACIONALES.

-
-

Se estudiaron durante el período 1989-90 los siguientes grupos de gestantes.

3.1.1.1 - GESTANTES NORMALES (GN).

Estudiamos 40 gestantes, de edades comprendidas entre 18-34 años ($26,1 \pm 4$), sin alteración de la tolerancia glucídica, descartada mediante una sobrecarga oral de glucosa (SOG). Esta se realizó administrando en ayunas 100 gr. de glucosa oral y cuantificando la glucemia en los tiempos 0, 60, 120 y 180 minutos. Se consideró normal con niveles glucémicos en todos los tiempos inferiores a los expresados en la tabla 6.

Se valoraron en intervalos de dos semanas desde la primera visita hospitalaria, hasta el final del embarazo (8 a 36 semanas), los parámetros que figuran en la tabla 7.

TABLA 6

CRITERIOS DIAGNOSTICOS DE DIABETES GESTACIONAL*
(100 g. de glucosa)

	Tiempo (minutos)			
	0	60	120	180
Glucemia (mg/dl)	105	190	165	145

* 2 ó mas valores iguales o superiores.

TABLA 7
PARAMETROS ESTUDIADOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS

GRUPOS	PERIODOS (semanas)	PARAMETROS										
		GB	GP*	GM*	HbA _{1c}	GHb	F	Fc	PG	AG	PT	A
Gestantes normales	8 - 36	*	-	-	*	*	*	*	*	*	*	*
Diabéticas gestacionales	20 - 36	*	*	-	*	*	*	*	*	*	*	*
Diabéticas pregestacionales	8 - 36	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

GP* Glucemia postprandial (2h. después del desayuno)

GM* Glucemia media. Valores medios de glucemia. (Autocontrol domiciliario)

3.1.1.2 - DIABETICAS GESTACIONALES (DG).

Este grupo incluía 74 gestantes diagnosticadas de diabetes gestacional mediante SOG, cuyas edades oscilaban entre 20-38 años ($28,4 \pm 4,5$). Se consideran criterios confirmativos de este diagnóstico los referidos en la tabla 6.

Se valoraron, en intervalos de dos semanas desde el momento del diagnóstico hasta el final del embarazo, recogiendo datos desde la 20 a la 36 semanas, los parámetros que figuran en la tabla 7.

3.1.1.3 - DIABETICAS PREGESTACIONALES. (DP)

Se estudiaron 32 pacientes, de edades comprendidas entre 21-32 años ($27,2 \pm 3,8$), diagnosticadas de diabetes antes del embarazo y distribuidas según la clasificación de White, 1971 en: Clase B (n = 11), Clase C (n = 5), Clase D (n = 12) y Clase F (n = 4).

En ellas se determinaron secuencialmente los parámetros que se indican en la tabla 7, desde el inicio del control metabólico, hasta el final de la gestación, recogiendo datos de la 8 hasta la 36 semanas, fecha a partir de la cual se programó normalmente el parto de estas gestantes.

Las diabéticas gestacionales y pregestacionales se trataron todas con dieta, adaptando el aporte calórico a las necesidades energéticas de la paciente, en relación fundamental con el peso corporal. El reparto de los diferentes principios inmediatos se adecuó a los siguientes porcentajes con respecto al valor calórico total: Hidratos de carbono 50%, grasas 25-30% y proteínas 20-25%.

Las diabéticas gestacionales se trataron con insulino-terapia cuando a pesar del régimen dietético, la glucemia basal fué ≥ 105 mg/dl. ó la glucemia postprandial ≥ 120 mg/dl. ó bien en presencia de macrosomía fetal o hidramnios detectados por la ecografía. La dosis media inicial de insulina administrada fué de 0.25 U/Kg./día, repartida en dos dosis de insulina de acción intermedia (desayuno-merienda).

Las diabéticas pregestacionales precisaron todas de tratamiento insulínico. La dosis inicial media fué de 0,7 U/Kg./día en el primer trimestre, para ir luego incrementándose a lo largo de la gestación. La pauta más utilizada fueron tres dosis de insulina de acción rápida en desayuno-comida-cena, suplementados ocasionalmente en cena, con una dosis de insulina de acción intermedia.

Las diabéticas gestacionales y pregestacionales se controlaron cada dos semanas en la Unidad de Diabetes y Embarazo del Hospital "La Paz", conjuntamente por el diabetólogo y el obstetra, adecuándose el tratamiento insulínico a los resultados del autocontrol glucémico domiciliario obtenido mediante tiras reactivas de glucosa-oxidasa BM-Test glycemie 20-800 R (Boehringer Mannheim) o Glucostix (Ames-Bayer).

3.1.2 - PROTOCOLO. B.

RELACION DE PROTEINAS GLICADAS CON MORBILIDAD FETAL.

3.1.2.1 - MACROSOMIA FETAL.

Se estudiaron en 25 diabéticas pregestacionales, de las incluídas en el protocolo A, las diferencias de los niveles de proteínas glicadas obtenidas en el tercer trimestre (28-37 semanas): HbA_{1C}, fructosamina (F), fructosamina corregida (Fc), proteínas totales glicadas (PG)

y albúmina glicada (AG) entre los subgrupos que presentaron o no macrosomía fetal. Se consideró a su vez en cada uno de los subgrupos la existencia o no de valculopatía en general o de nefropatía en particular. Se utilizó el término macrosomía fetal, de acuerdo con los criterios de la Universidad de Colorado (3), homologándolo en nuestro estudio al de LGA (large for gestational age).

Se correlacionó asimismo los niveles de proteínas glicadas referidas anteriormente con el índice ponderal fetal, en el grupo reseñado, así como en 61 diabéticas gestacionales pertenecientes al ya mencionado protocolo A. El índice ponderal fetal (IPF) se obtuvo dividiendo el peso del recién nacido por el correspondiente al percentil 50, para su sexo y edad gestacional, acudiendo para ello a las tablas de Grande y Arguelles, 1974.

Con objeto de ampliar la casuística, estudiamos las 152 diabéticas pregestacionales controladas en nuestro Hospital durante los años 1983-90 en las que analizamos los valores de HbA_{1c} obtenidos en el 3^{er} trimestre (> 27 semanas), tratando de relacionarlos con la existencia de macrosomía, considerándose la asociación o no de vasculopatía en general y nefropatía en particular.

3.1.2.2 - MALFORMACIONES CONGENITAS.

Se revisaron 73 diabéticas pregestacionales estudiadas en el periodo 1983-90 relacionando los niveles de HbA_{1c} durante el primer trimestre (1-13 semanas) con la existencia o no de malformaciones congénitas, considerando como factor corrector de su aparición la presencia o no de valculopatía específica en general y de nefropatía en particular.

3.1.2.3 - MADUREZ PULMONAR FETAL.

Se cuantificaron en 66 diabéticas pregestacionales, controladas en los años 1983-90, el índice lecitina/esfingomielina (L/E) y el fosfatidil glicerol (PG) en líquido amniótico obtenido mediante amniocentesis practicada entre la 32 a 38 semanas, tratando de relacionar los valores con la calidad del control metabólico establecido a partir de los niveles de HbA_{1c} del mismo período.

Este grupo se comparó con 52 gestantes controles a las que se les practicó amniocentesis, por indicación médica, en similar período gestacional.

Se consideró surfactante pulmonar maduro un índice L/E $\geq 2,7$, y la presencia de PG.

A la hora de relacionar la morbilidad fetal (macrosomía, malformaciones congénitas, inmadurez pulmonar fetal) con la calidad del control metabólico, admitimos como buen control niveles de HbA_{1c} $< 6\%$, y ausencia de hipoglucemias, y mal control HbA_{1c} $\geq 6\%$.

3.1.3 - PROTOCOLO C.

ANALISIS DE LAS PROTEINAS GLICADAS EN LA ESTRATEGIA DIAGNOSTICA DE LA DIABETES GESTACIONAL.

3.1.3.1. APARTADO A.

Se comparó durante el 2º trimestre de gestación (14-27 semanas) el comportamiento de las proteínas glicadas (HbA_{1c}, GHb, F, Fc, PG y AG) en dos grupos de pacientes:

- 39 gestantes normales (SOG normal)
- 18 diabéticas gestacionales.

Se consideraron asimismo como parámetros a valorar: Glucemia basal (GB), suma de valores glucémicos (ΣG) y el área bajo la curva (ABC). Esta se determinó de acuerdo a la fórmula $A+2B+2C+D$ donde A, B, C y D son las glucemias basal, 1 hora, 2 horas y 3 horas respectivamente tras la sobrecarga oral de glucosa. (Roberts, 1988).

Se estudió por otra parte, la utilidad de la determinación de las proteínas glicadas como test de despistaje (TD) en el diagnóstico de la diabetes gestacional, acudiendo al análisis de las curvas ROC (Receiving operating characteristics curve) o curvas de rendimiento diagnóstico (CRD) (Richardson, 1985; Redondo, 1989). Dichas curvas se calcularon a partir de los valores obtenidos de la sensibilidad (%) en ordenadas y de $100 - \text{especificidad} (\%)$ en abcisas a diferentes niveles críticos.

3.1.3.2. - APARTADO B.

Se compararon los valores hallados para las diferentes proteínas glicadas (HbA_{1c} , GHb, F, Fc, PG y AG) en 212 gestantes con TS negativo y 70 gestantes con TS positivo.

El TS se realizó administrando en ayunas 50 gr. de glucosa por vía oral y determinando la glucemia a los tiempos 0 y 60 minutos.

Se consideró positivo con valores glucémicos ≥ 140 mg/dl. a los 60 minutos.

3.2. - METODOS ANALITICOS.

3.2.1. - GLUCOSA.

La glucemia se cuantificó por el método enzimático de la hexoquinasa (Schmidt, 1971). La técnica se realizó incubando a 20°-25° durante 15 minutos 20 μ l de suero con 2 ml. de reactivo que contiene: Tampón fosfato 70 mmol/L, pH 7.7; Mg 4 mmol/L; NADP 1.3 mmol/L; HK \geq 1.1 u/ml y G6PDH \geq 1.9 u/ml.

El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fueron de 1.7% y 2.5% respectivamente.

3.2.2. - PROTEINAS GLICADAS.

3.2.2.1. - REVISION DE METODOS.

Se han descrito una gran variedad de métodos para la cuantificación de las proteínas glicadas (Mayer, 1983; Goldstein 1986; Armbruster, 1987; Bernstein 1987), que quedan resumidos en la tabla 8.

A - CROMATOGRAFIA.

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

Desde que la HbA₁ fué aislada mediante cromatografía sobre Bio-Rex 70 (Allen, 1958), el uso de esta resina de intercambio catiónico ha sido el método mas aplicada para su cuantificación, y por consiguiente el estandar con el que se comparan los demás.

METODOS DE CUANTIFICACION DE PROTEINAS GLICADAS

CROMATOGRAFIA

- CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO.

* Minicolumna.

* HPLC

- CROMATOGRAFICA DE AFINIDAD.

FOTOMETRIA

- COLORIMETRIA.

- FLUOROMETRIA.

ELECTROFORESIS.

- AGAR GEL.

- ISOELECTROENFOQUE

INMUNOENSAYO.

- RADIOINMUNOENSAYO.

- ENZIMOINMUNOENSAYO.

El procedimiento fue originalmente desarrollado por Trivelli y cols en 1971 y modificado y simplificado más tarde por otros autores (Kynoch, 1977; Welch 1978).

Hoy día se usan dos modalidades, minicolumnas desechables o cromatografía líquida de alta resolución. El fundamento es el mismo para ambas, y se basa en el cambio de carga que experimenta la hemoglobina, cuando se le une un resto azúcar en el grupo amino terminal de la cadena beta. Así, a pH neutro, es menos positiva que la HbA₀ y se liga con menos fuerza a una resina cargada negativamente.

Hasta ahora la mayoría de las minicolumnas separaban solamente la fracción A₁, (Arnquist, 1981), hoy día ya existen minicolumnas que separan específicamente la HbA_{1c}, éstas incluyen dos buferes, el primero de los cuales eluye la fracción A_{1a+b} y el segundo la A_{1c} (Yaynes, 1985).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), proporciona una mejor separación, precisión y tiempo de realización corto, ofreciendo la ventaja de su posible automatización. (Davis, 1978; Ellis, 1984; Saleh, 1985). Para la separación se usa un sistema de bufferes con diferente pH y fuerza iónica que son bombeados a través de la columna a una presión moderada y flujo determinado.

Existen muchos factores que influyen en la cromatografía de intercambio iónico:

- Metodológicos.
- Inherentes a la muestra.

- 1) **Factores metodológicos:** En este grupo hay que citar la temperatura, fuerza iónica, pH y tamaño de la columna. Un cambio en cualquiera de éstos, explica la variabilidad encontrada en los resultados, poco tiempo después de la introducción de este tipo de cromatografía (Simon, 1980; Schellekens, 1981).

Quizás la temperatura sea la que más influya ya que una elevación de 1°C incrementa el porcentaje de HbA_{1c} un 1% (Rosenthal, 1979) y debido al poco volumen de elución es necesario un control estricto de la misma. Los resultados de todos los métodos de minicolumna, deberían ser corregidos a 23°C.

- 2) **Factores inherentes a la muestra:**

- a) Intermediario lábil. En la formación de HbA_{1c} se produce en una primera etapa un producto lábil o aldimina que se conoce como pre A_{1c}, que posteriormente sufre la reordenación de Amadori, originando la cetamina estable o fracción A_{1c}. Esta pre A_{1c} va a depender de los niveles recientes de glucosa y coeluye con la fracción A_{1c} cuando se utiliza la cromatografía de intercambio iónico. Por lo tanto, es necesario eliminar esta fracción, antes de su determinación, ya los resultados reflejarían una combinación de control a corto y largo plazo (Compagnucci, 1980; Huissman, 1982). Para eliminar esta fracción se incuban los eritrocitos con solución salina, o semicarbazida antes de la hemólisis o bien se lisan a bajo pH (Bisse, 1982; Nathan 1984b).

Esta fracción lábil contribuye a un 2-3% de la HbA_{1c} en los sujetos normales, 7-10% en los diabéticos estables y hasta 20-30% en los inestables (Cohen, 1986),

- b) Anemia hemolítica. Esta situación tiende a descender los valores de hemoglobina glicada debido a un acortamiento de la vida del hematíe (Panzer, 1982). Igual ocurre en individuos que han sufrido pérdida agudas de sangre (Starman, 1983).

c) Hemoglobinopatías. Algunas variantes de hemoglobinas pueden contribuir a falsos incrementos o descensos en los niveles de HbA₁, dependiendo de la carga de la molécula (Nicol, 1983; Eberentz-Llome, 1984). Así, las variantes negativas como la HbF a niveles > 5% coeluye con la HbA_{1c}. Igual ocurre con las variantes H, K, I, J en algunos pacientes con β talasemia y en la persistencia hereditaria de hemoglobina fetal. Otras variantes positivas como la S, C, D, dan valores falsamente bajos porque la elución está más retardada.

En la mayoría de la población diabética estas variantes son poco frecuentes, destacando que la HPLC puede detectar alguna de éstas (Ellis, 1984; Delahunty, 1990) ya que no afecta la separación de la HbA_{1c}.

d) Productos de unión de restos no glucosa a la hemoglobina. Algunas sustancias se pueden unir a la hemoglobina y modificar su carga de manera similar a la que origina la unión de un resto azúcar. Estos productos formados coeluyen con la HbA₁ y dan falsos incrementos de dicha fracción. Esto ocurre en los pacientes urémicos donde Fluckiger y cols en 1981 demostraron que la hemoglobina se carbamilaba como consecuencia de la condensación del cianato derivado de la urea, con los grupos amino terminales. Esto produce un aumento de la HbA₁ que es proporcional al tiempo y a la concentración de urea sanguínea (Bannon, 1984).

Igual ocurre en los alcohólicos donde aparecen uniones con el grupo acetaldehído (Homaidan, 1984) y en los pacientes en tratamiento con altas dosis de aspirina que presenta acetil derivados de la hemoglobina (Nathan, 1983).

En la mayoría de estas situaciones la fracción que se afecta principalmente en la A_{1a+b} , por lo tanto los métodos cromatográficos que cuantifican específicamente la fracción A_{1c} , no presentan esta influencia negativa.

CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

Se utiliza para la cuantificación de la hemoglobina glicada total así como para las proteínas plasmáticas o séricas glicadas, ya que separa compuestos glicados en los aminoterminal grupos, β aminoterminales así como en los epsilon amino grupos de residuos lisina (Klenk, 1982; Willey, 1984; Yastcoff, 1984; Rendell, 1985a).

Dicha separación se basa en la interacción del grupo 1-2 cis-diol de la cetoamina con el ácido borónico inmovilizado sobre una matriz que contiene la columna, formándose un complejo covalente que puede ser específicamente disociado por sorbitol. (Mallia, 1981). El ácido borónico tiene una alta afinidad por la cetoamina, pero no por la aldimina.

El método es simple, rápido y exacto y se pensó como una alternativa a la cromatografía de intercambio iónico, ya que no tiene grandes factores que la influyan. (Klenk, 1982; Talwar, 1983; John, 1984), no obstante es muy sensible a las concentraciones de ligando que varía de unas columnas a otras (Cohen, 1986; Goldstein, 1986), así como, también se ha descrito interferencia de la fracción lábil y la temperatura. (Rosel, 1990),

B - FOTOMETRIA.

COLORIMETRIA.

Reacción con el ácido tioarbitúrico. La cetoamina cuando se hidroliza en medio ácido produce 5 hidroximetilfurfural que al reaccionar con el ácido tioarbitúrico (TBA) dá lugar a la formación de un producto coloreado que se puede cuantificar espectrofotométricamente. Flückiger y cols. describieron el método en 1976, que posteriormente ha sido utilizado para cuantificar tanto la hemoglobina como otras proteínas glicadas (Saibene, 1979; Ney, 1981; Standefer, 1983; Fluckiger, 1984).

Ya que la reacción es específica de la unión cetoamina, este método valora al igual que la cromatografía de afinidad, las modificaciones N terminales así como las no N terminales.

Tiene la ventaja de la simplicidad técnica y ausencia de factores que la influyan (Flückiger, 1981; Klenk, 1982; Nicol, 1983), pero presenta la gran desventaja de su difícil estandarización, ya que la reacción no es estequiométrica y la obtención de 5HMF desde la HbA_{1c} es solamente del 30% (Percoraro, 1979).

Los tres métodos descritos hasta ahora, han sido adaptados para cuantificar hemoglobina glicada en discos de papel impregnados de sangre capilar (Eros, 1984; Little, 1985; Holman, 1987; Slemenda, 1990).

Otros métodos colorimétricos han sido desarrollados como la **reacción con el ácido fenol-sulfúrico** (Nayak, 1981; Rai, 1984), aunque la sensibilidad es mucho menor que el TBA y su especificidad requiere posteriores estudios.

Reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT). Este método se utiliza sólo para la cuantificación de las proteínas plasmáticas o sérica totales glicadas (fructosamina) y se basa en la capacidad de la cetoamina de reducir al NBT en solución alcalina. Este método, fué desarrollado por Johnson y cols. en 1982 utilizando como estandar una cetoamina sintética que es la 1 deoxi-1 morfolino fructosa (DMF en una solución de 40 g/l de albúmina humana)

Posteriormente se utilizó un estandar secundario de una proteína glicada en una matriz de albúmina bovina (40 g/L) (Baker, 1985b).

Los estandares secundarios, permiten una mayor exactitud y precisión (Smid, 1986; Schelicher, 1990). No obstante su especificidad es limitada, de ahí que la concentración de proteína glicada obtenida por el método de NBT (fructosamina), sean superiores a las obtenidas por otros métodos (cromatografía de afinidad, TBA) (Hindle, 1985a; Howey, 1987; Mosca, 1987).

Si las condiciones analíticas de pH, temperatura y tiempo de incubación, se mantienen rigurosamente (pH = 10'35, 37° y 10 min.) se consigue eliminar la interferencia de sustancias que podrían reducir el NBT y que están presentes en el suero como son bilirrubina, úrico, glutation, ciseína, etc. (Johnson, 1982; Baker, 1985b; Johnson, 1986; Flückiger, 1987), así como en las muestras de plasma el anticoagulante EDTA o heparina (Hurst, 1987). La adición reciente al NBT de surfactante y uricasa ha mejorado notablemente su especificidad (Henrichs, 1991).

El método de la reducción del NBT ha sido adaptado a un gran número de autoanalizadores con lo que se mejora su rapidez y precisión (San Gil, 1985; Smid, 1986; Armbruster, 1987). Un coeficiente de variación intraensayo de 2-7% e interensayo del 5'4% ha sido obtenido en un estudio de 33 laboratorios en los cuales se utilizó el método manual y cinco diferentes autoanalizadores (Baker, 1986).

Por lo tanto es un método atractivo para la cuantificación de proteínas totales glicadas, no obstante tiene factores que influyen en los resultados como son:

- a) Estandarización analítica como se comentó anteriormente.
- b) Concentración de proteínas, y fundamentalmente de su fracción albúmina. Algunos autores han encontrado que la hipoalbuminemia influye, pero que la concentración de fructosamina es independiente de la concentración de albúmina cuando ésta excede los 30-35 g/L. (Lloyd, 1984; Johson, 1987). Van Dieijen-Visser y cols. (1986 a) informaron que los valores de fructosamina se ven afectados por la concentración de albúmina tanto si es inferior y superior a 30 g/L. Ellos sugieren corregir el resultado restando 0,023 m moles de fructosamina por g/L de albúmina. Howey propuso la siguiente corrección:

$$\text{Fructosamina (mmol/L)} = 0,03 \text{ albúmina (g/L)} + 0,9 \text{ (mmol/L)}$$

En las situaciones clínicas donde existe un aumento del catabolismo proteico y descenso de la vida media de la proteína, la fructosamina reflejaría la concentración de glucosa durante un período previo de menos de 21 días que es lo esperado.

Lloyd y Marples (1986), cuantificaron la fructosamina en pacientes con tirotoxicosis e hipotiroides en los cuales existe un aumento del turnover y un descenso respectivamente, y observaron que la concentración de la misma, estaba descendida y aumentada significativamente.

Por lo tanto se debe tener precaución en la interpretación de los resultados en pacientes con alteración en la síntesis, catabolismo o excreción de las proteínas (Armbruster, 1987; Ashby, 1988; Brighton, 1988).

FLUOROMETRIA.

La oxidación con peryodato de los azúcares en α y β aminogrupos de las proteínas, origina formaldehído que se puede cuantificar espectrofluorométricamente (Gallop, 1981). Este método valora tanto la aldimina como la cetoamina por lo que presenta los mismos inconvenientes que la cromatografía de intercambio iónico, si la fracción lábil no se elimina previamente.

Un método fluorométrico aplicable sólo a la hemoglobina glicada se basa en la adición de inositol hexafosfato (ácido fítico) el cual liga y satura los lugares donde el 2-3 difosfoglicerato se une a la hemoglobina que no está unido a glucosa. La hemoglobina glicada por tanto no liga inositol hexafosfato. El grado de glicación se puede cuantificar mediante:

- 1) El cambio espectral que produce la unión del inositol hexafosfato a 560 y 630 nm y que es inversamente proporcional a la concentración de hemoglobina glicada (Walinder, 1982).
- 2) La adición de haptoglobina la cual se une a la hemoglobina glicada con determinación fluorométrica del complejo hemoglobina glicada/haptoglobina por su actividad peroxidasa (Deeg, 1984).

Ambos métodos pueden ser automatizados.

Hayashi y cols describieron en 1985 un método simple y rápido para cuantificar la albúmina glicada con ac. fenil borónico dansilado A_C [N-(5 dimetil amino 1 naftalen sulfonil)- 3 amino benceno] borónico. El espectro de emisión de este reactivo cambia debido a las uniones cis-dioles presentes en la albúmina glicada, permitiendo su cuantificación, utilizando 330 nm y 490 nm como longitudes de onda de excitación y emisión.

C -ELECTROFORESIS.

La aplicación de un hemolizado sobre un soporte que contiene grupos cargados negativos (sulfato y piravato), y el establecimiento de un potencial eléctrico, permite que los componentes de dicho hemolizado puedan ser separados de acuerdo a las diferencias de carga. La HbA que es más positiva interacciona más fuertemente con los grupos del soporte y su migración estará más retardada que al HbA₁ que es más negativa. Dos métodos electroforéticos han sido adaptados para cuantificar la HbA₁.

ELECTROFORESIS EN AGAR GEL A PH 6'5 que proporciona una amplia separación y su cuantificación es fácil por densitometría (Menard, 1980). Este método se propuso como alternativa de rutina junto con las minicolumnas de intercambio iónico.

ISOELECTROENFOQUE en geles de poliacrilamida, que contiene mezcla de ácidos poliamino y policarboxílicos, con lo que se consigue un gradiente de pH (Simon, 1982). Este método separa las diferentes hemoglobinas por su punto isoeléctrico y puede cuantificar específicamente la HbA_{1c}. Tiene una gran resolución, pero técnicamente es más exigente que la simple electroforesis ya que requiere cierta habilidad técnica y un densitómetro de alta calidad para su cuantificación.

A la electroforesis le afectan los mismos factores inherentes a la muestra que a la cromatografía de intercambio iónico, pero en cuanto a las hemoglobinopatías, a la electroforesis en agar gel no lo afectan las variantes positivas (Aleyassine, 1981) y al isoelectroenfoque ninguna.

D-INMUNOENSAYO.

- **RADIOINMUNOENSAYO.**-Un radioinmunoensayo específico para la HbA_{1c} fue descrito por Javid y cols. en 1978, que utilizaron un antisuero de carnero desarrollado frente a HbA_{1c} humana purificada. Después de la absorción los anticuerpos eran virtualmente específicos con una reactividad cruzada de 5% y 10% para la HbA_{1a} y HbA_{1b} respectivamente y mínima para la HbA₀.

- **ENZIMOINMUNOENSAYO.**-Chou y cols. en 1981 utilizaron un anticuerpo de conejo frente a HbA_{1c} para valorar la HbA₁ separada por cromatografía en columna y cuantificada por nefelometría laser. Mas recientemente se ha descrito un método seguro y específico para cuantificar la albúmina glicada utilizando el anticuerpo monoclonal A₇₁₇ (Hud, 1989). Sus principales características son: el reconocimiento de epitopos glicados en la albúmina pero no en otras proteínas plasmáticas, su falta de reactividad con la albúmina no glicada y su unión a la forma fisiológica de albúmina glicada.

Los métodos utilizados en el presente trabajo se describen a continuación.

3.2.2.2. - METODOLOGIA UTILIZADA.

3.2.2.2.1. - CUANTIFICACION DE LA HEMOGLOBINA A_{1c}.

La muestra de sangre se recogió con EDTA manteniéndose a 4°C. hasta su valoración, que se realizó antes de una semana de su almacenamiento.

La HbA_{1c} se cuantificó mediante HPLC (Diamandis, 1984) con un autoanalizador modelo HA-8110 (Kyoto Daiichi Kagaku Co., Kyoto 601, Japan). El fundamento de la separación es una combinación de cromatografía de partición en fase reversa e intercambio iónico sobre Micropearl SFW-A_{1c} (Sekisui Karku, Kogyo, Co, Japan).

50 μ l de sangre total se incubaron con 500 μ l de una solución de ácido bórico 0'01 M a 38° durante 30 minutos, para eliminar la fracción labil o aldimina.

A continuación se centrifugó a 3000 g. 10 minutos y se decantó el sobrenadante. 3 μ l del paquete de células resuspendido se diluyeron con 450 μ l. de reactivo hemolizante ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,6 g/L, PO_4HK_2 0,2 g/L, agente tensoactivo no iónico 1,0 g/L) y se pasaron a través de la columna.

El autoanalizador automáticamente eluye las hemoglobinas con dos soluciones amortiguadoras que difieren en el pH y fuerza iónica. El eluyente A es tampón fosfato pH=6,4 ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 8,4 g/L, PO_4HK_2 2,3 g/L) y el eluyente B tampón fosfato pH=6,2 ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 8,4 g/L, PO_4HK_2 0,2 g/L)

Ambos eran bombeados a un flujo de 1,3 ml/min. y la temperatura de la columna se mantuvo a $22^\circ \pm 1^\circ\text{C}$.

Los picos de hemoglobina eran detectados por espectrofotometría bicromática (415 nm y 500 nm) y cuantificados por integración de sus áreas. Las tres fracciones eluidas son la $\text{HbA}_{1\text{a}+\text{b}}$, $\text{HbA}_{1\text{c}}$ y HbA_0 y los resultados se expresaron como porcentaje de cada una de ellas respecto a la hemoglobina total.

La imprecisión analítica intraensayo se calculó en muestras normales y diabéticas, obteniéndose unos coeficientes de variación de 1,91% y 1,86% (Tabla 9). Para la imprecisión interensayo utilizamos controles de BIO-RAD Lab Inc. Richmon, CA 94804 siendo los coeficientes de variación de 3,70% y 2,44% para niveles de $\text{HbA}_{1\text{c}}$ de 5,94% y 12,29%.

3.2.2.2.2. - CUANTIFICACION DE LA GLICOHEMOGLOBINA.

La hemoglobina glicada total se cuantificó por cromatografía de afinidad (Klenk, 1982).

El hemolizado se preparó mezclando 0,1 ml de sangre total recogida con EDTA con 1 ml de una solución que contenía Triton X-100 al 0,1%. Se mezcló y se dejó durante 5 minutos, conservándose a -70°C. hasta que fueron analizadas.

0,1 ml de este hemolizado se pasaron a través de una columna que contenía 1 ml de ácido m-aminofenil borónico inmovilizado sobre agarosa al 6% (Glycogel, Pierce Chemical Co.). A continuación se añadió 0,5 ml de una solución cuya composición era: Acetato amónico 250 mmol/L Cl₂ Mg 50 mmol/L y 0,2 g/L de azida sódica ; pH=8. Esto permitía la transmisión completa de la muestra a través del gel. Posteriormente se añadió 19,5 ml de dicha solución. El volumen total del eluido A (20,1 ml) contenía la hemoglobina no glicada.

Las columnas se transferían a otros tubos y se añadía sobre ellas 5 ml de otra solución amortiguadora con la siguiente composición: Sorbitol 200 mmol/L, Tris 100 mmol/L y 0,2 g/L de azida sódica; pH=8,5, recogándose en el total del eluido B (5 ml) la hemoglobina glicada.

El porcentaje de hemoglobina glicada se calculó mediante la lectura de la absorbancia de ambos eluidos (A y B) en un espectrofotómetro a 415 nm, utilizando como blanco agua destilada.

$$\% \text{ Ghb} = \frac{5 \times A_{415} \text{ eluido B}}{20'1 \times A_{415} \text{ eluido A} + 5 \times A_{415} \text{ eluido B}} \times 100$$

Todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente.

Las columnas se regeneraban mediante adición de 5 ml de ClH 0,1 N. a cada una de ellas y a continuación 5 ml de ClH 0,001 N. Cuando habían pasado 3 ml. aproximadamente de éste último se tapaban las minicolum-

nas y se guardaban a 4°C. en oscuridad.

La imprecisión analítica intraensayo se calculó en muestras normales y diabéticas arrojando unos coeficientes de variación de 5,66% y 4,47% (Tabla 9). Para la imprecisión interensayo utilizamos controles de Ciba Corning Diagnostics Corp. Irvine CA 92714, obteniendo unos coeficientes de variación de 8,15% y 4,72% para niveles de hemoglobina glicada de 6,72% y 15,25% respectivamente.

3.2.2.2.3. - CUANTIFICACION DE FRUCTOSAMINA.

La muestra de sangre se recogió en tubos sin anticoagulante. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15', separamos el suero y lo congelamos a -40°C para su posterior análisis.

La fructosamina se cuantificó mediante una modificación del método colorimétrico de Johnson (1982), desarrollada por Roche Diagnóstica.

Utilizamos un estandar de proteína glicosilada (suero humano) valorado frente a un estandar primario de desoximorfolino fructosa (DMF) cuya concentración era de 3 mmol/L de equivalentes de DMF.

El procedimiento analítico seguido fué:

A 0,1 ml de suero y estandar, añadimos 1 ml. de una solución que contenía 0,25 mmol/L de NBT en tampón carbonato sódico 0,1 m M; pH = 10,35 (25°C).

Incubamos la mezcla durante 10 minutos a 37°C y leímos la absorbancia a 530 nm (A_1) utilizando como blanco agua destilada. Transcurridos 10 minutos de esta lectura, realizamos otra lectura (A_2) y la diferencia obtenida para cada muestra ($\Delta A \text{ ó } A_2 - A_1$) la comparamos con la del estandar y calculamos la concentración.

Para evaluar la imprecisión, analizamos alicuotas de controles suministrado por Roche Diagnóstica. El coeficiente de variación intraensayo para niveles de 2,37 y 5,49 fué de 4,64% y 4,00% respectivamente y el interensayo de 5,32% y 4,72%. (Tabla 9).

La recuperación obtenida mediante la adición de diferentes concentraciones de DMF (0'32; 0'88; 1'62; 2'40 y 2'92 mmol/L) a 20 sueros controles fue de $101 \pm 3'82\%$; $101 \pm 3'99\%$; $104 \pm 6'09\%$; $102 \pm 3'37\%$ y $96 \pm 2'23\%$.

El límite de linealidad fué de 9 mmol/L de equivalentes de DMF.

La fructosamina corregida se calculó mediante el cociente:

$$\text{Fructosamina corregida} = \frac{\text{Fructosamina (}\mu\text{mol/L)}}{\text{Albúmina (g/L)}} = \frac{\text{Fructosamina (}\mu\text{mol/g)}}{\text{Albúmina (g/L)}}$$

La albúmina se cuantificó en la misma muestra mediante el método del verde de bromocresol (Dumas, 1971).

La concentración de proteínas se determinó por el método del biuret (Dumas, 1981).

3.2.2.2.4. - CUANTIFICACION DE PROTEINAS PLASMATICAS GLICADAS.

El plasma se obtuvo mediante centrifugación de la sangre recogida con EDTA, a 3000 rpm duranate 15 minutos. Dicho plasma se separaba en diferentes alicuotas que se conservaba a -40°C . hasta la correspondiente determinación analítica de las variables objeto del estudio.

SEPARACION DE LAS PROTEINAS GLICADAS. Las proteínas glicadas, tanto las totales como la albúmina se separaron mediante cromatografía de afinidad. (Rendell, 1985 b). Para ello utilizamos minicolumnas que contenían 1 ml. de ácido m-aminofenilborónico inmovilizado sobre agarosa al 6% (Glicogel B) suministradas por Pierce Chemical Co.

Estas columnas se equilibraban con 5 ml de una solución amortiguadora que contenía: Acetato amónico 250 m mol/L, $\text{Cl}_2 \text{Mg}$ 50 m mol/L y 0,2 g/L de azida sódica pH = 8 ($20 \pm 1^\circ\text{C}$).

Una vez equilibradas, se aplicaban 200 μl de plasma en la superficie del gel y una vez impregnado éste, se añadían 0'5 ml de la anterior solución, para asegurar la transmisión completa de la muestra a través de dicho gel.

En la columna que se utilizaba como blanco adicionamos 200 μl de solución salina (Cl Na 0,9%). en vez del plasma.

A continuación se añadían 19,5 ml de la solución de acetato amónico en 4 veces (4,5 ml; 5 ml; 5 ml; 5 ml). El volumen total del eluido (20,2 ml) contenía las proteínas no glicadas (eluido NG).

Las columnas se transferían a otros tubos y se añadían sobre ellas 3 ml. de una solución con la composición siguiente: Citrato sódico 0,2 mol/L y 0,2 g/L de azida sódica pH = 4,5 ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). El volumen del eluido (3 ml) contenía las proteínas glicadas (eluido G).

Las columnas se mantuvieron durante toda la separación a 20°C .

Después de dicha separación las columnas se regeneraban reutilizándose hasta un total de 3 veces. Para ello añadíamos a cada una 5 ml de ClH 0,1 N y a continuación 5 ml de ClH 0,001 N. Cuando habían pasado 3 ml aproximadamente de éste último se tapaban las minicolumnas y se guardaban a -4°C en oscuridad.

CUANTIFICACION DE LA ALBUMINA GLICADA.

- A 1 ml de eluido NG le añadimos 3 ml de reactivo de verde bromocresol.
- A 2 ml de eluido G le añadimos 1 ml de reactivo de verde de bromocresol.

El porcentaje de albúmina glicada se calculó a partir de la absorbancia obtenida a 630 nm. utilizando como blanco los eluidos NG y G procedentes de la columna blanco.

$$\% \text{ albúmina glicada} = \frac{1,5 \times A_{630} \text{ eluido G}}{20,2 \times A_{630} \text{ eluido NG} + 1,5 \times A_{630} \text{ eluido G}}$$

La imprecisión analítica calculada en 20 muestras normales y diabéticas arrojó un coeficiente de variación intraensayo de 9,77% y 5,40% e interensayo de 11,80 y 6,87% respectivamente (Tabla 9).

La recuperación se calculó comparando la absorbancia a 630 nm de los eluidos NG y G con la de la mezcla obtenida al añadir 200 μ l de plasma directamente sobre un tubo que contenía 20 ml de solución amortiguadora de acetato amónico.

La media de recuperación obtenida en 20 columnas fué de $102 \pm 6,1\%$.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES GLICADAS.

Utilizamos dos métodos.

- 1 - Lectura directa de la absorbancia a 280 nm de los eluidos NG y G utilizando como blanco los eluidos NG y G de la columna blanco. Por lo tanto el porcentaje de proteína glicada será:

$$\% \text{ proteínas totales glicadas} = \frac{3 \times A_{280} \text{ eluido G}}{20'2 \times A_{280} \text{ eluido NG} + 3 \times A_{280} \text{ eluido G}}$$

El coeficiente de variación intraensayo obtenido en 20 muestras normales y diabéticas fué de 2,65% y 3,90% y el interensayo de 5,17% y 4,83% respectivamente (Tabla 9).

La media de recuperación de 20 columnas era de $99,9 \pm 1,97\%$.

- 2 - Método de Azul Coomassie (Pierce, 1977).

5 ml de reactivo de Azul Coomassie se añadieron a 50 μ l de eluido NG y 100 μ l de eluido G.

El porcentaje de proteínas glicadas se calculó de la absorbancia obtenida a 595 nm de ambos eluidos, utilizando como blanco agua destilada.

$$\% \text{ proteínas totales glicadas} = \frac{3 \times A_{595} \text{ eluido G.}}{40'2 \times A_{595} \text{ eluido NG} + 3 \times A_{595} \text{ eluido G}}$$

La imprecisión analítica para muestras normales y diabéticas fué intraensayo de 5,20% y 4,86% e interensayo de 6,66% y 5,76%.

TABLA 9

INPRECISION ANALITICA EN LA CUANTIFICACION DE PROTEINAS GLICADAS

PROTEINAS GLICADAS	INTRAENSAYO (n=20)			INTERENSAYO (n=20)		
	\bar{X}	DS	CV	\bar{X}	DS	CV
HbA _{1c} (%)	4,18	0,08	1,91	5,94	0,22	3,70
	11,29	0,21	1,86	12,29	0,30	2,44
Glicohemoglobina (%)	6,88	0,39	5,66	6,72	0,45	8,15
	14,52	0,65	4,47	15,25	0,72	4,72
Fructosamina (m mol/L)	2,37	0,11	4,64	2,44	0,13	5,32
	5,49	0,22	4,00	5,51	0,26	4,72
Proteínas totales glicadas (%)	3,40	0,09	2,65	3,29	0,17	5,17
	5,22	0,21	3,90	5,38	0,26	4,83
Albúmina glicada (%)	2,25	0,22	9,77	2,28	0,27	11,80
	3,89	0,21	5,40	3,78	0,26	6,87

La media de recuperación de 20 columnas fué de $100,9 \pm 2,95\%$.

Ambos métodos mostraban una buena correlación obteniéndose al compararlos un coeficiente de correlación $r = 0,960$ ($p < 0,001$).

La ecuación de la recta de regresión fué de $y = 0,87x - 0,39$; ($x = \% \text{ proteínas glicadas } 280 \text{ nm}$ y $y = \% \text{ proteínas glicadas } 595 \text{ nm}$).

Dado que la imprecisión analítica es ligeramente superior con el método de azul coomassie y que la cuantificación por este método se puede ver afectada por la concentración de proteína en la columna (Gould, 1984) nosotros hemos adoptado realizar todos los cálculos con los resultados obtenidos de la lectura directa a 280 nm.

3.2.3. - FOSFOLIPIDOS EN LIQUIDO AMNIOTICO.

Los fosfolípidos se cuantificaron según el método publicado por Zapata y cols. (1988).

La extracción de lípidos se realizó en 1 ml de líquido amniótico total usando cloroformo /metanol (5:8 v/v) Los diferentes fosfolípidos fueron aislados en placas de sílica gel G, mediante cromatografía bidimensional, utilizando cloroformo/metanol/agua (75:25:5 v/v) como solvente para el primer recorrido y cloroformo/metanol/ac. acético/agua (90:40:12:2 v/v) para el segundo recorrido. Los fosfolípidos fueron identificados por comparación con estándares (Sigma, St. Louis, Mo, USA). Las manchas identificadas fueron raspadas para la determinación de fósforo (Fiske, 1925).

La imprecisión analítica calculada mediante el coeficiente de variación fué para la lecitina, esfingomiélin y fosfatidil-glicerol de 7,1%, 12,2% y 10,1% respectivamente.

Bajo estas condiciones analíticas se definió surfactante maduro cuando el cociente L/E era $\geq 2;7$ y existía presencia de PG.

3.3.- METODOS ESTADISTICOS.

3.3.1. - DESCRIPCION DE LOS RESULTADOS.

Los resultados de la presente tesis se expresan como media \pm desviación estándar ($\bar{X} \pm DS$) en las tablas y texto y media \pm error estándar de la media ($\bar{X} \pm ESM$) en las figuras

3.3.2. - COMPARACION DE DOS MEDIAS.

3.3.2.1. - DATOS APAREADOS.

Para la comparación de medias en grupos con datos apareados se utilizó el test de la t de Student. La aplicación correcta de este test exige que la distribución siga una ley normal. Cuando esta condición no se cumplía, lo cual se verificaba aplicando la prueba de Kolmogorov, las medias se comparaban mediante la prueba T de Wilcoxon (Carrasco, 1983).

3.3.2.2. - DATOS NO APAREADOS.

Para la comparación de las medias con datos no apareados se utilizó el test de la t de Student. La aplicación correcta de este test exige que la distribución sea normal y de igual varianza. Por ello previamente se realizaba la prueba de comparación de dos varianzas observadas en grupos con datos independientes mediante la F de Snedecor. Cuando las condiciones de aplicación de la prueba no se cumplían, se aplicó la prueba U de Mann-Whitney (Carrasco, 1983).

3.3.3. - COMPARACION DE VARIAS MEDIAS.

Para la comparación de los valores obtenidos en los diferentes grupos estudiados hemos utilizado el análisis de la varianza (Armitage, 1987).

En los casos en que se trataba de comparar varias medias observadas en grupos con datos independientes, se aplicó el análisis de la varianza con un factor de variación, seguido de comparaciones individuales entre las medias correspondientes a los diferentes niveles del factor, mediante el método de Scheffé.

3.3.4. - COMPARACION DE VARIABLES CUALITATIVAS.

Para la comparación de variables cualitativas se utilizó el test de la χ^2 aplicando la corrección de Yates cuando en las tablas de contingencia de 2 x 2 alguno de los valores era inferior a 5 (Doménech, 1982).

3.3.5. - CORRELACION Y REGRESION.

En varias ocasiones hemos estudiado la correlación existente entre dos variables cuantitativas para determinar si estaban o no relacionadas. Para ello se calculaba la recta de regresión entre las dos variables por el método de mínimos cuadrados. Posteriormente se estudiaba la dependencia o independencia de las variables mediante el coeficiente de correlación de Pearson (Carrasco, 1983).

El nivel de significación P obtenido en las diferentes pruebas estadísticas, que aparece expresado en tablas y figuras, se consideró significativo cuando era inferior a 0,05.

3.3.6. - SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO.

Se calcularon mediante los cocientes: (Redondo, 1990).

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Diabéticas gestacionales con test positivo}}{\text{Diabéticas gestacionales analizadas}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Gestantes normales con test negativo}}{\text{Gestantes normales analizadas}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{\text{Diabéticas gestacionales con test positivo}}{\text{Gestantes totales con test positivo}} \times 100$$

4.- RESULTADOS.

4.1 - PROTOCOLO A.

VALORACION DE GLUCEMIA Y PROTEINAS GLICADAS A LO LARGO DEL EMBARAZO EN GESTANTES NORMALES, DIABETICAS GESTACIONALES Y DIABETICAS PREGESTACIONALES.

4.1.1. - EVOLUCION DE GLUCEMIA Y PROTEINAS GLICADAS A LO LARGO DEL EMBARAZO.

Glucemia basal.- Se observa el comportamiento de la glucemia basal en los tres grupos de gestantes estudiados, a lo largo del embarazo. El descenso de la misma es significativo ($p < 0,05$) a partir de la 24ª semana, con respecto al comienzo de la gestación, en el grupo GN. En el grupo DP, la glucemia desciende a partir de la 34ª semana, ($p < 0,05$), (figura 9).

Analizadas las glucemias comparativamente entre los diferentes grupos a lo largo de la gestación, se observa que son superiores en DP frente a GN y DG, no existiendo diferencia entre estos dos últimos. Al final del embarazo se comprueba una aproximación en los niveles glucémicos entre los tres grupos. (tabla 10).

Glucemia postprandial.- La evolución de la glucemia postprandial se describe en la tabla 11 y figura 10, objetivándose únicamente un descenso significativo ($p < 0,05$) en el grupo DP, a partir de la 16ª semana, si bien este descenso no se mantiene de forma uniforme.

Glucemia media.- La glucemia media analizada en el grupo DP (tabla 12 y figura 11) muestra ya un descenso significativo ($p < 0,05$) en la semana 10ª de gestación, descenso que se incrementa ($p < 0,001$) a lo largo de la misma.

GLUCEMIA BASAL

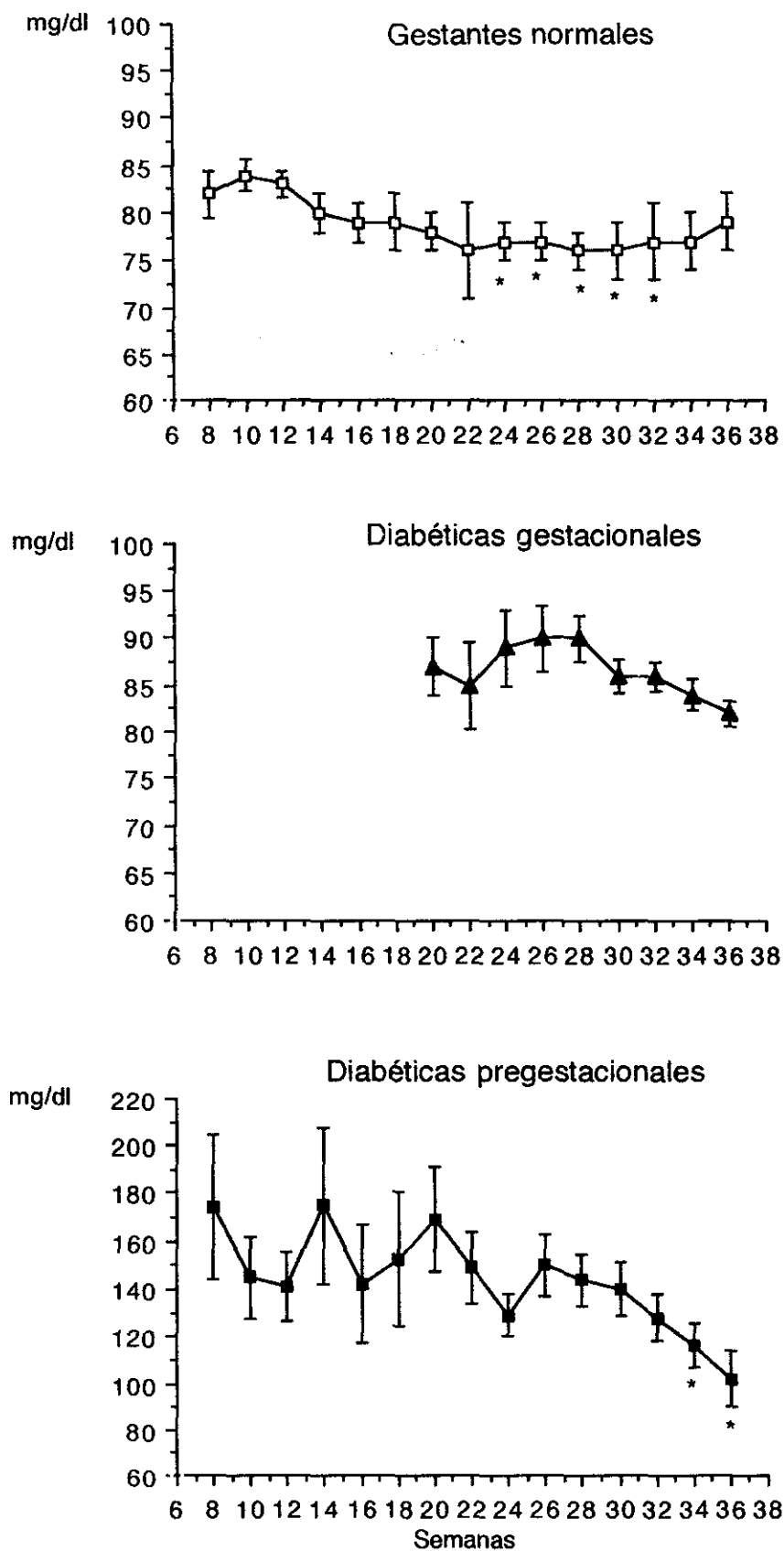


Figura 9.- Evolución de la glucemia basal ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 10

NIVELES DE GLUCEMIA BASAL (mg/dl) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS	SEMANAS															
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
GN	n	24	30	30	26	18	11	10	7	28	14	18	11	12	7	7
	\bar{X}	81,8	84,4	83,1	79,7	78,9	79,1	77,5	75,8	77,4	77,2	76,2	75,7	76,7	77,0	79,0
	DS	12,2	8,5	7,6	8,5	9,4	10,0	5,9	12,3	8,9	8,2	8,4	9,0	9,0	9,6	6,4
DG	n							12	12	15	22	25	41	46	53	60
	\bar{X}							86,5	84,7	88,8	89,9	90,2	86,2	86,2	84,3	82,1
	DS							11,1	16,4	15,9	16,7	12,1	11,6	10,7	11,8	11,6
DP	n	7	9	12	12	12	16	15	19	23	23	24	20	23	21	16
	\bar{X}	173,8	145,4	141,4	175,5	141,5	152,3	169,6	148,9	128,8	150,7	144,1	140,6	128,0	116,0	102,0
	DS	73,6	50,4	53,4	113,3	86,1	112,8	85,4	67,7	42,3	64,6	54,5	48,0	48,3	42,0	50,1
GN vs DG							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GN vs DP	***	***	**	**	**	ns	**	**	***	***	***	***	***	***	**	*
DG vs DP							ns	**	***	***	***	***	***	***	**	*

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

TABLA 11

NIVELES DE GLUCEMIA POSTPRANDIAL (mg/dl) DURANTE LA GESTACION EN LAS GESTANTES DIABETICAS (DG) Y (DP)

GRUPOS	SEMANAS															
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
DG	n						12	12	15	22	25	41	46	53	60	
	\bar{X}						99,8	88,4	100,0	103,8	102,8	103,2	104,0	104,2	107,0	
	DS						23,8	20,7	20,9	21,2	19,4	21,0	25,7	21,2	21,4	
DP	n	7	8	11	12	12	16	15	19	23	22	23	19	22	20	8
	\bar{X}	223,5	160,5	172,0	177,2	138,6	145,4	171,9	163,9	147,0	169,3	163,6	156,2	172,0	147,0	167,7
	DS	89,6	60,4	66,9	83,0	54,0	67,5	82,9	76,9	64,2	67,1	66,8	58,4	51,0	53,4	65,8
DG vs DP							*	**	**	***	***	***	***	***	***	***

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

GLUCEMIA POSTPRANDIAL

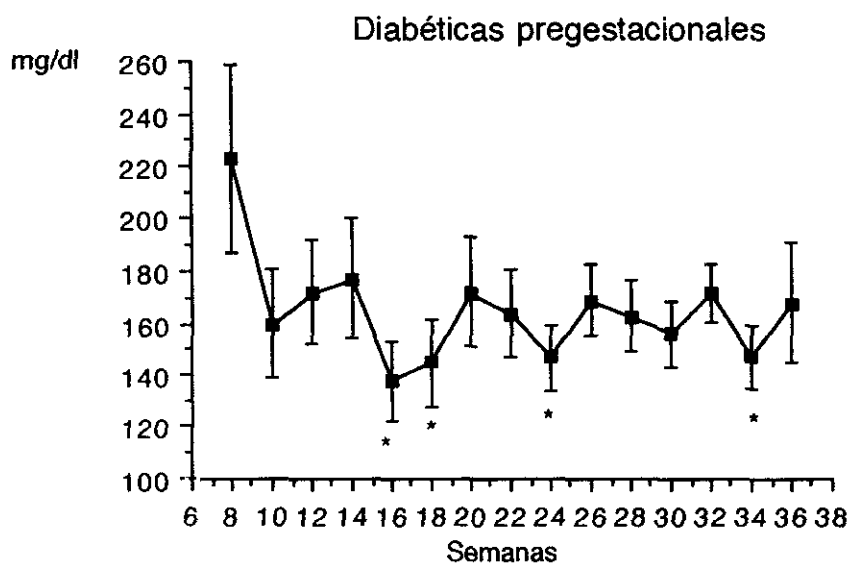
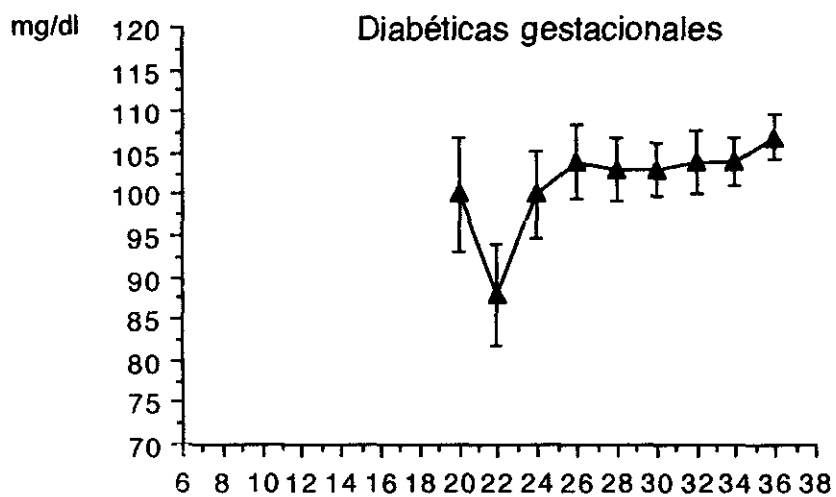


Figura 10.- Evolución de la glucemia postprandial ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 12

NIVELES DE GLUCEMIA MEDIA (mg/dl) DURANTE LA GESTACION EN LAS DIABETICAS PREGESTACIONALES

	SEMANAS														
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
n	11	13	16	18	22	22	24	22	24	25	24	25	20	21	7
\bar{X}	168,4	145,3	123,2	124,6	115,0	110,1	115,0	113,9	116,2	119,9	120,8	115,7	107,1	104,4	107,4
DS	16,2	26,4	26,1	28,8	20,2	20,3	20,8	19,0	21,8	21,1	22,1	21,0	20,6	15,9	6,6

GLUCEMIA MEDIA

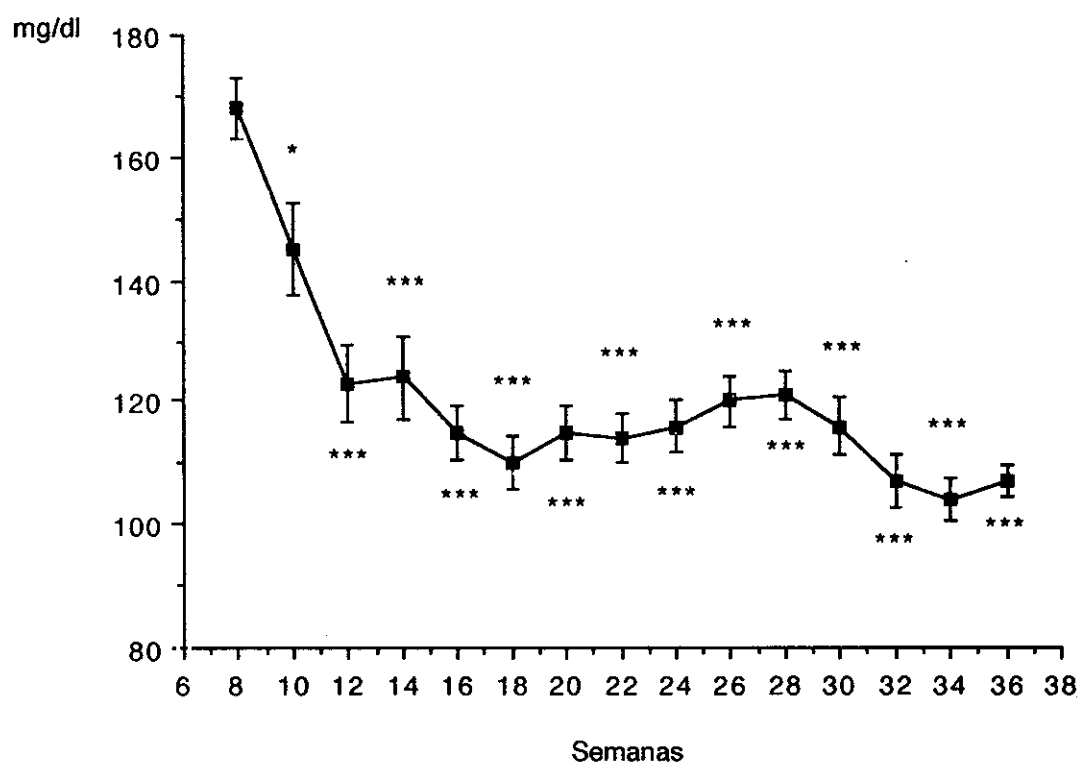


Figura 11.- Evolución de la glucemia media ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

HbA_{1c}.— Por lo que respecta al comportamiento de la HbA_{1c} (tabla 13 y figura 12), ésta experimenta en GN un descenso significativo ($p < 0,05$) en la 16^a semana con respecto al inicio de la gestación, el cual se mantiene con diferentes oscilaciones hasta la 30^a semana en que comienza a observarse un regreso de sus valores a los obtenidos en las primeras semanas del embarazo. En DG, la HbA_{1c} no se modifica durante la gestación. En DP, a partir de valores iniciales de $7 \pm 1,41$ % (semana 10^a), se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) a $5,8 \pm 1,12$ % (semana 20^a), que se mantiene hasta el final del embarazo.

A pesar del marcado y continuo descenso de la HbA_{1c}, en el grupo DP persisten en las últimas semanas diferencia significativa ($p < 0,001$) con respecto a los valores hallados en los grupos GN y DG.

Glicohemoglobina.— La tabla 14 y figura 13 solo muestran oscilaciones significativas en el grupo de GN, en el que se observan discretos descensos ($p < 0,05$) en las semanas 16^a y 24^a. Como en parámetros anteriores, los valores de ésta proteína glicada se mantienen más elevados en DP que en GN y DG durante el embarazo.

Fructosamina.— Este parámetro, como se observa en la tabla 15 y figura 14 no experimenta variaciones a lo largo de la gestación en GN y DG. En DP, partiendo de concentraciones de $3,07 \pm 0,53$ mmol/L., en la semana 8^a, pueden objetivarse en la semana 18^a niveles de $2,41 \pm 0,49$ mmol/L., siendo éstos, inferiores significativamente ($p < 0,05$) y se mantienen así hasta el final de la gestación. Comparando los diferentes grupos, se observa que existen diferencia variables de este parámetro durante el embarazo, alcanzándose mayor significatividad entre los grupos GN y DP en el 1^{er} trimestre del embarazo.

TABLA 13

NIVELES DE HbA_{1c} (%) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS	SEMANAS															
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
GN	n	24	30	30	26	18	11	10	7	27	14	18	11	12	7	7
	\bar{X}	4,5	4,6	4,5	4,5	4,2	4,4	4,1	4,6	4,3	4,2	4,3	4,3	4,6	4,4	4,2
	DS	0,57	0,37	0,36	0,43	0,49	0,34	0,33	0,58	0,43	0,44	0,37	0,36	0,31	0,27	0,17
DG	n						11	12	14	22	25	41	46	53	60	
	\bar{X}						4,7	4,4	4,5	4,4	4,5	4,5	4,6	4,5	4,6	
	DS						0,45	0,55	0,55	0,52	0,45	0,49	0,51	0,52	0,51	
DP	n	7	9	12	12	12	16	15	19	21	23	24	20	23	21	16
	\bar{X}	6,7	7,0	6,7	6,8	6,2	5,9	5,8	5,5	5,4	5,5	5,7	5,8	5,6	5,7	5,8
	DS	0,93	1,41	1,26	1,57	1,31	1,20	1,12	0,72	0,94	0,81	0,92	0,97	0,73	0,88	0,98
GN vs DG								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GN vs DP	***	***	***	***	**	**	**	**	*	***	***	***	***	***	***	***
DG vs DP							*	**	**	***	***	***	***	***	***	***

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

HbA_{1c}

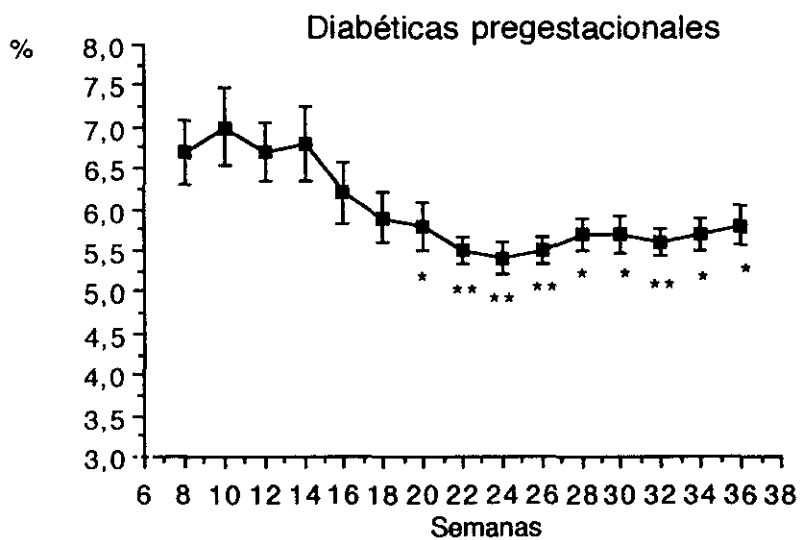
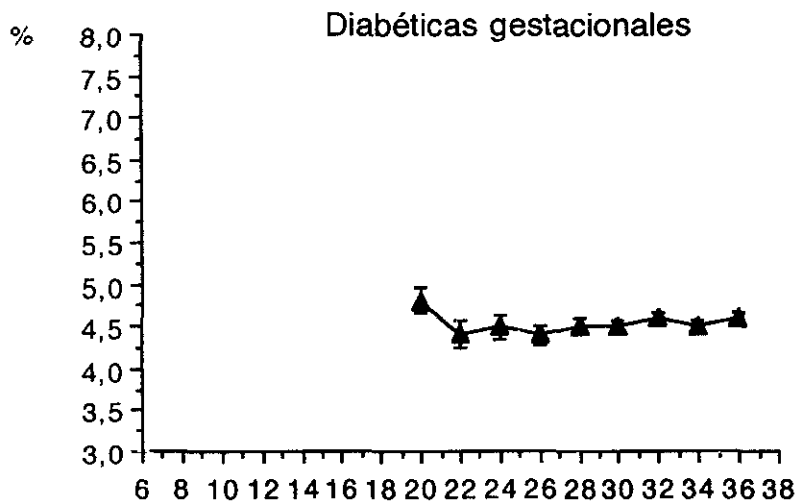
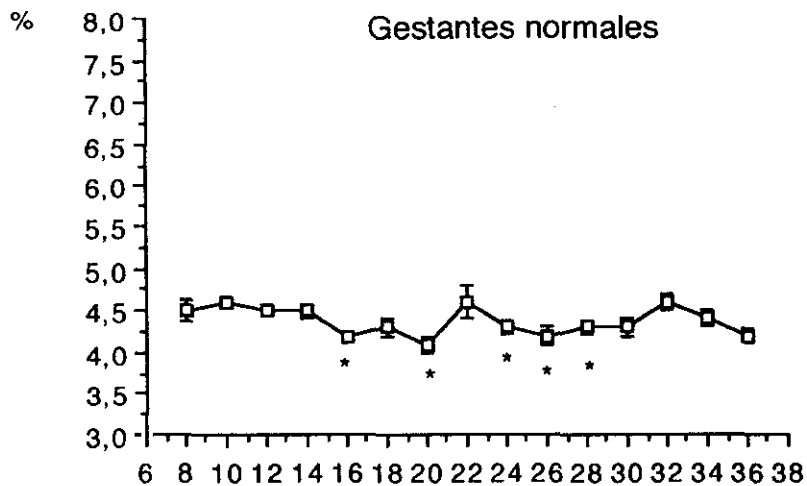


Figura 12.- Evolución de la HbA_{1c} ($\bar{X} \pm$ ESM) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 14

NIVELES DE GLICOHEMOGLOBINA (%) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS	SEMANAS															
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
GN	n	24	28	26	26	18	11	9	7	28	13	14	10	11	7	7
	\bar{X}	5,8	6,1	5,9	6,0	5,6	5,7	6,0	5,9	5,7	5,7	5,7	5,7	6,2	5,9	5,8
	DS	0,66	0,59	0,59	0,57	0,72	0,79	0,66	0,69	0,61	0,69	0,52	0,38	0,61	0,66	0,34
DG	n						8	7	7	17	17	32	34	38	40	
	\bar{X}						6,0	6,0	6,2	6,2	6,4	6,2	6,4	6,4	6,6	
	DS						0,90	0,99	0,96	0,72	0,87	0,92	0,93	0,86	0,69	
DP	n	7	7	9	8	7	9	10	12	15	13	18	14	15	11	7
	\bar{X}	10,1	9,7	9,9	9,4	8,4	8,8	8,7	8,2	8,4	8,3	8,7	8,5	8,3	8,3	9,5
	DS	1,21	2,81	2,70	2,72	1,12	1,99	1,46	1,20	1,46	1,60	1,70	2,00	1,52	1,32	1,12
GN vs DG							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
GN vs DP	***	***	***	**	**	**	**	**	**	***	***	***	***	**	**	***
DG vs DP							**	**	**	***	***	***	***	***	***	

96

** p < 0,01

*** p < 0,001

GLICOHEMOGLOBINA

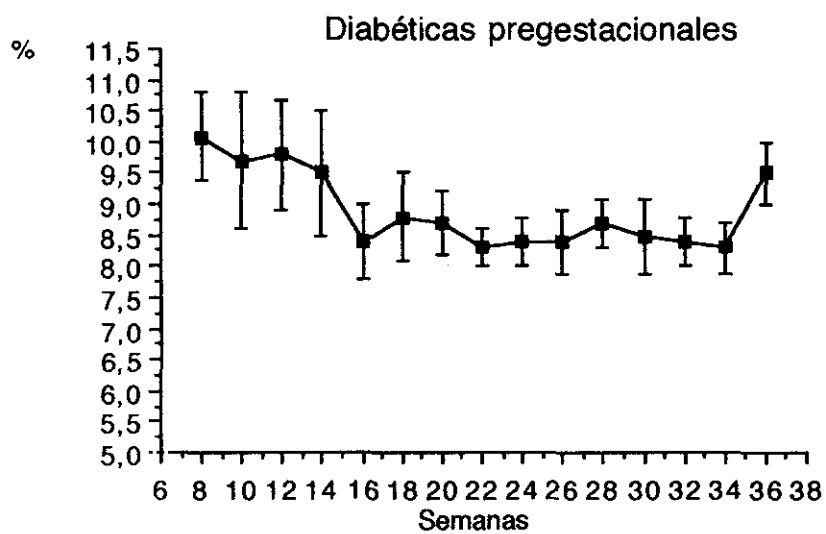
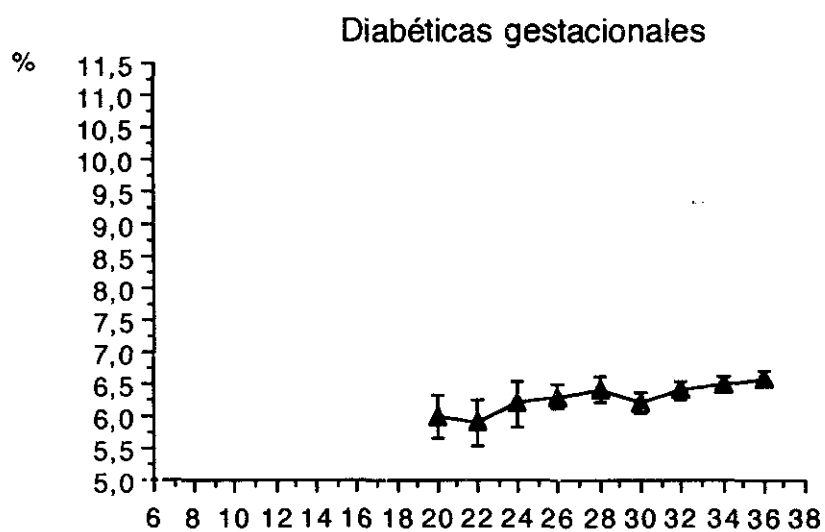
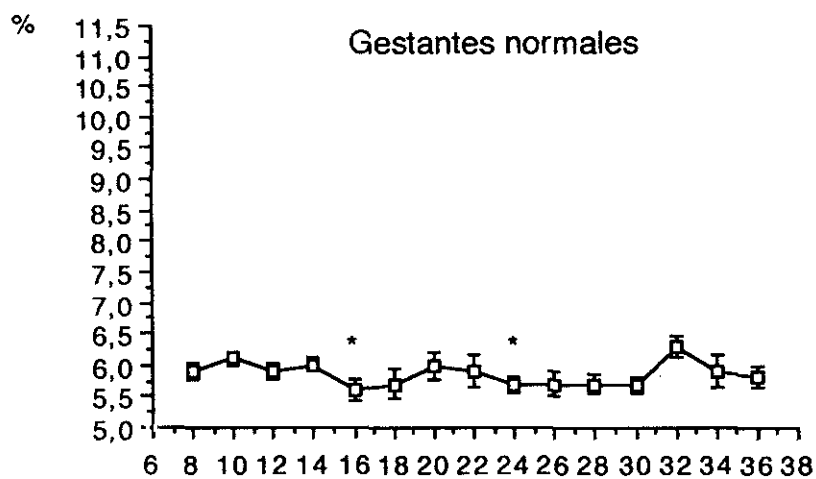


Figura 13.- Evolución de la glicohemoglobina ($\bar{x} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 15

NIVELES DE FRUCTOSAMINA (m mol/L) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS		SEMANAS														
		8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
GN	n	23	29	30	26	17	8	10	7	27	14	17	9	11	7	7
	\bar{x}	2,08	2,11	2,11	1,94	2,07	1,96	1,94	1,87	1,95	1,90	1,90	1,86	1,97	1,84	1,88
	DS	0,33	0,28	0,35	0,22	0,28	0,20	0,31	0,15	0,26	0,28	0,23	0,41	0,20	0,34	0,32
DG	n							10	12	14	17	22	36	36	45	53
	\bar{x}							2,03	1,94	1,96	2,15	2,02	1,94	1,94	1,95	1,97
	DS							0,33	0,27	0,26	0,27	0,26	0,24	0,26	0,24	0,28
DP	n	7	8	10	12	9	11	14	14	16	15	21	17	17	19	7
	\bar{x}	3,07	2,98	2,68	2,66	2,74	2,41	2,40	2,18	2,43	2,48	2,40	2,34	2,26	2,36	2,30
	DS	0,53	0,53	0,50	0,72	0,63	0,49	0,42	0,38	0,44	0,55	0,48	0,40	0,43	0,39	0,27
GN vs DG								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GN vs DP		***	***	**	**	**	ns	*	ns	**	**	**	**	ns	**	*
DG vs DP								ns	ns	**	ns	**	**	*	**	*

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

FRUCTOSAMINA

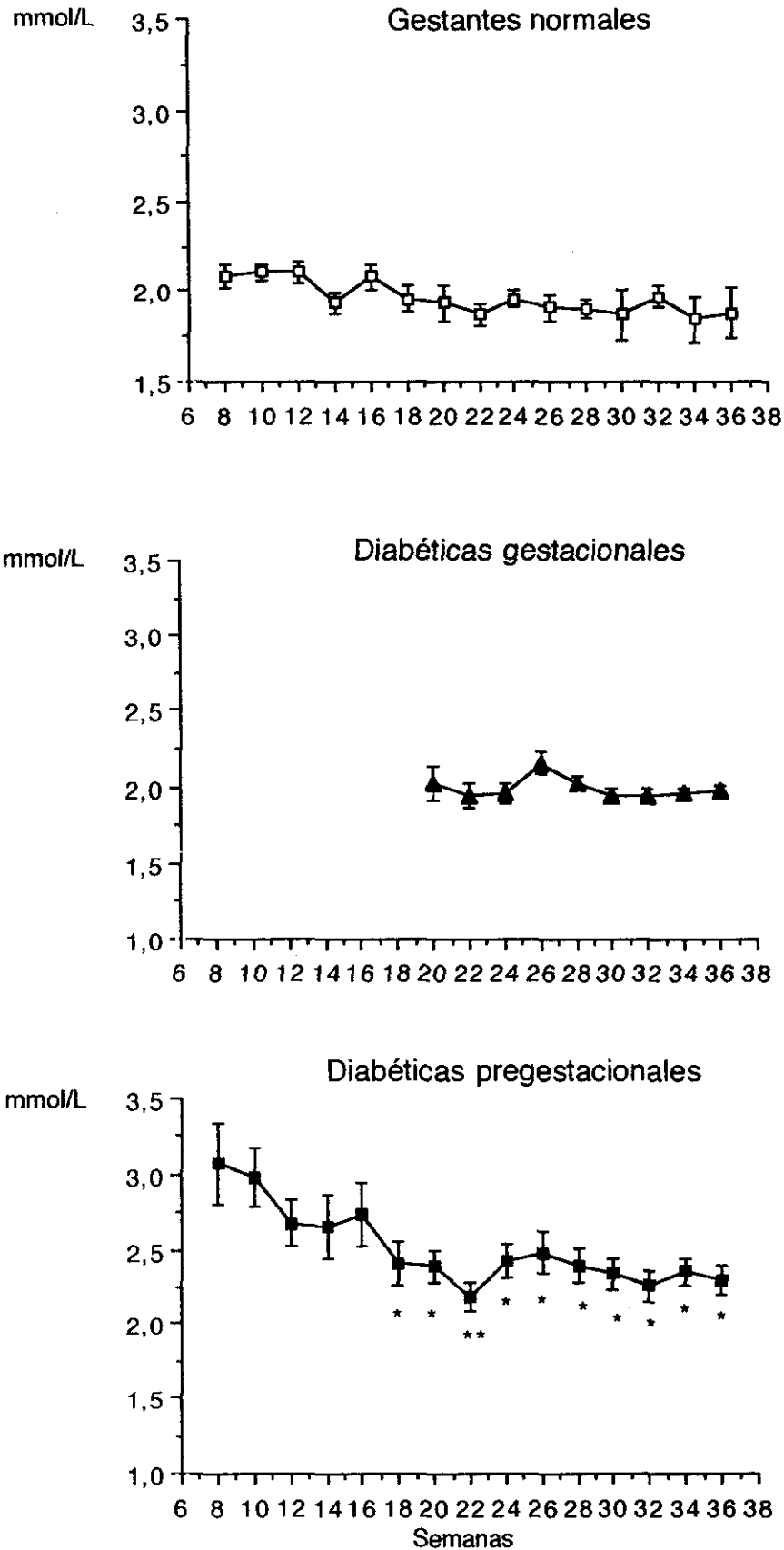


Figura 14.- Evolución de la fructosamina ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

Fructosamina corregida.- Sus niveles no experimentan variaciones significativas durante la gestación (tabla 16 y figura 15) en ninguno de los tres grupos estudiados, GN, DG y DP.

Observando comparativamente los resultados, existen diferencias aisladas entre GN vs DG y DG vs DP, al tiempo que entre GN y DP las diferencias se mantienen a lo largo de la gestación.

Proteínas totales glicadas.- Como muestran la tabla 17 y figura 16 no existen cambios significativos durante el embarazo en GN y DG. Por el contrario en DP, valores de $5,7 \pm 1,37$ % obtenidos en la 8ª semana, descienden a $4,4 \pm 0,96$ % en la 22ª ($p < 0,05$) permaneciendo en niveles similares hasta el final. Los niveles de estas proteínas son más elevados significativamente en el grupo DP que en GN y DG.

Albúmina glicada.- Al igual que en el parámetro anterior, no existen variaciones en GN y DG. (tabla 18 y figura 17), sin embargo en DP, asistimos a un descenso desde niveles de $4,2 \pm 1,27$ % (8ª semana) a $3,17 \pm 0,7$ % (22ª semana) ($p < 0,05$), manteniéndose estos porcentajes de glicación hasta finalizado el embarazo. El estudio comparativo entre los tres grupos es similar al referido para las proteínas totales glicadas.

Proteínas totales.- En la tabla 19 y figura 18 se observa un descenso significativo en GN a partir de la 22ª semana de gestación, no confirmándose éste en DG ni en DP, grupo en el que prescindimos de aquellas diabéticas portadoras de nefropatía. Por otra parte, no se aprecian diferencias al comparar durante el embarazo los niveles de proteínas totales sericas en los tres grupos estudiados.

Albúmina.- Esta fracción protéica, descendió de forma progresiva a lo largo de la gestación en GN, alcanzando su mayor significatividad a partir de la 24ª semana (tabla 20 y figura 19). En DG se comprobó un descenso significativo solo a la 36ª semana con respecto a la 20ª, momento del inicio de su control. En el grupo DP, sin nefropatía añadida, a partir de la 20ª semana objetivamos niveles significativa-

TABLA 16

NIVELES DE FRUCTOSAMINA CORREGIDA ($\mu\text{mol/g}$) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS	SEMANAS															
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	
GN	n	23	23	27	24	16	7	7	7	24	10	12	7	7	7	7
	\bar{X}	48,3	46,9	49,2	44,8	49,2	47,0	44,0	45,6	49,2	47,2	47,7	46,7	48,4	46,3	52,0
	DS	8,5	8,9	8,5	8,6	7,7	4,1	9,4	6,1	7,7	6,8	7,7	7,0	6,6	8,1	4,5
DG	n							7	8	7	12	15	31	27	37	40
	\bar{X}							54,0	51,9	53,6	62,5	57,6	52,0	53,3	53,8	56,3
	DS							9,2	6,9	10,2	9,2	6,5	9,7	8,0	9,5	10,1
DP	n	7	7	8	8	7	8	10	11	14	11	17	14	12	12	7
	\bar{X}	73,5	76,0	66,1	71,2	72,0	63,9	67,0	66,1	67,6	69,1	68,2	70,1	67,8	70,5	65,6
	DS	18,5	17,4	9,7	23,8	17,2	18,3	10,7	9,6	12,0	10,9	12,4	11,5	10,5	12,2	13,1
GN vs DG								ns	ns	ns	**	*	ns	ns	ns	ns
GN vs DP		***	***	**	**	**	*	**	*	***	***	***	***	**	**	ns
DG vs DP								*	ns	*	ns	*	***	**	**	ns

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

FRUCTOSAMINA CORREGIDA

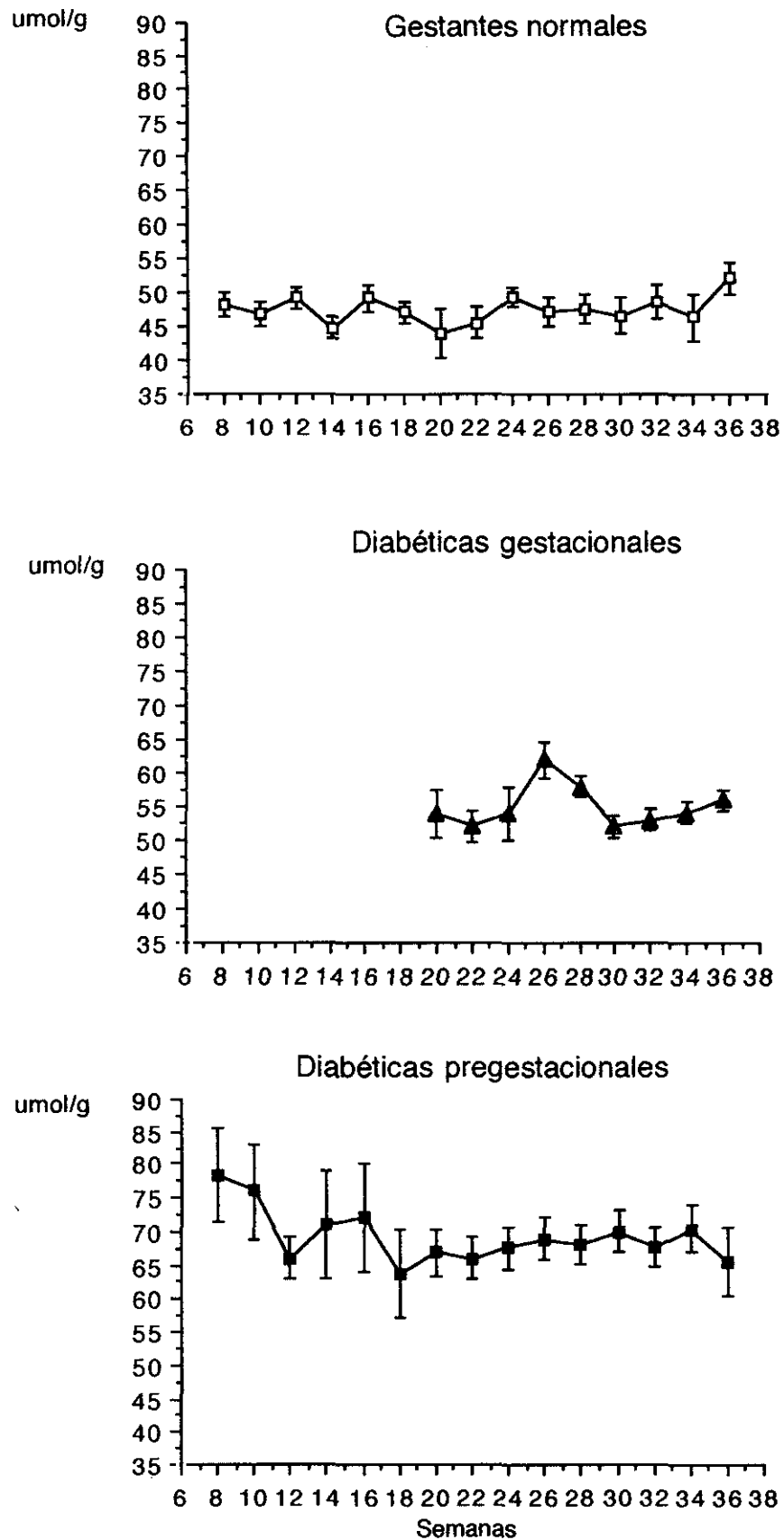


Figura 15.- Evolución de la fructosamina corregida ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 17

NIVELES DE PROTEINAS TOTALES GLICADAS (%) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS		SEMANAS														
		8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
GN	n	15	16	20	17	13	9	7	7	18	12	12	10	11	7	7
	\bar{X}	3,02	2,91	3,01	3,00	2,93	3,00	2,83	2,69	2,73	2,80	2,72	2,70	2,70	2,30	2,60
	DS	0,51	0,29	0,39	0,34	0,54	0,47	0,30	0,30	0,45	0,38	0,41	0,36	0,24	0,45	0,30
DG	n							8	8	7	15	16	32	32	38	40
	\bar{X}							3,10	3,27	3,01	3,20	3,10	2,96	3,01	3,02	3,02
	DS							0,30	0,35	0,31	0,32	0,34	0,32	0,34	0,33	0,31
DP	n	7	7	8	7	7	8	10	12	15	13	18	14	15	12	7
	\bar{X}	5,70	5,65	5,65	4,97	4,70	5,22	4,61	4,40	4,60	4,70	4,48	4,37	4,39	4,22	4,14
	DS	1,37	1,68	1,49	1,40	0,95	1,49	1,19	0,96	0,97	0,94	0,89	0,92	0,63	0,44	0,62
GN vs DG								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	*
GN vs DP		***	***	***	***	**	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***
DG vs DP								**	**	**	***	***	***	***	***	***

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$

*** $p < 0,001$

PROTEINAS TOTALES GLICADAS

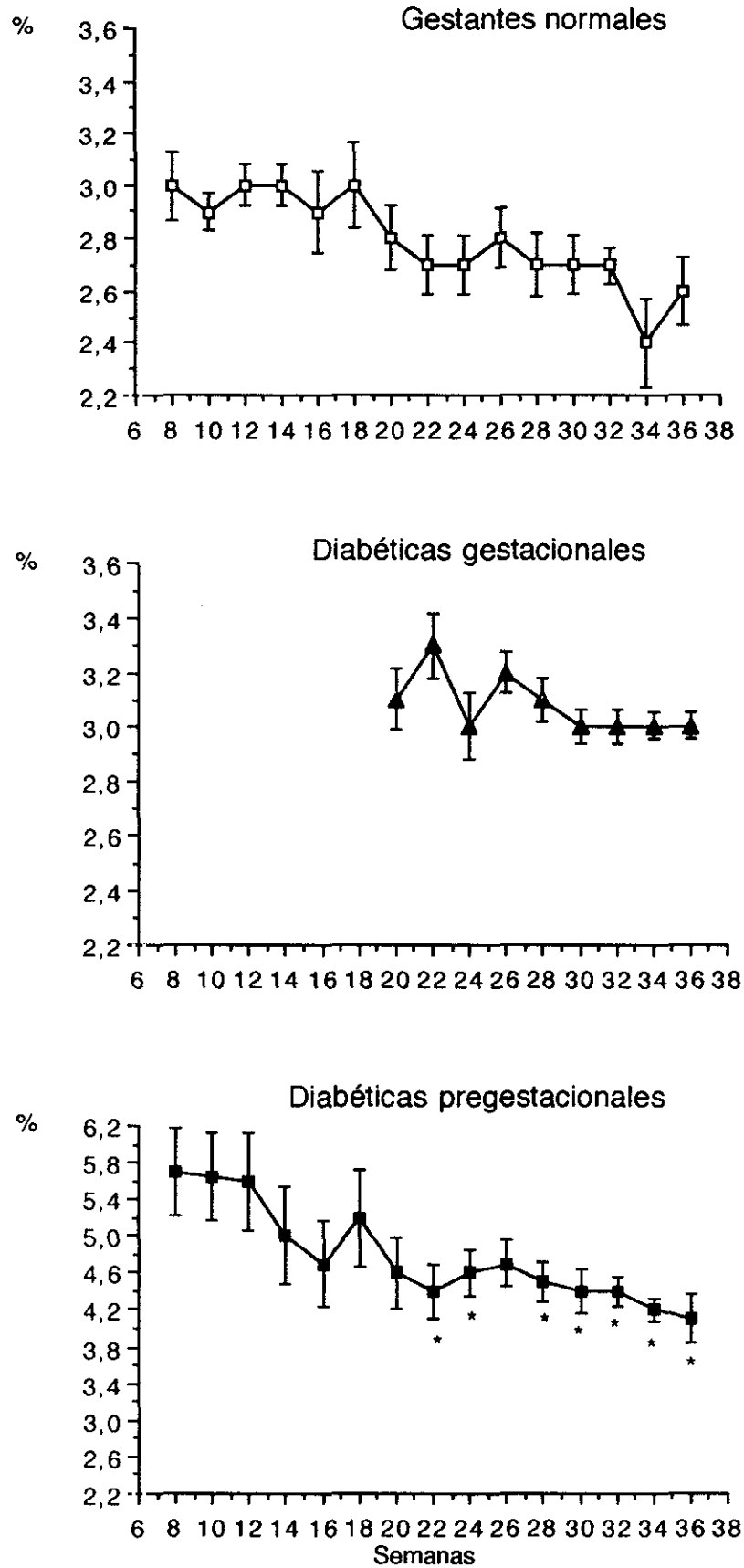


Figura 16.- Evolución de las proteínas totales glicadas ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 18

NIVELES DE ALBUMINA GLICADA (%) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS		SEMANAS														
		8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
GN	n	10	11	18	15	12	9	7	7	18	8	11	8	11	7	7
	\bar{X}	1,79	1,85	1,89	1,84	1,92	1,78	1,87	1,60	1,76	1,79	1,68	1,81	1,65	1,52	1,68
	DS	0,25	0,22	0,33	0,46	0,31	0,21	0,33	0,28	0,33	0,24	0,26	0,31	0,22	0,36	0,20
DG	n							7	8	7	14	14	29	28	37	36
	\bar{X}							2,03	2,02	1,95	2,14	2,01	2,07	2,09	2,07	2,09
	DS							0,25	0,29	0,27	0,27	0,27	0,30	0,28	0,32	0,38
DP	n	8	7	8	7	7	7	10	12	14	12	17	11	15	12	7
	\bar{X}	4,20	4,20	4,21	3,81	3,71	3,53	3,28	3,17	3,24	3,44	3,14	2,83	3,03	2,89	3,10
	DS	1,27	1,52	1,45	1,06	1,02	0,96	0,88	0,70	0,93	0,96	0,79	0,42	0,56	0,44	0,39
GN vs DG								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns
GN vs DP		**	**	**	ns	**	**	**	***	***	***	***	***	***	***	***
DG vs DP								**	**	**	***	***	***	***	***	***

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

ALBUMINA GLICADA

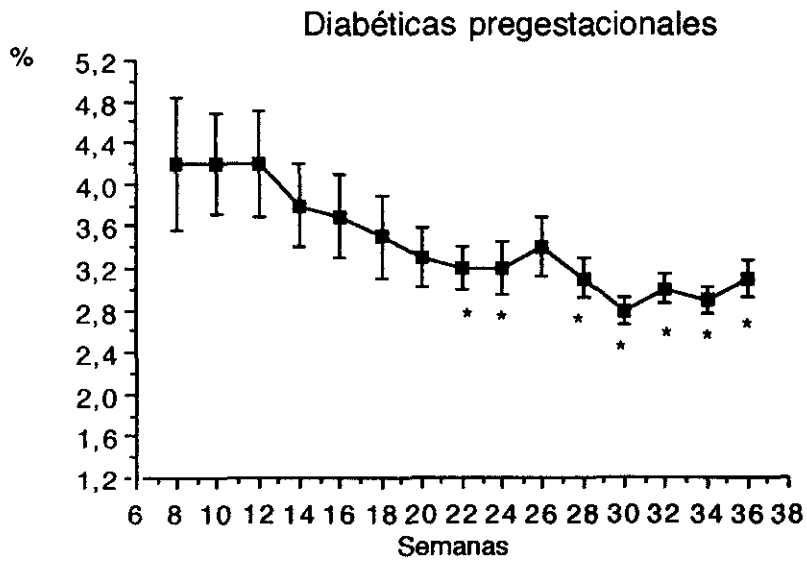
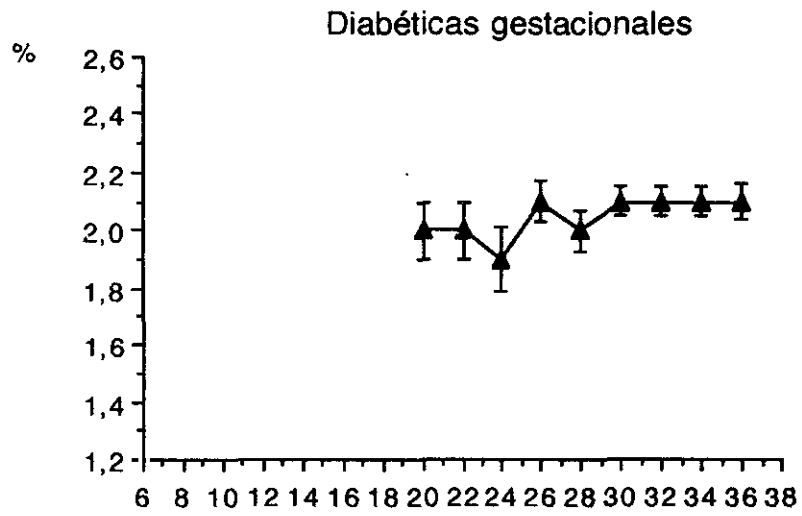
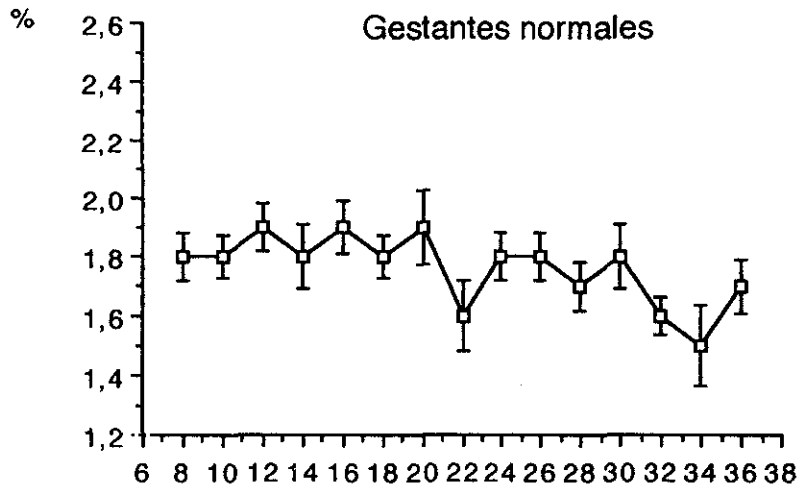


Figura 17.- Evolución de la albúmina glicada ($\bar{X} \pm$ ESM) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 19

NIVELES DE PROTEINAS TOTALES (g/L) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS		SEMANAS														
		8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
GN	n	24	24	27	24	16	8	7	7	25	10	12	7	8	7	7
	\bar{X}	68,8	69,1	67,9	67,2	66,9	66,3	66,1	64,3	62,4	61,7	65,0	63,6	64,2	61,0	63,5
	DS	3,7	4,1	3,9	3,1	4,1	4,0	5,2	3,9	2,9	4,8	4,5	4,2	4,7	4,7	6,1
DG	n							8	8	8	14	16	33	34	42	43
	\bar{X}							64,8	64,5	63,9	63,1	62,5	63,9	64,1	62,2	63,5
	DS							4,6	2,9	4,2	5,5	3,8	4,1	4,7	3,6	3,9
DP	n	7	7	8	7	7	8	9	10	12	11	15	12	14	11	7
	\bar{X}	67,2	64,8	65,4	64,8	63,0	64,5	63,9	63,2	63,4	64,0	62,6	62,4	63,2	62,1	61,6
	DS	3,8	1,7	3,4	3,1	6,3	4,8	3,5	3,6	4,3	4,5	6,3	4,0	3,7	3,4	2,7
GN vs DG								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GN vs DP		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
DG vs DP								ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns: no significativo.

PROTEINAS TOTALES

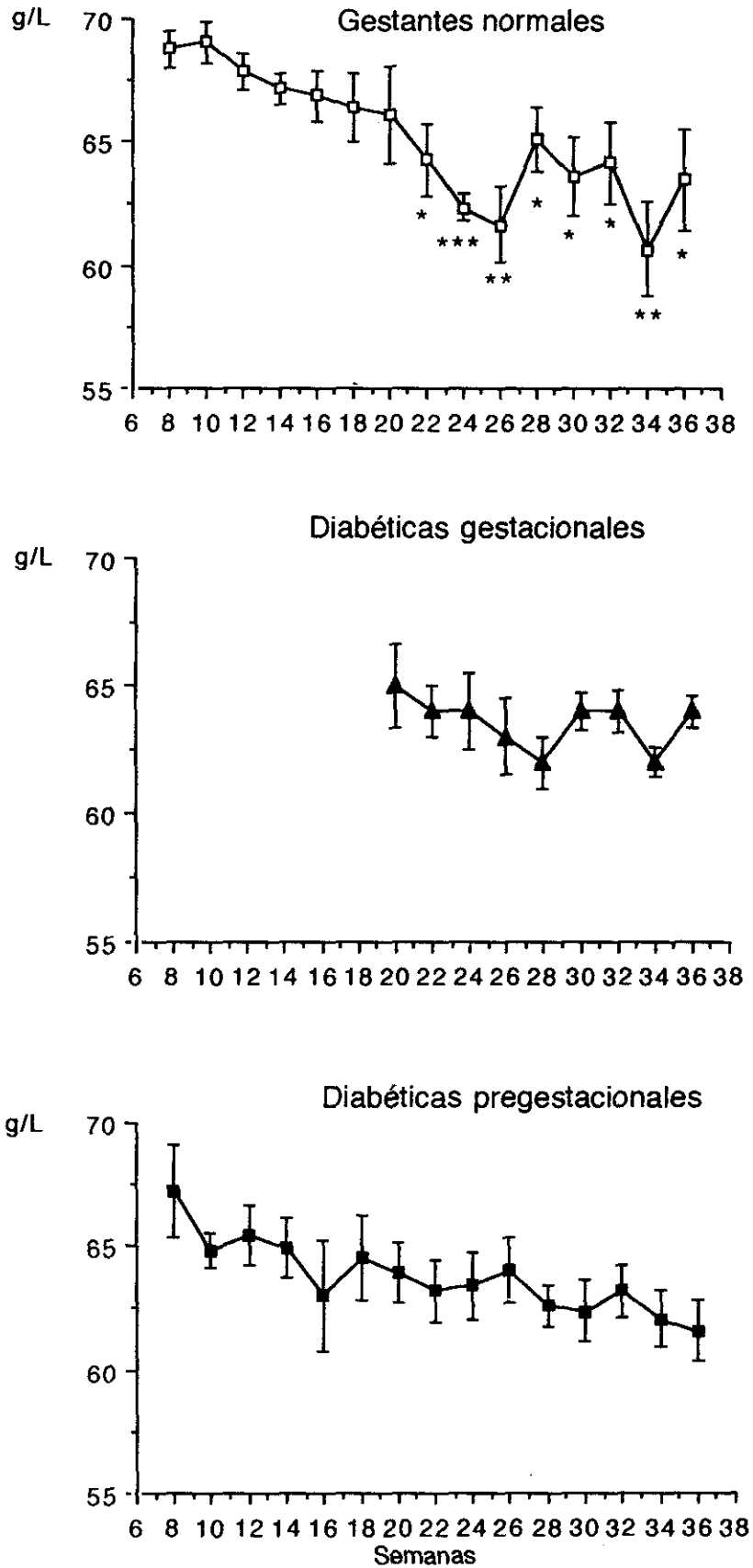


Figura 18.- Evolución de las proteínas totales ($\bar{x} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

TABLA 20

NIVELES DE ALBUMINA (g/L) DURANTE LA GESTACION EN LOS DIFERENTES GRUPOS ESTUDIADOS

GRUPOS		SEMANAS														
		8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
GN	n	24	24	27	24	16	8	7	7	25	10	12	7	8	7	7
	\bar{X}	45,4	45,3	43,1	43,7	42,8	42,6	42,5	41,4	39,5	39,0	39,8	39,4	40,0	38,5	38,2
	DS	3,7	3,6	2,3	2,8	2,6	1,9	4,3	4,4	2,8	2,4	2,5	1,8	1,8	2,5	0,96
DG	n							8	8	7	14	16	33	34	42	43
	\bar{X}							39,0	39,1	37,4	36,9	36,6	37,8	36,7	36,5	36,1
	DS							2,8	3,2	2,8	4,3	3,9	3,6	2,6	2,9	2,7
DP	n	7	7	8	7	7	8	9	10	12	11	15	12	14	11	7
	\bar{X}	41,5	41,1	41,0	38,5	37,5	38,6	36,8	35,9	36,5	37,1	36,7	34,7	35,8	35,6	35,8
	DS	1,0	2,4	3,5	2,5	1,7	3,3	2,9	2,6	4,2	2,3	2,5	2,3	2,6	2,0	2,5
GN vs DG								ns	ns	ns	ns	*	ns	**	ns	ns
GN vs DP		*	*	ns	**	**	*	**	**	**	*	*	*	**	ns	ns
DG vs DP								ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ $p < 0,001$

ALBUMINA

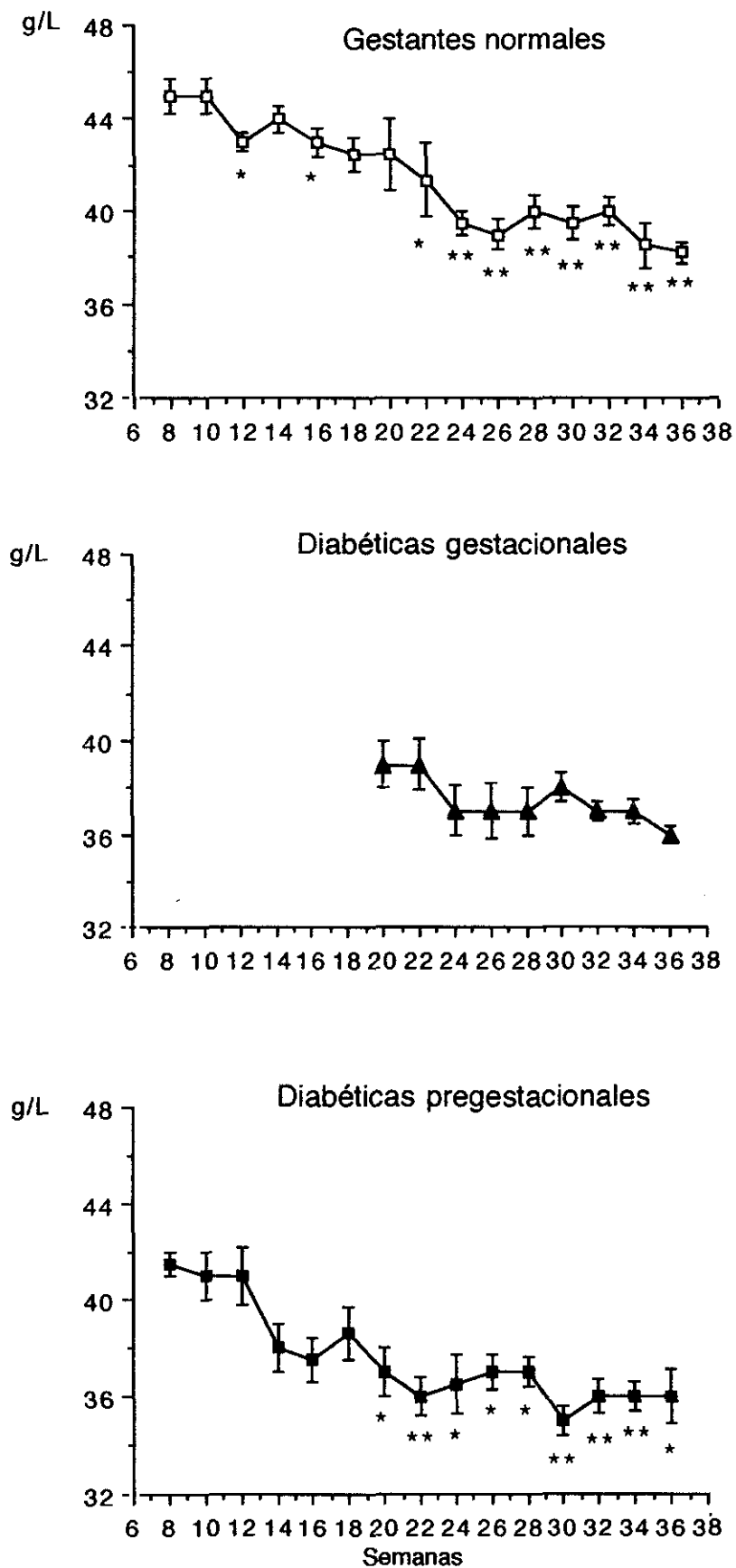


Figura 19.- Evolución de la albúmina ($\bar{X} \pm \text{ESM}$) a lo largo de la gestación en los diferentes grupos estudiados.

mente inferiores ($p < 0,05$). Analizando los valores obtenidos en los tres grupos precitados, observamos que éstos son superiores en GN frente a DP, diferencia que desaparece en las últimas semanas de la gestación.

En la figura 20 se observa el decremento medio de las diferentes proteínas glicadas en un intervalo de 2 semanas. Se comprueba que éste es mayor para la fructosamina ($16,6 \pm 8,9 \%$) y fructosamina corregida ($17,6 \pm 13,6 \%$), existiendo diferencia significativa ($p < 0,01$) con respecto a la HbA_{1c} ($6,3 \pm 3 \%$). Para la glicohemoglobina, proteínas totales glicadas y albúmina glicada, los descensos fueron de $9'3 \pm 5'5\%$, $10'7 \pm 6'4$ y $11'7 \pm 4'6$ respectivamente, no alcanzando diferencias significativas.

4.1.2 - CORRELACION ENTRE PROTEINAS GLICADAS Y SUS RELACION CON GLUCEMIAS PREVIAS.

- Correlación entre proteínas glicadas.

En la tabla 21 se expresan los coeficientes de correlación obtenidos para las diferentes proteínas glicadas en el grupo GN, observándose que éstos son bajos incluso entre las proteínas de similar vida media. Únicamente es de reseñar, como es lógico, el valor obtenido para la F y Fc ($r = 0,873$; $p < 0,001$).

En el grupo DG (tabla 22) se describen las correlaciones referentes a las mismas proteínas, y al igual que en GN, muestran resultados de escasa mención. Cabe destacar únicamente las correlaciones correspondientes entre PG y AG ($r = 0,392$; $p < 0,001$), HbA_{1c} y GHb ($r = 0,412$; $p < 0,001$) y F y Fc ($r = 0,834$; $p < 0,001$).

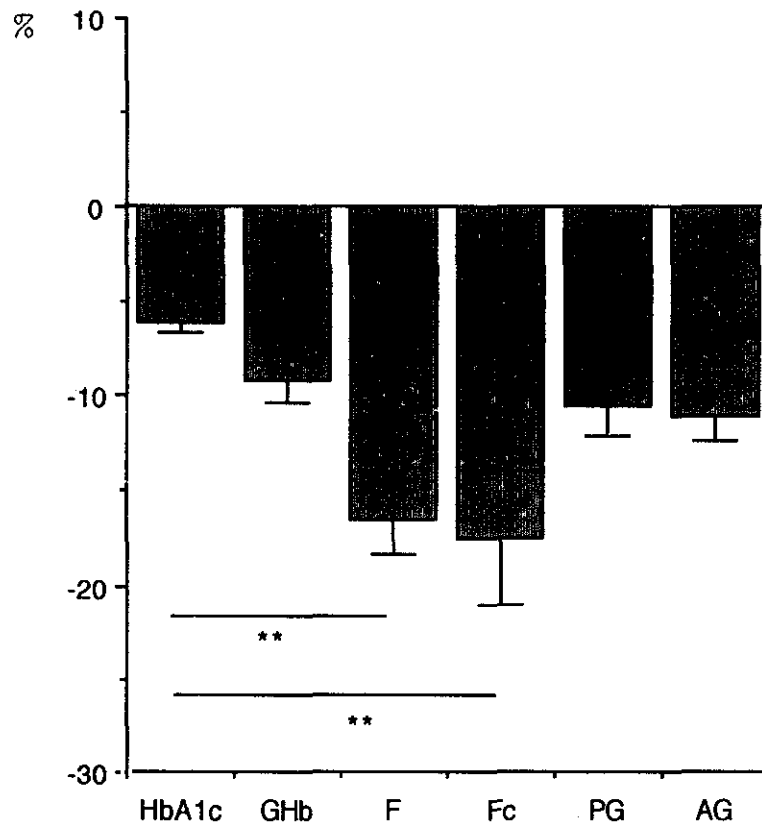


Figura 20.- Descenso medio (%) quincenal de las diferentes proteínas glicadas.

TABLA 21

^a
CORRELACION ENTRE PROTEINAS GLICADAS EN GESTANTES NORMALES (n)

	HbA _{1c}	GHb	F	Fc	PG	AG
AG	--	--	0,241** (143)	0,224* (134)	0,180* (165)	--
PG	--	--	0,262*** (168)	0,161* (159)	--	--
Fc	--	0,404*** (196)	0,873*** (201)	--	--	--
F	--	0,313 (225)	--	--	--	--
GHb	0,288*** (234)	--	--	--	--	--
HbA _{1c}	--	--	--	--	--	--

a coeficiente de correlación de Pearson.

* p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001

TABLA 22

^a
CORRELACION ENTRE PROTEINAS GLICADAS EN DIABETICAS GESTACIONALES (n)

	HbA _{1c}	GHb	F	Fc	PG	AG
AG	--	0,271*** (215)	--	--	0,392*** (224)	--
PG	0,140* (238)	0,150* (234)	--	0,153* (218)	--	
Fc	0,143* (225)	--	0,834*** (234)	--		
F	--	--	--			
GHb	0,412*** (257)	--				
HbA _{1c}	--					

a coeficiente de correlación de Pearson.

* p < 0,05 *** p < 0.001

La tabla 23 recoge la correlación obtenida entre las diferentes proteínas estudiadas en el grupo DP, observándose buenos coeficientes para las proteínas de parecida vida media: HbA_{1c} y GHb ($r = 0,873$; $p < 0,001$), PG y AG ($r = 0,883$; $p < 0,001$), F y Fc ($r = 0,890$; $p < 0,001$); siendo discretamente inferiores entre las de diferente vida media: PG y GHb ($r = 0,731$; $p < 0,001$), AG y GHb ($r = 0,771$; $p < 0,001$), PG y HbA_{1c} ($r = 0,683$; $p < 0,001$) y AG y HbA_{1c} ($r = 0,682$; $p < 0,01$).

Considerados globalmente las DG y DP, las correlaciones halladas son similares a las obtenidas para el grupo DP, si bien los coeficientes son discretamente superiores. (tabla 24).

- **Relación con glucemias previas.**

En el grupo DG, no se observó correlación entre los valores de F, Fc, PG y AG con respecto a las glucemias basales y postprandiales de 2 y 4 semanas previas. Asimismo, no se correlacionaron la HbA_{1c} y GHb con las glucemias basales y postprandiales de 4, 6 y 8 semanas previas.

En el grupo DP (tabla 25) existe una relación positiva estadísticamente significativa entre las proteínas glicadas y las glucemias previas, aunque los coeficientes de correlación son bajos. En lo que se refiere a las hemoglobinas glicadas (HbA_{1c} y GHb), la correlación es mejor con las glucemias basal y media que con la postprandial, no existiendo datos concluyentes respecto a en cual semana esta relación es mayor. De las proteínas glicadas (F, Fc, PG y AG), las que arrojan mejor correlación con las glucemias previas son la PG y AG, siendo esta más estrecha para la glucemia basal.

En el grupo total de gestantes diabéticas, (DG + DP) (tabla 26), la correlación obtenida fué superior que la referida en el grupo anterior. Las hemoglobinas glicadas no mostraron diferencias en los coeficientes de correlación tanto con respecto al tipo de glucemia

TABLA 23

^a
CORRELACION ENTRE PROTEINAS GLICADAS EN DIABETICAS PREGESTACIONALES (n)

	HbA _{1c}	GHb	F	Fc	PG	AG
AG	0,682** (154)	0,771*** (141)	0,352*** (140)	0,312*** (131)	0,883*** (143)	--
PG	0,683*** (160)	0,731*** (143)	0,481*** (140)	0,464*** (140)	--	
Fc	0,470*** (151)	0,430*** (148)	0,890*** (142)	--		
F	0,532*** (151)	0,431*** (156)	--			
GHb	0,873*** (153)	--				
HbA _{1c}	--					

a coeficiente de correlación de Pearson.

** p < 0,01

*** p < 0,001

TABLA 24

CORRELACION^a ENTRE PROTEINAS GLICADAS EN GESTANTES DIABETICAS (DG+DP) (n)

	HbA _{1c}	GHb	F	Fc	PG	AG
AG	0,765*** (367)	0,822*** (357)	0,543*** (360)	0,516*** (329)	0,910*** (368)	--
PG	0,770*** (398)	0,795*** (387)	0,621*** (360)	0,615*** (359)	--	
Fc	0,562*** (376)	0,500*** (367)	0,894*** (377)	--		
F	0,586*** (510)	0,526*** (376)	--			
GHb	0,862*** (411)	--				
HbA _{1c}	--					

a coeficiente de correlación de Pearson.

*** p < 0,001

TABLA 25

a
CORRELACION ENTRE PROTEINAS GLICADAS Y GLUCEMIAS PREVIAS
EN DIABETICAS PREGESTACIONALES (n)

GLUCEMIAS PREVIAS	HbA _{1c}	Ghb	F	Fc	PG	AG
GB2	--	--	0,270*** (158)	0,262** (115)	0,505*** (120)	0,355*** (113)
GB4	0,435*** (171)	0,396*** (95)	--	--	0,550*** (95)	0,491*** (89)
GB6	0,412*** (146)	0,433*** (79)	--	--	--	--
GB8	0,433*** (100)	0,578*** (64)	--	--	--	--
GP2	--	--	0,213** (156)	0,226* (114)	0,287** (119)	0,254** (112)
GP4	0,197** (172)	0,220* (95)	--	--	--	0,349*** (91)
GP6	0,174* (144)	0,306** (79)	--	--	--	--
GP8	--	0,284* (63)	--	--	--	--
GM2	--	--	0,249** (144)	0,210* (106)	0,301** (113)	--
GM4	0,421*** (175)	0,393*** (107)	0,208* (135)	0,197* (102)	0,316*** (108)	0,237* (101)
GM6	0,352*** (160)	0,362*** (97)	--	--	--	--
GM8	0,216** (144)	0,225* (86)	--	--	--	--

GB: glucemia basal. GP: glucemia postprandial. GM: glucemia media.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

a coeficiente de correlación de Pearson.

CORRELACION^a ENTRE PROTEINAS GLICADAS Y GLUCEMIAS
PREVIAS EN GESTANTES DIABETICAS (DG + DP) (n)

GLUCEMIAS PREVIAS	HbA _{1c}	GHb	F	Fc	PG	AG
GB2	--	--	0,430*** (393)	0,415*** (285)	0,669*** (299)	0,572*** (277)
GB4	0,564*** (393)	0,559*** (238)	0,298*** (311)	0,290*** (221)	0,677*** (236)	0,625*** (220)
GB6	0,538*** (320)	0,568*** (185)	--	--	--	--
GB8	0,539*** (255)	0,581*** (139)	--	--	--	--
GP2	--	--	0,399*** (391)	0,406*** (284)	0,581*** (298)	0,555*** (276)
GP4	0,499*** (394)	0,507*** (240)	0,278*** (313)	0,300*** (223)	0,546*** (238)	0,623*** (222)
GP6	0,426*** (318)	0,538*** (185)	--	--	--	--
GP8	0,421*** (254)	0,517*** (138)	--	--	--	--

GB: glucemia basal. GP: glucemia postprandial.

*** p < 0,001

a coeficiente de correlación de Pearson.

analizada (GB ó GP) como con la semana previa considerada. En las proteínas glicadas (F, Fc, PG y AG) se observó, al igual que en las DP estudiadas individualmente, como la correlación era superior para PG y AG. Existe variabilidad de comportamiento entre todas estas proteínas y su relación con la GB y GP.

4.2. - PROTOCOLO B.

RELACION DE PROTEINAS GLICADAS CON MORBILIDAD FETAL.

4.2.1. - MACROSOMIA FETAL.

En la tabla 27 se expresa la presencia o no de macrosomía en el grupo de 25 diabéticas pregestacionales estudiadas en el período 1989-90.

No observamos diferencia significativa entre los niveles de las diferentes proteínas glicadas durante el 3^{er} trimestre de la gestación en relación con la existencia o no de macrosomía fetal (tabla 28).

No existio asimismo buena correlación entre el índice ponderal fetal (IPF) y los valores obtenidos para las diferentes proteínas glicadas durante dicho trimestre.

En el grupo de 61 diabéticas gestacionales estudiadas durante el mismo periodo 1989-90 se observó la presencia de macrosomía en sólo dos pacientes, por lo que desde un punto de vista estadístico carece de valor el análisis de los niveles medios de las determinaciones de proteínas glicadas durante el 3^{er} trimestre del embarazo en relación con la aparición de la citada complicación fetal en este grupo de pacientes. La correlación obtenida en estas gestantes entre el IPF y los niveles de proteínas glicadas, en el trimestre anteriormente referido, queda expresado en la tabla 29.

TABLA 27

DISTRIBUCION DE MACROSOMIA (n) EN LAS DIABETICAS PREGESTACIONALES.
(1989 - 90)

		CLASES				
Macrosomía (7)	B(2)	C(2)	D(1)	D*(2)		
No macrosomía (18)	B(5)	C(1)	D(2)	D*(6)	F(4)	

* Presencia de valculopatía.

TABLA 28

NIVELES DE PROTEINAS GLICADAS ($\bar{X} \pm DS$) EN EL 3^{er} TRIMESTRE DE GESTACION EN DIABETICAS PREGESTACIONALES (1989 - 90)

PROTEINAS GLICADAS	n	Macrosomía	n	No macrosomía
HbA_{1c} (%)				
Total	31	5,67 \pm 0,97	71	5,73 \pm 0,68
SV	23	5,59 \pm 0,94	33	5,92 \pm 0,72
SN	31	5,67 \pm 0,97	56	5,82 \pm 0,64
GHb (%)				
Total	17	8,22 \pm 1,86	45	8,47 \pm 1,25
SV	11	7,61 \pm 1,53	25	8,58 \pm 1,49
SN	17	8,22 \pm 1,86	35	8,49 \pm 1,30
Fructosamina (m mol/l)				
Total	23	2,47 \pm 0,28	54	2,24 \pm 0,38
SV	16	2,51 \pm 0,29	24	2,37 \pm 0,37
SN	23	2,47 \pm 0,28	41	2,30 \pm 0,36
Fructosamina corregida (μ mol/g)				
Total	17	70,47 \pm 7,12	38	67,18 \pm 10,5
SV	12	71,25 \pm 7,68	21	67,80 \pm 10,1
SN	17	70,47 \pm 7,12	29	66,58 \pm 10,9
Proteínas totales glicadas (%)				
Total	18	4,27 \pm 0,61	44	4,21 \pm 0,49
SV	12	4,04 \pm 0,45	25	4,14 \pm 0,52
SN	18	4,27 \pm 0,61	35	4,14 \pm 0,47
Albúmina glicada (%)				
Total	18	3,02 \pm 0,43	41	2,96 \pm 0,40
SV	12	2,87 \pm 0,35	23	3,02 \pm 0,41
SN	18	3,02 \pm 0,43	32	2,96 \pm 0,43

n = n° determinaciones.

SV = sin vasculopatía.

SN = sin nefropatía.

TABLA 29

CORRELACION^a ENTRE IPF Y NIVELES DE PROTEINAS GLICADAS EN DIABETICAS GESTACIONALES
(1989 - 90)

	HbA _{1c}	GHb	F	Fc	PG	AG
IPF	0,346 (61)	-	-	-	0,335 (46)	-
Significación estadística	p < 0,01			p 0,05		

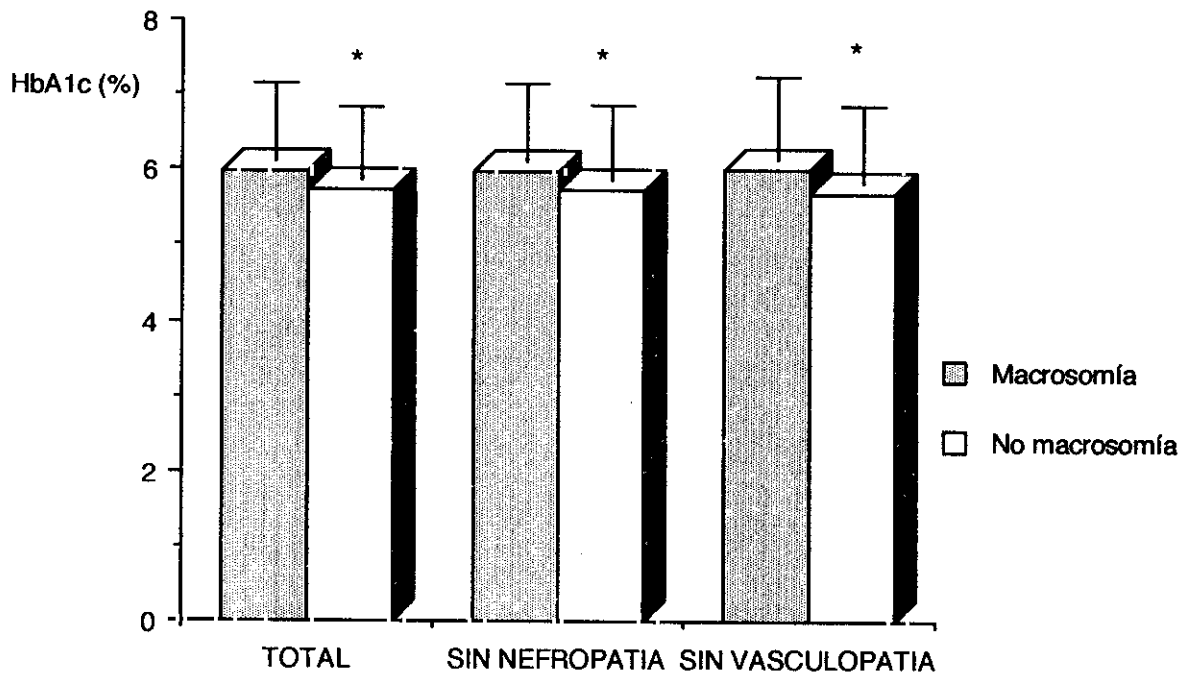
a Coeficiente de correlación de Pearson.
IPF Índice ponderal fetal
(n) nº de casos.

TABLA 30

DISTRIBUCION DE MACROSOMIA (n) EN LAS DIABETICAS PREGESTACIONALES.
(1983 - 90)

		CLASES				
Macrosomía (55)	B(29)	C(11)	D(3)	D*(11)	R(1)	
No macrosomía (97)	B(46)	C(15)	D(6)	D*(19)	F(7)	FR(4)

* Presencia de vasculopatía.



HbA _{1c} (%)	Macrosomía	No macrosomía
Total	5,96 ± 1,05	5,72 ± 0,96
SN	5,96 ± 1,05	5,74 ± 0,98
SV	6,02 ± 1,07	5,70 ± 1,03

Figura 21.- Niveles de HbA_{1c} (%) en el 3^{er} trimestre, en diabéticas pregestacionales (1983-90) con o sin macrosomía.

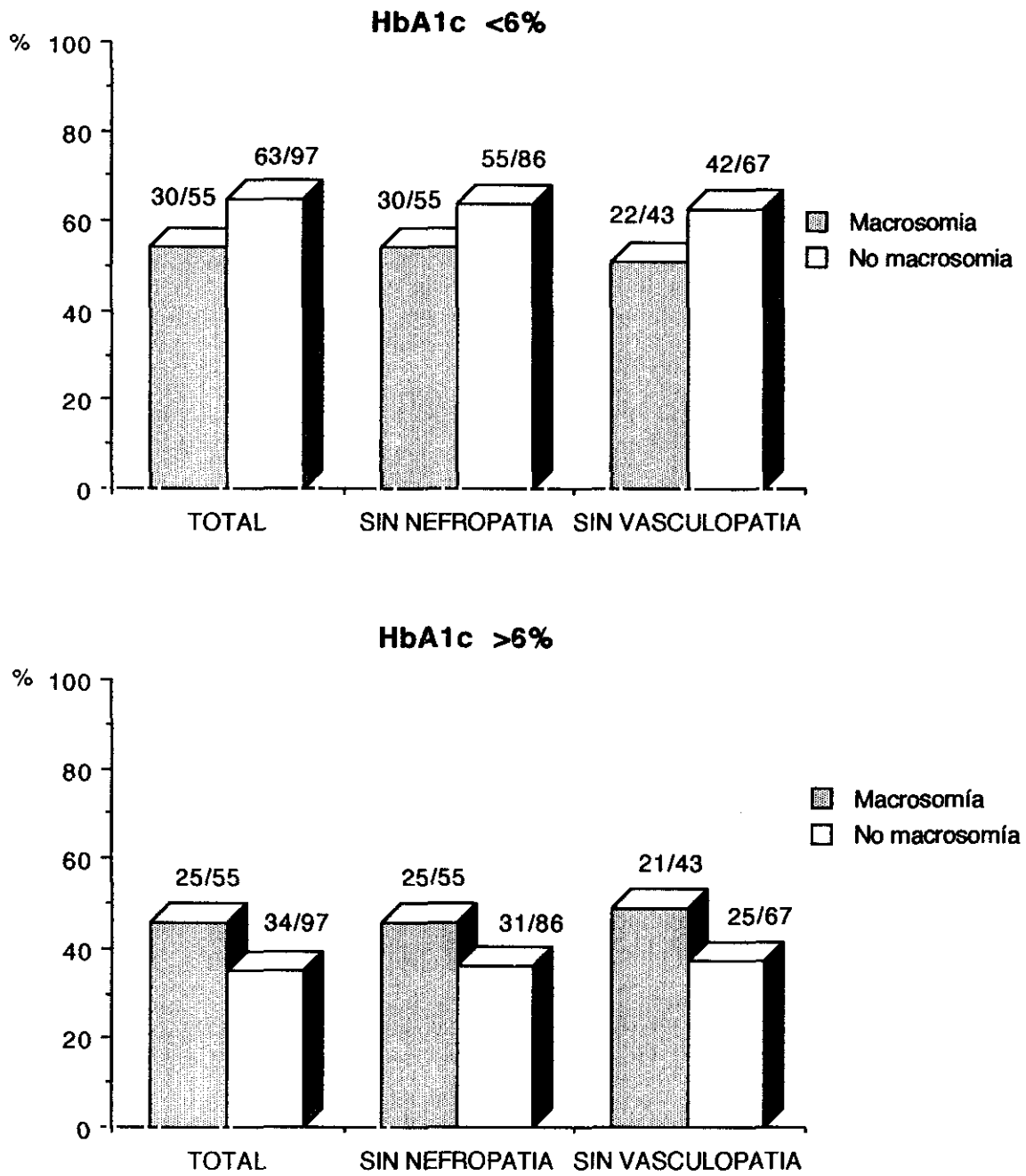


Figura 22.- Prevalencia de macrosomía en las diabéticas pregestacionales (1983-90) y calidad del control metabólico.

En la tabla 30 se describe en el conjunto de las 152 diabéticas pregestacionales controladas en el período 1983-90, la distribución de la macrosomía según la clase de diabetes.

En la figura 21 se observan las diferencias de niveles de HbA_{1c} encontradas en el 3^{er} trimestre, en este grupo, entre diabéticas con o sin macrosomía.

No se halló diferencia significativa con respecto a la prevalencia de macrosomía fetal en estas gestantes diabéticas, al considerar la calidad del control metabólico (figura 22). No existió correlación entre el IPF y los niveles de HbA_{1c} en este último grupo de diabéticas pregestacionales.

4.2.2. - MALFORMACIONES CONGENITAS.

En la tabla 31 se expresa la presencia y tipo de anomalías congénitas en un grupo de 73 diabéticas pregestacionales estudiadas durante el período 1983-90, haciendo referencia a la clase de diabetes perteneciente y al grado de malformación.

La figura 23 muestra los niveles de HbA_{1c} en el 1^{er} trimestre de la gestación en el grupo anterior de diabéticas, no encontrándose diferencias significativas entre pacientes con o sin malformaciones.

Si consideramos aisladamente las pacientes con malformaciones congénitas fetales mayores, tampoco se comprobó diferencia significativa entre sus valores medios de HbA_{1c} ($6,62 \pm 1,22$ %) y los del grupo de diabéticas gestantes sin malformaciones ($6,74 \pm 1,37$ %).

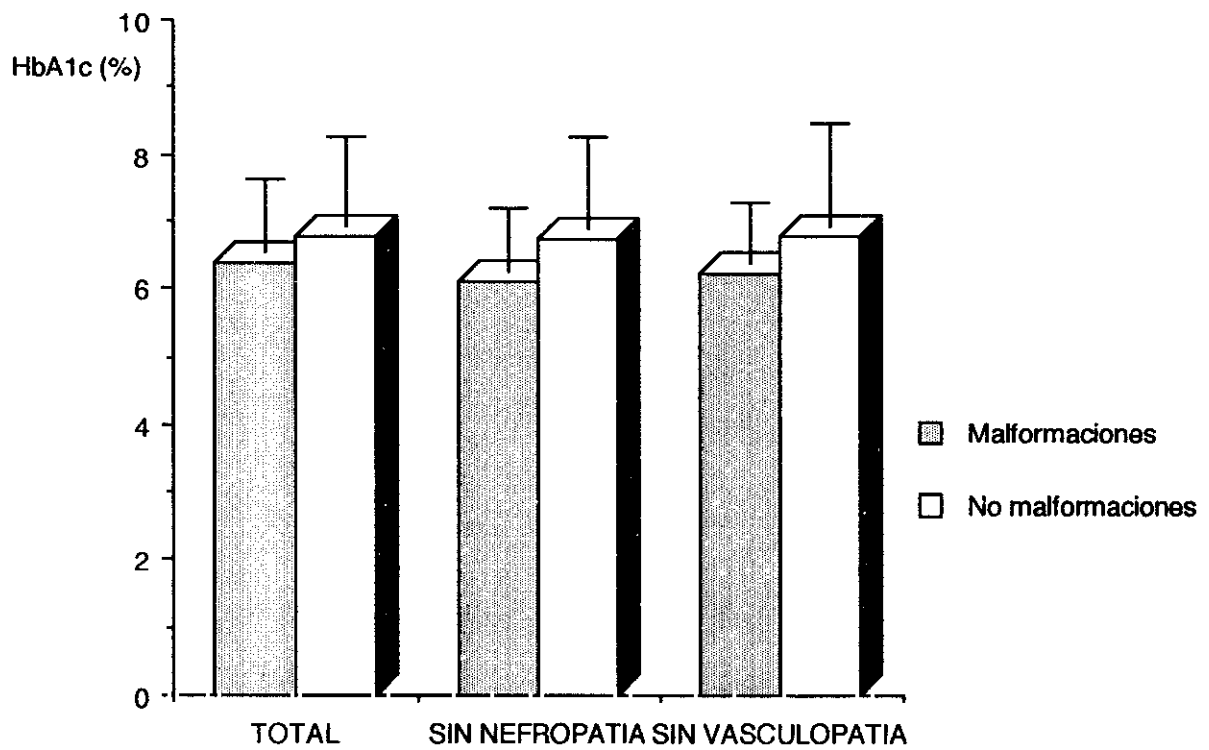
TABLA 31

DISTRIBUCION DE MALFORMACIONES CONGENITAS (n) EN DIABETICAS PREGESTACIONALES
(1983 - 90)

	CLASES
Malformaciones (8)	B - Escafocefalia B - Labio leporino ^a B - Comunicación interventricular + estenosis aórtica ^a C - Ductus persistente ^a C - Hidronefrosis ^a D*- Arteria umbilical única FR - Hidrocefalia y ectasia piélica ^a FR - Polimalformado ^a
No malformaciones (65)	B(29) C(10) D(3) D*(15) R(1) F(5) FR(2)

* Presencia de valculopatía.

a Malformaciones congénitas mayores.



HbA _{1c} (%)	Malformaciones	No malformaciones
Total	6,38 ± 1,08	6,74 ± 1,37
SN	6,07 ± 0,97	6,70 ± 1,40
SV	6,19 ± 0,93	6,77 ± 1,55

Figura 23.- Niveles de HbA_{1c} (%) en el 1^{er} trimestre, en diabéticas pregestacionales (1983-90) con o sin presencia de malformaciones.

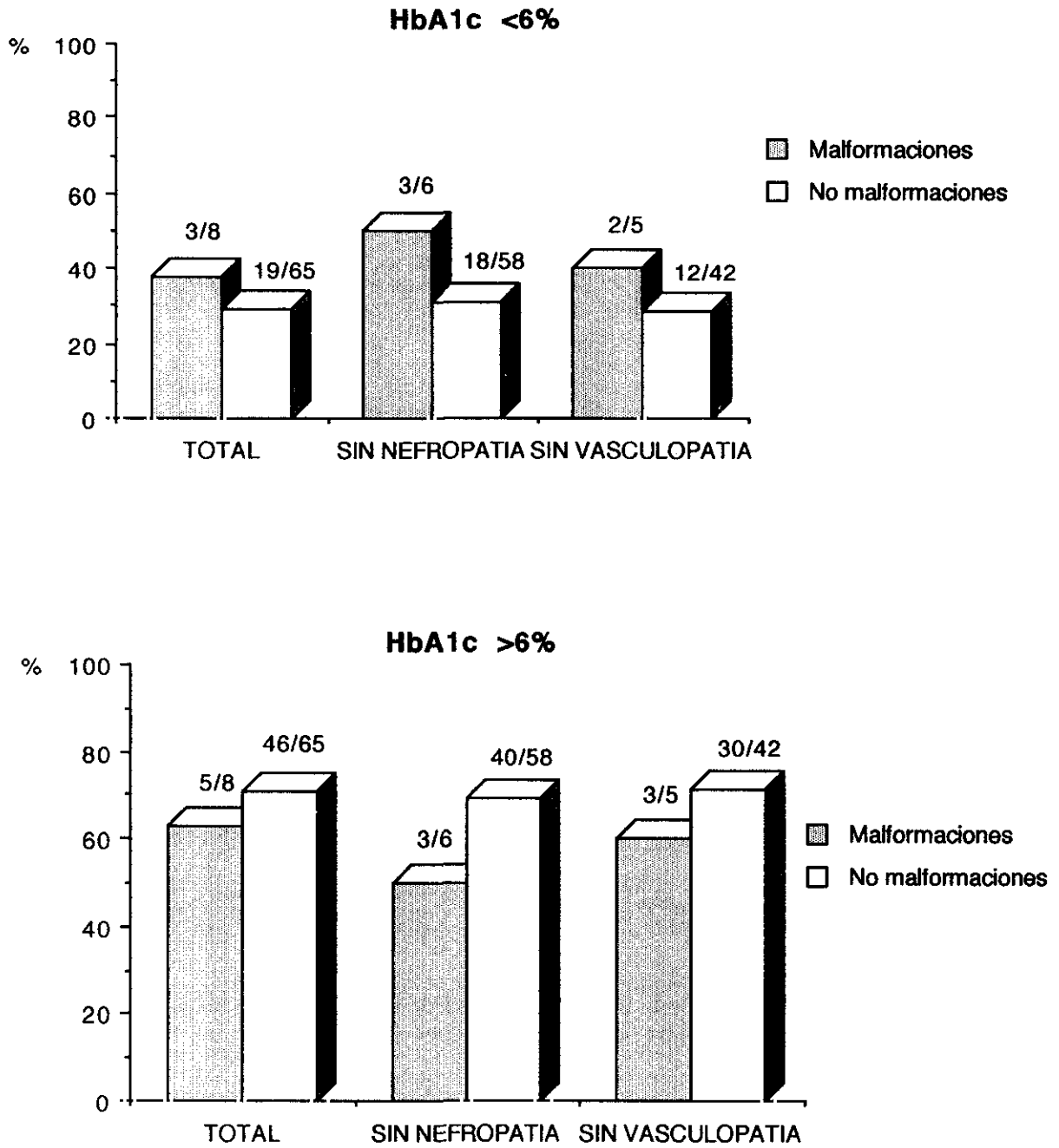


Figura 24.- Prevalencia de malformaciones en diabéticas pregestacionales (1983-90) y calidad del control metabólico.

Asimismo, no se halló diferencia con respecto a la prevalencia de malformaciones en estas gestantes en relación con la calidad del control metabólico (figura 24).

4.2.3. - MADUREZ PULMONAR FETAL.

En la tabla 32 se describe la distribución de las gestantes diabéticas estudiadas, según la semana de amniocentesis y calidad del control metabólico.

La tabla 33 muestra la incidencia de surfactante maduro en líquido amniótico a diferentes semanas de amenorrea, en gestantes diabéticas y no diabéticas. No existe diferencia entre el grupo de diabéticas con buen control y las gestantes no diabéticas.

En las gestantes diabéticas con mal control se observa surfactante maduro en el período de 32-34 semanas en un 25% siendo esta incidencia superior significativamente ($p < 0,05$) con respecto a los otros dos grupos. Entre la 35-36 semanas solamente un 5,2 % del grupo anteriormente citado presentaba surfactante maduro, no existiendo diferencia significativa con el grupo bien controlado y las no diabéticas. En las semanas 37-38 se objetiva una incidencia de surfactante maduro de sólo 25 % en las diabéticas con mal control, frente al 100 % que presentan los otros dos grupos estudiados, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

Los parámetros de control glucémico en diferentes períodos de la gestación quedan recogidos en la tabla 34.

En las gestantes con buen control no había diferencias entre el porcentaje de HbA_{1c} ni en los niveles de glucemia en los dos períodos estudiados, permaneciendo ambos dentro de los límites normales.

TABLA 32

DISTRIBUCION DE DIABETICAS PREGESTACIONALES (1983 - 90) (n = 66) Y GESTANTES CONTROLES (n = 52)
 EN RELACION CON LA SEMANA DE AMNIOCENTESIS

AMNIOCENTESIS (semanas)	GESTANTES CONTROLES	GESTANTES DIABETICAS	
		Buen control*	Mal control
32 - 34	20	7(3B, 1D, 3F)	24(9B, 3C, 8D, 4F)
35 - 36	20	10(5B, 5D)	19(8B, 5C, 5D, 1F)
37 - 38	12	2(1B, 1D)	4(2B, 1D, 1F)

* HbA_{1c} < 6% y no hipoglucemia.

TABLA 33

PARAMETROS DE CONTROL GLUCEMICO EN DIFERENTES PERIODOS DE LA GESTACION Y MADUREZ PULMONAR FETAL (n) ($\bar{X} \pm DS$)

CONTROL	MADUREZ PULMONAR	CLASE	14 - 27 semanas			28 - 37 semanas		
			HbA _{1c} %	Glucemia mg/dl	Ep/sem *	HbA _{1c} %	Glucemia mg/dl	Ep/sem *
BUENO	Normal (19)	9B, 7D, 3F	5,1±0,5 (133)	111,6±16,2 (1995)	---	5,1±0,5 (95)	102,6±16,2 (1425)	---
MALO	Aceleración(6)	3B, 3D	6,0±0,6 ^{ad} (42)	122,4±43,2 ^a (720)	6,4±1,3 ^a (6)	6,9±0,4 ^a (42)	120,6±39,6 ^a (540)	2,1(0-7) ^a (6)
	Retardo (3)	2B, F	7,3±0,5 ^{bcd} (21)	149,4±54 ^{bcd} (315)	---	6,0±0,5 ^{bc} (15)	117±37,8 ^{bc} (225)	---

* Episodios hipoglucémicos/semana.

a Mal control y aceleración de la madurez vs. Buen control p<0,001

b Mal control y retardo de la madurez vs. Buen control p<0,001

c Mal control y retardo de la madurez vs. Mal control y aceleración de la madurez p<0,001

d 14 - 27 semanas vs. 28 - 37 semanas p<0,001

TABLA 34

SURFACTANTE PULMONAR MADURO EN LIQUIDO AMNIOTICO A DIFERENTES SEMANAS DE AMENORREA
EN GESTANTES DIABETICAS Y CONTROLES

SEMANAS	GESTANTES CONTROLES	GESTANTES DIABÉTICAS	
		Buen control	Mal control
32 - 34	0% (0/20)	0% (0/7)	25% (6/24)*
35 - 36	30% (6/20)	30% (3/10)	5,2% (1/19)
37 - 38	100% (12/12)	100% (2/2)	25% (1/4)**

* P < 0,05

** P < 0,01

Las diabéticas mal controladas con aceleración en la madurez pulmonar fetal no presentaban diferencia en los valores de glucemia entre los dos períodos, sin embargo el porcentaje de HbA_{1c} era superior ($p < 0,01$) a las 28-37 semanas que en las 14-27 semanas, observándose en este periodo una mayor incidencia de episodios hipoglucémicos.

En el grupo de diabéticas con mal control y retardo de la madurez pulmonar se observa una diferencia mayor en las concentraciones de HbA_{1c} y glucemia entre los dos períodos estudiados siendo estas superiores en el período 14-27 semanas con respecto al período 28-37 semanas ($p < 0,001$).

4.3. - PROTOCOLO C.

ANALISIS DE LAS PROTEINAS GLICADAS EN LA ESTRATEGIA DIAGNOSTICA DE LA DIABETES GESTACIONAL.

El comportamiento de las proteínas glicadas en diabéticas gestacionales (DG) en el momento del diagnóstico (14-27 semanas), comparado con un grupo de gestantes normales (GN) de similar edad gestacional queda recogido en la tabla 35. En ella se observa diferencia significativa ($p < 0,05$) unicamente en los niveles de HbA_{1c} ($4,65 \pm 0,61$ % vs $4,32 \pm 0,34$ %).

En la tabla 36 se expresa la correlación en el grupo total de gestantes (GN + DG) entre las proteínas glicadas y los diferentes parámetros glucémicos: Glucemia basal (GB), suma de glucemias (ΣG) o área bajo la curva (ABC). Existió correlación positiva moderada por lo que respecta a las hemoglobinas glicadas.

En la tabla 37 se describe la sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo a diferentes niveles críticos de las proteínas estudiadas \bar{X} ; $\bar{X} + 1DS$ y $\bar{X} + 2DS$.

TABLA 35

PROTEINAS GLICADAS ($\bar{X} \pm DS$) EN GESTANTES NORMALES Y DIABETICAS GESTACIONALES

GRUPOS	n	SEMANAS	GB mg/dl	$\leq G$ mg/dl	ABC mg/dl/hr	HbA _{1c} %	Ghb %	F m mol/l	Fc μ mol/g	PG %	AG %
GESTANTES NORMALES	39	22,8 \pm 8,3	80,1 \pm 7,8	456,9 \pm 51,6	732,4 \pm 83,4	4,32 \pm 0,34	5,84 \pm 0,64	2,06 \pm 0,26	49,2 \pm 7,5	3,02 \pm 0,51	1,71 \pm 0,46
DIABETICAS GESTACIONALES	18	25,1 \pm 7,4	89,3 \pm 15,3	640,3 \pm 109,2	1041,1 \pm 190,2	4,65 \pm 0,61	6,47 \pm 1,15	2,14 \pm 0,29	49,5 \pm 7,1	2,97 \pm 0,45	1,8 \pm 0,45
Significación estadística		ns	p<0,01	p<0,001	p<0,001	p<0,05	ns	ns	ns	ns	ns

TABLA 36

CORRELACION^a ENTRE PROTEINAS GLICADAS Y PARAMETROS GLUCEMICOS EN GESTANTES NORMALES Y DIABETICAS GESTACIONALES (n = 57)

PROTEINAS GLICADAS	GB	≤G	ABC
HbA _{1c}	0,443 ^{***}	0,400 ^{**}	0,374 ^{**}
GHb	0,451 ^{***}	0,434 ^{**}	0,432 ^{**}
F	0,241	0,170	0,140
Fc	0,143	0,060	0,030
PG	0,190	0,020	0,020
AG	0,142	0,050	0,020

a Coeficiente de correlación de Pearson.

** p < 0,01 *** p < 0,001

TABLA 37

SENSIBILIDAD, ESPECIFICIDAD Y VALOR PREDICTIVO POSITIVO A DIFERENTES NIVELES
CRITICOS DE LAS PROTEINAS GLICADAS

PROTEINAS GLICADAS	NIVELES* CRITICOS	SENSIBILIDAD %	ESPECIFICIDAD %	VALOR PREDICTIVO POSITIVO %
HbA _{1c}	4,32	72	55	43
	4,66	44	82	53
	5	22	92	57
GHb	5,84	66	48	40
	6,48	50	80	56
	7,12	33	100	100
F	2,06	77	28	36
	2,32	33	77	42
	2,58	5	97	50
Fc	49,28	44	50	33
	56,85	11	84	40
	64,42	5	97	50
PG	3,02	38	48	28
	3,53	11	83	35
	4,06	5	97	50
AG	1,71	61	39	36
	2,17	22	80	40
	2,63	5	100	100

* \bar{X} , $\bar{X} + 1DS$, $\bar{X} + 2DS$

Las figuras 25 y 26 muestran las curvas de rendimiento diagnóstico obtenidas para las diferentes proteínas glicadas, observándose que las hemoglobinas (HbA_{1c} y GHb), arrojan mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad como test de screening que el resto de proteínas, si bien su rendimiento está lejos del óptimo.

La tabla 38 y figura 27 recogen los niveles de proteínas glicadas ($X \pm DS$) en gestantes con test de screening (TS) positivo o negativo.

Por lo que se refiere a las hemoglobinas glicadas, existen valores significativamente superiores en el grupo TS (+) frente al grupo TS (-) HbA_{1c} : $4,61 \pm 0,45 \%$ vs $4,42 \pm 0,44 \%$ ($p < 0,01$) y GHb: $6,24 \pm 0,88 \%$ vs $5,88 \pm 0,63$ ($p < 0,001$). En cuanto a las restantes proteínas glicadas no se observan diferencias objetivables.

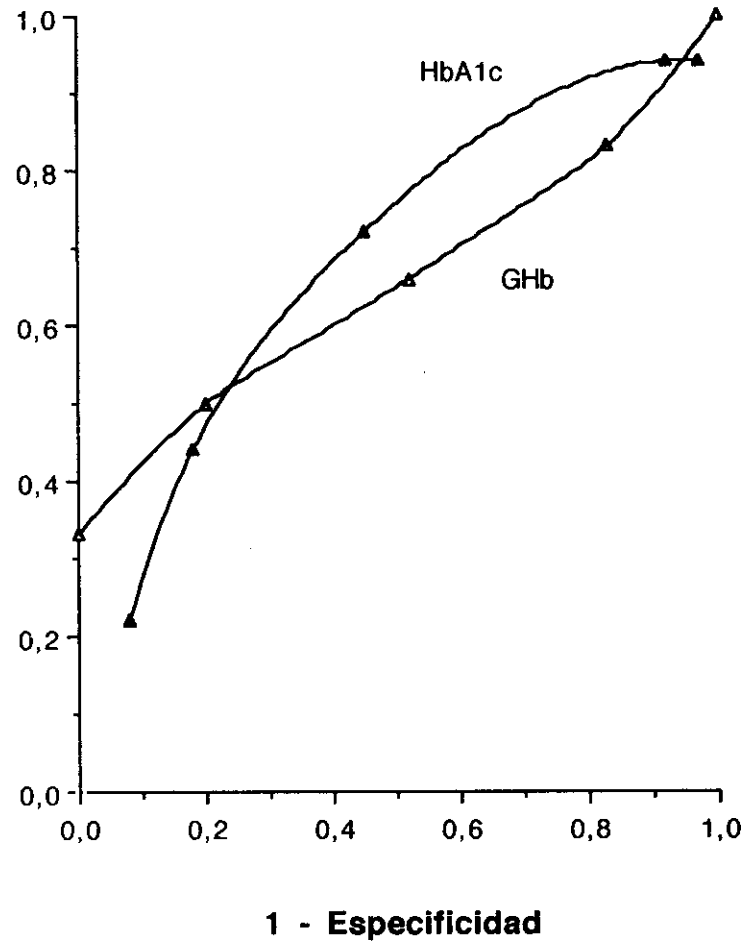
Sensibilidad

Figura 25.- Curvas de rendimiento diagnóstico de HbA_{1c} y glicohemoglobina (GHB)

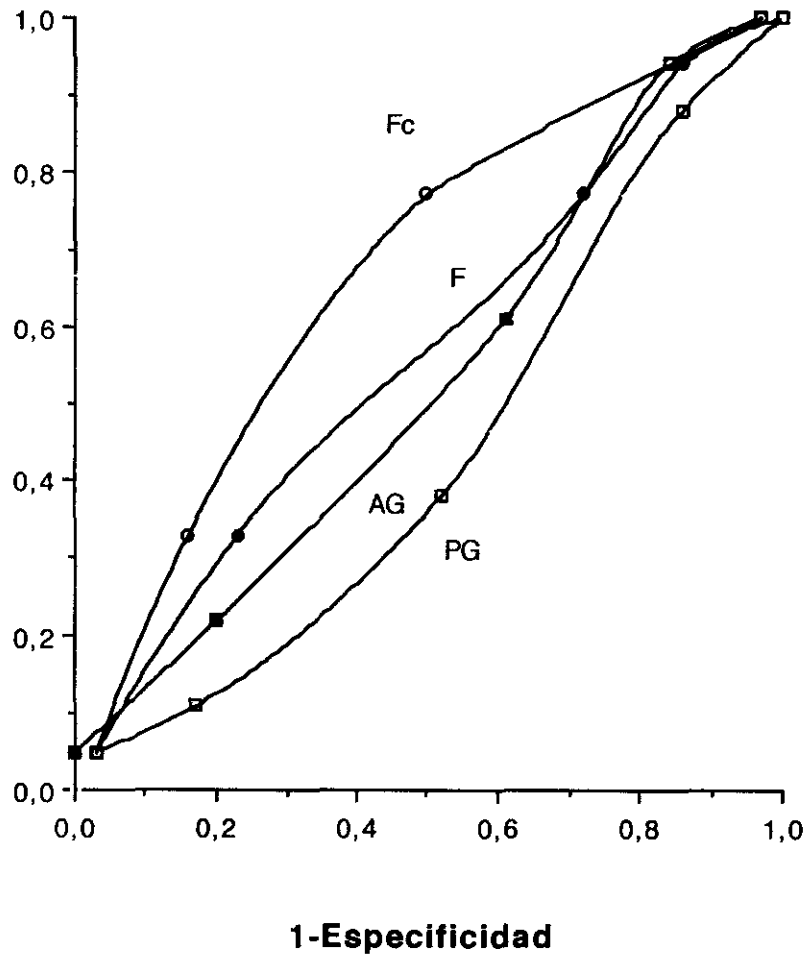
Sensibilidad

Figura 26.- Curvas de rendimiento diagnóstico de fructosmina (F), fructosamina corregida (Fc), albúmina glicada (AG) y proteínas totales glicadas (PG).

TABLA 38

PROTEINAS GLICADAS ($\bar{X} \pm DS$) EN GESTANTES CON TS(+) y TS(-)

GRUPOS	SEMANAS	HbA _{1c} %	Ghb %	F m mol/l	Fc μ mol/g	PG %	AG %
TS(+)	18,59±8,35 (70)*	4,61±0,45 (70)	6,24±0,88 (62)	2,03±0,31 (66)	47,9±7,9 (61)	2,91±0,49 (29)	1,73±0,30 (26)
TS(-)	16,71±8,64 (212)	4,42±0,44 (212)	5,88±0,63 (203)	2,00±0,31 (205)	47,6±8,0 (174)	2,80±0,41 (146)	1,78±0,31 (125)
Significación estadística	ns	p < 0,01	p < 0,001	ns	ns	ns	ns

* (n) nº casos.

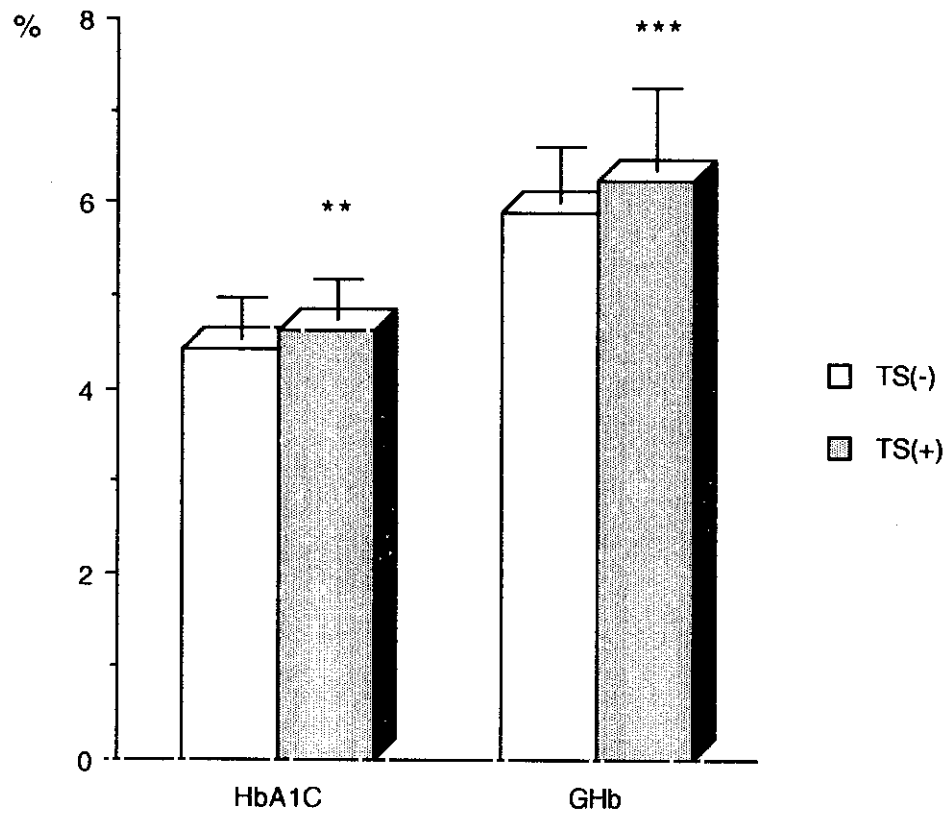


Figura 27.- Niveles de HbA_{1c} y glicohemoglobina (GHb) en gestantes con TS (+) y TS (-).

5.- DISCUSSION.

5.1 -- EVOLUCION DE GLUCEMIA Y PROTEINAS GLICADAS A LO LARGO DEL EMBARAZO EN GESTANTES NORMALES, DIABETICAS GESTACIONALES Y DIABETICAS PREGESTACIONALES.

A la hora de analizar la variación de los diferentes parámetros bioquímicos a lo largo de la gestación en embarazadas normales, es preciso tener en cuenta la consideración de los siguientes hechos: estudios longitudinales ó transversales, número de pacientes consideradas y frecuencia de toma de muestras.

Con respecto a la glucemia basal, en 1988, Lind y Aspillaga en un estudio longitudinal llevado a cabo en 69 gestantes normales, comprobaron la existencia de un nadir a las 12 semanas, manteniéndose este descenso a lo largo del embarazo. Según estos autores, el descenso precoz de la glucemia es difícil de explicar por el consumo de glucosa por el feto, ya que en estas semanas iniciales se encuentra escasamente desarrollado, siendo simplemente achacable a un nuevo reajuste homeostático de su nivel, con motivo de la gestación.

En nuestro estudio transversal en gestantes normales pudimos observar por el contrario, un descenso significativo de la glucemia a partir de la 24ª semana, en posible relación cronológica con la utilización fetal de glucosa y aminoácidos glucogénicos (alanina).

Los valores de la glucemia media durante la gestación, aumentan (Gillmer, 1975) o disminuyen (Cousins, 1980) en la segunda fase de la misma, según los diferentes autores. Resultados más concordantes se observan al considerar la tolerancia glucídica oral (Van Dieijen--Visser, 1986b) o intravenosa (Fisher, 1974) que parece deteriorarse fisiológicamente conforme avanza la gestación, acompañándose como es lógico de una mayor respuesta glucémica.

En nuestro grupo de gestantes normales, se pone de manifiesto un incremento en la respuesta glucémica a la hora de la administración oral de 50 g. de glucosa en el tercer trimestre, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por Phelps y cols. en 1983, que tras un nadir del referido valor a la 20ª semana, observaron un aumento ulterior de la glucemia hasta alcanzar de nuevo al final de la gestación, niveles similares a los presentes al inicio del embarazo.

En lo referente al comportamiento de la hemoglobina glicada a lo largo del embarazo en gestantes normales, los trabajos generalmente antiguos llevados a cabo, en los que hay que reseñar las diversas metodologías, escaso número de muestras y estudios casi siempre transversales, han mostrado diversos resultados. Así, desde no variaciones en la misma (Pollak, 1976), se ha documentado descenso a partir del segundo trimestre y su mantenimiento posterior (Lind, 1979; Van Dieijen-Visser, 1986b), descenso en el tercer trimestre y elevación postparto (Widness, 1980) o bien aumento a partir del segundo trimestre.

Dentro de los estudios más completos a este respecto, cabe citar los que a continuación reseñamos y que llegan a parecidas conclusiones.

Phelps y cols. en 1983 en estudio transversal llevado a cabo en 377 gestantes normales con valoraciones quincenales desde la 8ª semana, observaron como los niveles de hemoglobina A_{1c} muestran un nadir a la 24ª semana, con posterior ascenso hasta alcanzar un pico al final del embarazo.

Worth y cols. en 1985, por su parte en un estudio longitudinal de 21 gestantes normales con cinco determinaciones a lo largo del embarazo de hemoglobina glicada cuantificada por dos metodologías (cromatografía de intercambio iónico y colorimetría), comprobaron como en ambos

casos se objetiva un nadir de sus valores a la 17ª semana, con un subsiguiente pico en el parto y una caída postparto. Por último en 1986a, Morris y cols llevaron a cabo un seguimiento longitudinal en 49 gestantes normales, cuantificando la glicohemoglobina (cromatografía de afinidad) cada 4 semanas a partir de la 7-10 semanas de gestación, pudiendo definir la existencia de un nadir entre 23-26 semanas con retorno a sus valores iniciales a las 31-34 semanas.

En nuestro trabajo transversal, en 40 gestantes normales con valoración quincenal de la HbA_{1c} a partir de la 8ª semana, se pudo confirmar un descenso de la misma en la 16ª semana que se mantuvo con algunas oscilaciones hasta la semana 32ª en la que se observó un regreso a los valores obtenidos al principio del embarazo. Por lo que respecta a la glicohemoglobina, pudimos comprobar un comportamiento similar al referido anteriormente.

En resumen, de lo hasta aquí recogido, en la mayoría de los trabajos y en el nuestro parece ratificarse el patrón de un descenso de la hemoglobina glicada en el segundo trimestre del embarazo con posterior ascenso de la misma, para recuperar sus valores iniciales al final de la gestación. Para explicar las referidas oscilaciones, parece admitirse como causa fundamental las variaciones de los niveles glucémicos (Rhelphs, 1983; Worth, 1985). En este sentido, se ha tratado de relacionar el descenso de la glucemia basal objetivado en el comienzo del segundo trimestre con el nadir de la hemoglobina glicada (Worth, 1985; Lind, 1988), al tiempo que su ascenso ulterior parece derivarse del deterioro de la tolerancia glucídica que de forma progresiva tiene lugar en la segunda mitad del embarazo (Fisher, 1974; Van Dieijen-Visser, 1986b).

Una hipótesis poco plausible para explicar el descenso de la hemoglobina glicada en la gestación, sería la basada en el comportamiento eritrocitario durante la misma. (Lind, 1979). En el embarazo no parece alterarse la supervivencia del hematíe, lo que si se objetiva en su

transcurso es un incremento de la eritropoyesis con un aumento significativo de la masa eritrocitaria (Fadel, 1979; Lind, 1988), y el correspondiente predominio de hematíes jóvenes que presentan un menor contenido de hemoglobina glicada que los hematíes maduros (Fitzgibbons, 1976)). Se ha barajado sin confirmación, el posible papel coadyuvante de la ferroterapia oral instaurada rutinariamente en algunas gestantes; existiendo datos de que la corrección de anemias ferropénicas puede seguirse de descenso de la hemoglobina glicada (Brooks, 1980), hecho similar al que ocurre en el tratamiento de anemia por déficit de vitamina B₁₂ (Gram-Hansen, 1990).

En cuanto a la evolución de la fructosamina a lo largo de la gestación, todos los autores revisados han comprobado un descenso progresivo de la misma a partir del segundo trimestre (Roberts, 1986; Frandsen, 1988; Schlebusch, 1990). Se ha tratado de explicar dicho descenso de la fructosamina por la disminución de la glucemia basal durante la gestación (Roberts, 1986; Lind, 1988), pero fundamentalmente por la disminución de las proteínas totales (Van Dieijen-Visser, 1986a).

En nuestro trabajo no hemos podido comprobar descenso de la fructosamina a lo largo de la gestación en gestantes normales, así como tampoco de la fructosamina corregida en relación con los niveles de albúmina plasmática. Sí confirmamos, al igual que otros estudios (Lind, 1984), el descenso progresivo de las proteínas plasmáticas y de la albúmina, a partir del segundo trimestre de la gestación. Este hecho se ha relacionado con la expansión de volumen plasmático que ocurre en el embarazo, si bien, se ha sugerido por Lind y Colsen, 1988 que la referida disminución de la concentración de proteínas, precede a la instauración de la máxima hemodilución durante el tercer trimestre de de la gestación.

A diferencia de la fructosamina que se expresa en valores absolutos (mmol/l), las proteínas totales glicadas, la albúmina glicada, así como la hemoglobina glicada, cuya concentración es expresada como porcentaje, no se ven interferidas por el descenso de las proteínas y albúmina que tiene lugar en el transcurso de la gestación.

Con respecto al comportamiento de las proteínas totales glicadas cuantificadas mediante cromatografía de afinidad, los datos recogidos en la literatura (Nelson, 1985; Morris, 1986a) no muestran variaciones significativas de las mismas a lo largo del embarazo, hecho confirmado en nuestro estudio.

Similares resultados hallamos en la evolución de los niveles de albúmina glicada, sobre lo que no hemos encontrado referencias en la bibliografía a este respecto.

En cuanto al valor global de proteínas glicadas y albúmina glicada en las gestantes normales se han descrito niveles inferiores en relación a mujeres controles (John, 1985; Leiper, 1985).

En el análisis del comportamiento de la glucemia basal y postprandial en las diabéticas gestacionales a lo largo del embarazo, el mayor o menor descenso va a estar relacionado con el grado de control metabólico, obtenido a partir de la instauración del correspondiente tratamiento. Al igual que datos previos de no modificación de estos parámetros (Grande, 1989), en el presente trabajo, comprobamos que la glucemia basal y la glucemia postprandial no experimentan modificación ostensible conforme avanza la gestación.

Los niveles medios de hemoglobina glicada en diabéticas gestacionales son generalmente superiores a los hallados en gestantes normales (Pallardo, 1981; Morris, 1986b). En nuestra serie parece observarse a lo largo de la gestación una tendencia a valores más elevados de hemoglobina glicada (HbA_{1c} y GHb) en diabéticas gestacionales, pero sin llegar a ser nunca significativa con respecto a gestantes normales. Este aumento parece estar relacionado, como es lógico, con el mayor grado de concentración media de glucemia que presentan estas pacientes (Fadel, 1979).

En la mayoría de los estudios llevados a cabo (Widness, 1980; Grande 1989) y en el nuestro propio no parecen objetivarse variaciones de la hemoglobina glicada durante la gestación. Cabe citar no obstante el trabajo de Morris y col en 1986a, que en un estudio longitudinal de 21 diabéticas gestacionales, encontraron un aumento inicial de los niveles de glicohemoglobina a las 11-14 semanas con tendencia al descenso ulterior hasta la 23-26 semanas.

En cuanto a la consideración de otras proteínas glicadas, los datos con relación a la diabetes gestacional son escasos. Se han descrito valores de fructosamina similares (Frandsen, 1988; Doery, 1990) o más elevados de los hallados en gestantes normales, especialmente cuando se trata de diabéticas gestacionales con terapia insulínica (Roberts, 1988).

Otros autores (Morris, 1986a) cuantificando proteínas totales glicadas mediante cromatografía de afinidad, refieren niveles superiores en diabéticas gestacionales, confirmando en estudio realizado a lo largo del embarazo un descenso significativo de 11-14 semanas a 19-22 semanas.

Nosotros en un estudio previo (Grande, 1989) no encontramos variaciones de fructosamina a lo largo del embarazo en un grupo de 74 diabéticas gestacionales estudiadas cada cuatro semanas.

Por lo que a nuestro trabajo actual se refiere, cuando tratamos de ver el comportamiento de la fructosamina, fructosamina corregida por albúmina, proteínas totales glicadas y albúmina glicada en la diabetes gestacional, observamos que si bien los valores son superiores a los referidos para gestantes normales, esta diferencia salvo en casos aislados, como con la fructosamina corregida, suele no ser significativa.

Tampoco se comprueba variación de estas proteínas glicadas en el transcurso de la gestación en las diabéticas gestacionales.

La dificultad de objetivar un descenso de los diferentes parámetros bioquímicos analizados a lo largo del embarazo en este grupo de gestantes, creemos que puede estar en parte influido porque el momento inicial considerado como referencia para valorar el citado descenso, tiene lugar en una fase tardía de la gestación (20ª semana) y no en fase más precoz (8ª semana) como ocurre en gestantes normales y diabéticas pregestacionales.

En el grupo de diabéticas pregestacionales estudiado por nosotros, comprobamos como durante el embarazo los niveles de las diferentes proteínas glicadas fueron significativamente superiores a los hallados en las gestantes normales y diabéticas gestacionales, siendo estas diferencias existentes menores para la fructosamina y fructosamina corregida así como cuando la comparación tiene lugar en las últimas semanas del embarazo, fruto de haber conseguido ya un mejor control metabólico de las pacientes. Por lo que a las proteínas totales se refiere, no hubo diferencia entre los tres grupos (GN, DG y DP), al tiempo que la albúmina mostró niveles significativamente inferiores en el grupo de diabéticas pregestacionales frente a gestantes normales, lo que teóricamente pudiera interpretarse como una alteración en su síntesis en el contexto de su patología de base, ya que descartamos del grupo de diabéticas pregestacionales aquellas portadoras de nefropatía diabética.

En los múltiples trabajos de la literatura (Pollak, 1979; Nelson, 1985; Grande, 1989) se ha confirmado la elevación en diabéticas pregestacionales de las diferentes proteínas glicadas. Llama la atención la circunstancia de comprobar en ocasiones como los valores de hemoglobina glicada son inferiores en gestantes diabéticas que en diabéticas no embarazadas (Kjaergaard, 1979; Pallardo, 1981), lo cual parece debido a que el primer grupo de estas pacientes está sometido a un más estricto control metabólico de su enfermedad o más raramente a un mecanismo compensador del organismo materno, ya que los niveles elevados de HbA_{1c} disminuyen la liberación de oxígeno por la hemoglobina a nivel tisular fetal (Vintzileos, 1980).

En las diabéticas pregestacionales de nuestro trabajo y al igual que en otros de la literatura (Widness, 1980; Leiper, 1985), más o menos paralelamente al descenso de la glucemia (basal, postprandial y media), a partir del segundo trimestre del embarazo, se confirma la existencia de una disminución significativa de las diferentes proteínas glicadas (HbA_{1c} , fructosamina, proteínas totales glicadas, albúmina glicada), a excepción de la glicohemoglobina, posiblemente debido al mayor coeficiente de variación interensayo que presenta su cuantificación. Por otra parte, si corregimos la fructosamina por los valores de albúmina, como éstos descienden a lo largo del embarazo, observamos como no existe variación de la misma en la circunstancia que nos ocupa.

La no existencia en los tres grupos de gestantes estudiados de un descenso significativo de las proteínas totales, paralelo al descenso de la albúmina, nos hace pensar en el papel que juegan el aumento de otras fracciones proteicas durante la gestación (Lind, 1976) y mas posiblemente en asociación con la diabetes. Esto no obstante contradice los resultados obtenidos por Lind y Aspillaga en 1988 que confirmaron un descenso similar de proteínas totales en gestantes normales y diabéticas pregestacionales.

Con respecto a la cronología del descenso de las proteínas glicadas en diabéticas pregestacionales sometidas a correcto tratamiento, Leiper y cols. en 1985, comprobaron como las proteínas de vida media corta (albúmina glicada, proteínas totales glicadas), descienden más precozmente que las proteínas de vida mas larga (hemoglobina glicada), circunstancia no comprobada por nuestro grupo en trabajo previo (Grande, 1989) ni en el actual, en el que si bien la disminución significativa de la fructosamina (18ª semana), precede a la de la HbA_{1c} (20ª semana), la de la albúmina glicada y proteínas totales glicadas es posterior (22ª semana).

La diferencia de resultados con el trabajo anteriormente citado de Leiper y cols. (1985) se debe al hecho de que este autor selecciona dentro de diabéticas pregestacionales solo aquellas que han mostrado el mejor control metabólico durante la gestación.

En nuestro actual estudio, existen resultados similares con dicho trabajo en el sentido de que a intervalos precoces de tiempo (2 semanas) el descenso porcentual de proteínas glicadas de vida media corta (fructosamina y fructosamina corregida) es significativamente superior al que tiene lugar con proteínas glicadas de vida media larga (HbA_{1c}).

Al tratar de valorar la correlación existente durante el embarazo en los diferentes grupos de diabéticas estudiadas, entre el control glucémico y los niveles de proteínas glicadas, hemos de tener en cuenta la influencia de las siguientes circunstancias:

- Muestra de glucemia considerada (basal, postprandial ó media) (Kjaergaard, 1979; Morris, 1985) y rango de variabilidad de la misma según el tipo de gestante (Frandsen, 1988).
- Vida media de las proteínas glicadas analizadas (Morris, 1985).
- Factores realacionados con la tasa de glicación propiamente dicha: Edad de la paciente (Roberts, 1986), duración de la diabetes (Madsen, 1982), capacidad de glicación ("bajos" y "altos" glicadores) (Yudkin, 1990), etc...

Con respecto a la proteínas glicadas, fructosamina y albúmina glicada, parecen existir datos suficientes en la literatura en el sentido de que la correlación más estrecha se establece con los niveles glucémicos correspondientes a 1-3 semanas previas, especialmente 1 semana (Nelson, 1985; Roberts, 1988; Cefalu, 1990). En cuanto a la hemoglobina glicada, la correlación ha abarcado a la consideración de 4 a 16 semanas previas, siendo la más unánime la establecida a las 8 semanas (Leslie, 1978; O'Shaughnessy, 1979; Miller, 1983).

En nuestras diabéticas gestacionales, tal vez como consecuencia del estrecho rango de variación de las glucemias (basal y postprandial), no se objetiva correlación lineal entre las proteínas glicadas y las glucemias previas. En las diabéticas pregestacionales, y por lo que se refiere a las hemoglobinas glicadas, se establece una correlación mejor con la glucemia basal y media que con la glucemia postprandial, no observándose diferencias ostensibles en relación con el intervalo de 4, 6 y 8 semanas existente entre ambos tipos de parámetros. En este mismo grupo de pacientes, y dentro de las proteínas plasmáticas glicadas, las correlaciones más altas tienen lugar para las proteínas glicadas totales y la albúmina glicada, especialmente por lo que se refiere a la glucemia basal previa e independientemente si se trata de 2 o 4 semanas anteriores.

Si consideramos conjuntamente diabéticas gestacionales y pregestacionales, el patrón de correlaciones es similar al comentado para las diabéticas pregestacionales valoradas aisladamente, si bien con coeficientes de correlación superiores, tal vez como resultado del incremento de número de pacientes a considerar.

A la hora de correlacionar entre si las diferentes proteínas plasmáticas glicadas en los tres grupos de gestantes incluidos en nuestro trabajo, pudo comprobarse como existen pobres resultados para las gestantes normales y diabéticas gestacionales y no así para diabéticas pregestacionales cuando se consideran separadamente, o en conjunto con las diabéticas gestacionales.

En estas dos últimas situaciones se objetivan unos mejores coeficientes como es lógico, cuando se correlacionan proteínas de similar vida media. Es digno de reseñar que dentro de las proteínas glicadas las que peor correlación muestran con todas las demás son la fructosamina y/o fructosamina corregida.

Una vez tenidas en cuenta las consideraciones antes expresadas, parece deducirse de los datos por nosotros aportados que dentro de las proteínas glicadas estudiadas, la HbA_{1c}, las proteínas totales glicadas y la albúmina glicadas son aquellas que mejor reflejan el control metabólico de la diabetes en las mujeres con diabetes pregestacional. La fructosamina, por la influencia de las variaciones de la albúmina durante la gestación y la glicohemoglobina cuantificada por cromatografía de afinidad, por la gran imprecisión interensayo que presenta, no parecen parámetros óptimos a tener en cuenta.

5.2 - RELACION DE PROTEINAS GLICADAS CON MORBILIDAD FETAL.

5.2.1 - MACROSOMIA FETAL.

Una de las complicaciones principales del hijo de madre diabética lo constituye la macrosomía fetal. Esta alteración parece tener su raíz fundamental en el hiperinsulinismo fetal (Freinkel, 1980), sin olvidar el posible papel a ejercer por las somatomedina u otros factores de crecimiento (Susa, 1984) o por el paso transplacentario de anticuerpos antiinsulina (Menon, 1990). El hiperinsulinismo, se achacó en un principio a la transferencia de glucosa de la madre al feto, con ulterior estímulo de la secreción pancreática de insulina (teoría hiperglucémica-hiperinsulinémica) (Pedersen, 1977). En la actualidad, y de acuerdo con Freinkel, 1980, se piensa que el hiperinsulinismo proviene del estímulo generado por una mezcla de nutrientes (glucosa, aminoácidos, cuerpos cetónicos, etc.) procedentes del organismo materno y no exclusivamente por la glucosa.

Las proteínas glicadas, como reflejo del control metabólico de la diabetes, se han tratado de relacionar con la macrosomía fetal, así como en alguna ocasión con el peso placentario (Miller, 1983).

Por lo que a la hemoglobina glicada materna se refiere, los niveles de la misma durante el tercer trimestre de la gestación, en diabéticas pregestacionales, parecen guardar una relación variable con la presencia de macrosomía fetal. Así, frente a autores que no encuentran correspondencia directa entre ambos parámetros (O'Shanghnessy, 1979; Stubbs, 1981; Sosenko, 1982), otros sí parecen encontrarla (Widness, 1978, Ylinen, 1981; Díez, 1988). En la disparidad de estos resultados, además del número de pacientes de algunas series pueden jugar un cierto papel otros factores como son: la valoración de la hemoglobina por diferente metodología, el rango del control metabólico ó características multifactoriales del peso fetal, como son factores genéticos, ganancia de peso en el embarazo, peso materno preconcepcional, etc. (Kitzmilller, 1986).

Conviene señalar por otra parte, los datos de algunos autores como Peck y cols. (1991) que refieren la existencia de una relación entre el peso fetal y los niveles de HbA₁ en el primer trimestre de gestación.

Si se acude por otra parte a la valoración de hemoglobina glicada en sangre de cordón, mediante técnicas que no se interfieren por la hemoglobina fetal, se puede comprobar como algunos grupos encuentran correlación entre dicha hemoglobina y el peso fetal (Feldman, 1984) y otros no (Worth, 1983; Ghosh, 1990) observando sin embargo una correlación con la hipoglucemia neonatal (Sosenko, 1982).

En nuestro trabajo, en el grupo de 152 diabéticas pregestacionales estudiadas pudimos comprobar como los niveles de HbA_{1c} en el tercer trimestre de la gestación eran superiores en el grupo que presentaba macrosomía frente al grupo que no presentaba dicha complicación. ($5,96 \pm 1,0\%$ vs $5,72 \pm 0,96\%$ ($p < 0,05$), observándose en ambos grupos como los valores estaban próximos al rango normal, expresión del relativo buen control metabólico global de las pacientes.

No se observaron modificaciones ostensibles en cuanto a significatividad, al prescindir de las pacientes que por presentar vasculopatía específica en general o nefropatía en particular, podían introducir un factor de error en la consideración del crecimiento fetal (Diez, 1988).

No encontramos por otra parte en este grupo de pacientes, correlación entre el índice ponderal fetal y los niveles de HbA_{1C}, debido como parece lógico a la poca variabilidad mostrada por los valores de esta proteína glicada como consecuencia del aceptable control metabólico de estas gestantes diabéticas.

Por lo que respecta a otras proteínas glicadas, Roberts y Baker en 1987 mostraron una relación entre la concentración de la fructosamina en el primer trimestre del embarazo y el peso fetal en diabéticas pregestacionales. Pallardo y cols. en 1990a pudieron asimismo comprobar en un grupo de 44 diabéticas pregestacionales, como los niveles de fructosamina durante el 3^{er} trimestre de la gestación eran significativamente más elevados en las pacientes que presentaron macrosomía fetal.

En nuestra serie de 25 diabéticas pregestacionales, no existieron diferencias en el 3^{er} trimestre en los niveles de proteínas glicadas (fructosamina, proteínas totales glicadas y albúmina glicada) entre los grupos de pacientes con o sin macrosomía fetal, ni correlación entre sus valores y el índice ponderal fetal, tal vez debido al escaso número de la muestra.

En la diabetes gestacional, pese a que la macrosomía es una de las complicaciones fetales dignas de mención, los trabajos respecto a la relación entre niveles de proteínas glicadas y peso fetal son escasos. Los estudios llevados a cabo en este sentido con la hemoglobina glicada han dado resultados positivos (Baxi, 1984) y negativos (Balsells, 1990; Ghosh, 1990; Pallardo 1990).

Es de reseñar por otra parte, la existencia de trabajos que muestran como los niveles post-parto de hemoglobina glicada pueden resultar de interés como test de "screening" para diabéticas gestacionales desconocidas que presentaron macrosomía fetal (Steel, 1981).

En la serie estudiada por nosotros de 61 diabéticas gestacionales no pudimos comprobar diferencias entre los niveles de las proteínas glicadas y la presencia o no de macrosomía, debido a que solo 2 gestantes de este grupo mostraron esta complicación. En dicho grupo asimismo, no fue factible obtener una buena correlación entre el índice ponderal fetal y los valores de las diferentes proteínas glicadas cuantificadas; solamente se alcanzaron unos pobres coeficientes de correlación para la HbA_{1c} y las proteínas glicadas $r = 0,34$ ($p < 0,01$) y $r = 0,33$ ($p < 0,05$) respectivamente.

El estrecho rango en el que oscilan las proteínas glicadas estudiadas creemos que es la explicación de la ausencia de correlaciones más llamativas en este grupo de gestantes. En este sentido, tampoco otros autores encuentran correlación entre fructosamina y peso fetal en la diabetes gestacional (Roberts, 1988; Balsells 1990).

5.2.2 - MALFORMACIONES CONGENITAS.

Por lo que respecta a las malformaciones congénitas y a los abortos espontáneos, parece existir una relación entre el control metabólico pericocencepcional, en especial hasta las 8 semanas, y la frecuencia de estas alteraciones.

Así Fuhrmann y cols en 1983 objetivaron en 128 gestantes con euglucemia solo un 0,8% de malformaciones congénicas frente a cifras del 7,5% y del 1,4% hallados en dos grupos respectivos de 292 gestantes diabéticas controladas después de las 8 semanas y 420 gestantes normales.

Igualmente Goldman y cols. en 1986 no encontraron malformaciones congénitas en 44 hijos de gestantes diabéticas con normoglucemia antes de la gestación, al tiempo que hallaron un 10% de las mismas en un grupo de 31 gestantes diabéticas insulino dependientes cuyo buen control no se alcanzó hasta el 3^{er} trimestre del embarazo.

Analizando la hemoglobina glicada como parámetro de control metabólico, excepto algunos autores (Stubbs, 1987), la mayoría de ellos refieren niveles elevados de la misma durante el 1^{er} trimestre en aquellas gestantes diabéticas que sufren abortos espontáneos (Miodovnik, 1986; Hanson, 1990).

En cuanto a las malformaciones congénitas y su relación con la hemoglobina glicada determinada en el primer trimestre, la mayor parte de los trabajos de la literatura, apoyan esta hipótesis. En trabajos iniciales, Leslie y cols. en 1978 observaron que tres de cada cinco mujeres con niveles elevados de hemoglobina glicada en las primeras semanas del embarazo, presentaron hijos con malformaciones congénitas. Más tarde Miller y cols. en 1981, en trabajo ya clásico, comprobaron en 58 diabéticas gestantes, como aquellas que tenían niveles de $HbA_{1C} > 8,5\%$ en el primer trimestre de gestación, mostraban un 22,4% de malformaciones congénitas mayores en su descendencia, frente a un 3,4% hallado en aquellas con $HbA_{1C} < 8,5\%$. Ylinen y cols. en 1984 encontraron, asimismo en un grupo de 142 diabéticas embarazadas una relación entre niveles de HbA_{1C} en el primer trimestre y malformaciones congénitas mayores ($HbA_{1C} < 8\%$: 3,2% ; $HbA_{1C} 8-9\%$: 8% ; $HbA_{1C} \geq 10\%$: 23,5%). Trabajos posteriores de Stubbs y cols. (1987), Miodovnik y cols. (1988), Greene (1989) y Hanson y cols. (1990), confirman la diferencia significativa entre niveles medios de hemoglobina glicada (A_1 ó A_{1C}) en la fase inicial del embarazo en gestantes con malformaciones congénitas fetales mayores y sin ellas. Con respecto a las malformaciones congénitas menores, no existen resultados concordantes, siendo solo Hanson y cols. (1990) los que encontraron diferencia significativa con respecto a gestantes controles (HbA_{1C} 9,1% vs 7,5%).

Parece confirmado por algunos de estos autores que valores de hemoglobina glicada superiores a 7 - 9 DS de la media se acompañan de un evidente aumento de la frecuencia de malformaciones congénitas (Leslie, 1978; Green, 1989; Hanson 1990).

Resultados aparentemente diferentes a los anteriores proceden de los estudios de Mills y cols. Damm y Molsted-Pedersen y de los nuestros propios. Mills y cols. en 1988 en un estudio cooperativo norteamericano, comprobaron como en 247 diabéticas gestantes sometidas a estricto control glucémico antes de los 21 días post-concepción, la tasa de malformaciones congénitas mayores fue de 4,9%, frente a un 9% en 279 diabéticas gestantes sometidas a control posteriormente o un 2,1% en 389 gestantes normales; si bien no encontraron diferencias significativas en los niveles medios de hemoglobina glicada y de parámetros glucémicos, en fase temprana del embarazo, en pacientes con o sin malformaciones congénitas. Damm y Molsted-Pedersen en 1989, en 197 embarazos planificados en mujeres diabéticas hallaron un 1% de malformaciones congénitas frente a un 8,2% en embarazos no planificados, si bien los valores medios de HbA_{1c} en ambos grupos no se diferenciaron significativamente (7,1% vs 7,3%).

En nuestro trabajo hemos podido confirmar como los valores de HbA_{1c} en el primer trimestre de gestación, en los grupos con o sin malformaciones congénitas fetales no muestran diferencias ostensibles (6,38 ± 1,08% vs 6,74 ± 1,37%); igual ocurre si consideramos aisladamente las malformaciones congénitas mayores ó si descartamos el posible papel ejercido por la presencia de vasculopatía específica y/o nefropatía. Asimismo, la frecuencia de malformaciones congénitas fué similar cuando consideramos subgrupos con buen y mal control metabólico, estableciendo como nivel discriminativo de HbA_{1c} 6%.

La posible explicación de la falta de relación entre malformaciones y niveles de hemoglobina en los trabajos referido (Mills, 1988; Damm, 1989) y en el nuestro, parece deberse a que existen escasas diferen

cias en los valores de HbA_{1c} en el total de grupos de gestantes diabéticas estudiadas, siendo muy raras las que sobrepasaron el límite de $X + 7$ DS, que como vimos en anteriores estudios es el que marca una evidente predisposición a la aparición de malformaciones congénitas. A esto hay que añadir en nuestro trabajo y en el de Damm y Molsted-Pedersen, el escaso número de pacientes estudiadas.

Independientemente de estos comentarios, el hecho de que con niveles similares de hemoglobina glicada se encuentran variaciones en la frecuencia de malformaciones nos hace pensar en la posible influencia de otros factores metabólicos u hormonales (Crace, 1989; Sadler, 1989): cuerpos cetónicos (β hidroxibutirato), déficit de ácido araquidónico, factores inhibidores de somatomedina, déficit de cinc, etc. o lo que globalmente podemos considerar en el sentido de Freinkel "una alteración del medio de cultivo materno" (Freinkel, 1980).

Desde un punto de vista práctico, en la programación del embarazo en la mujer diabética, la valoración previa de HbA_{1c} continúa siendo un indicador de primer orden, si bien hay que hacer la salvedad que en ocasiones, valores de la misma estrictamente normales pueden enmascarar situaciones de hipoglucemia subclínica, que parece comprobado que ejerce una evidente acción teratógena (Freinkel, 1990).

En sentido opuesto y como defienden otros autores (Greene, 1989) parece fuera de consideración el hecho de plantearse la interrupción del embarazo en gestantes diabéticas con niveles de HbA_{1c} francamente elevados en el primer trimestre de gestación, por miedo a la presencia de malformaciones congénitas.

5.2.3 - MADUREZ PULMONAR FETAL.

El síndrome de distress respiratorio (SDR) o de "membrana hialina" oscila en el hijo de madre diabética (HMD) del 0 al 33% en las diferen

tes estadísticas, dependiendo del método de diagnóstico utilizado y de las diferentes características de las series estudiadas (Dukley, 1985; Moya, 1988).

La etiología de este SDR radica en una alteración de la madurez pulmonar fetal, puesta de manifiesto por un defecto en la síntesis de surfactante pulmonar por los neumocitos tipo II. El surfactante es de naturaleza lipoproteica, compuesto en un 90% de lípidos y en un 10% de proteínas específicas (Moya, 1988).

La diabetes materna "per se" parece intervenir de manera directa en el retardo de la madurez pulmonar. Estudios experimentales han demostrado que la biosíntesis de los dos fosfolípidos mayoritarios del surfactante pulmonar, fosfatidil colina y fosfatidil glicerol, están disminuidos en el pulmón de los fetos de las gestantes diabéticas (Engle, 1983; Constan, 1986; Huffaker, 1986). Esto es en parte un efecto de la reducida utilización de glucógeno. La hiperinsulinemia fetal parece tener menos importancia que la hiperglucemia fetal en el retardo de la madurez pulmonar fetal de gestantes diabéticas (Tyden 1986).

Desde un punto de vista clínico, en este tipo de gestantes parecen favorecer el desarrollo del SDR diversos factores tales como: prematuridad o edad gestacional temprana en el momento del parto, práctica de cesárea, situaciones de asfixia o hipoxia perinatal, sexo fetal masculino y mal control metabólico (Huffaker, 1986; Moya, 1988).

Con respecto al papel del control metabólico en la aparición del SDR, han existido diferentes aportaciones. Así, Roberts y cols, (1976) en un estudio retrospectivo en 820 hijos de madres diabéticas y dejando aparte la influencia de otros factores (edad gestacional, edad materna, tipo de parto, peso fetal, test de Apgar, etc.) comprobaron como el riesgo de SDR es 5,6 veces superior en gestantes diabéticas que en la población normal. En estudios posteriores, se ha visto como

independientemente de los factores antes señalados, la diabetes con un adecuado control metabólico, no influye desfavorablemente en la incidencia de SDR con respecto a gestantes normales (Jovanovic, 1981b; Mimouni, 1987).

En nuestro trabajo hemos valorado la madurez pulmonar fetal, en relación con el control metabólico materno, estimado mediante parámetros glucémicos y niveles de hemoglobina glicada. En las gestantes diabéticas con buen control metabólico ($HbA_{1C} < 6\%$ y no hipoglucemia) la madurez pulmonar es similar a la recogida en gestantes no diabéticas; al tiempo que en las gestantes diabéticas con mal control metabólico ($HbA_{1C} > 6\%$) asistimos a situaciones contrapuestas de aceleración y retardo en la madurez pulmonar fetal.

La aparición precoz de surfactante maduro en estas pacientes, no parece deberse a la presencia de vasculopatía específica en las mismas (clase B y D sin complicación vascular placentaria) o a la existencia concomitante de hipertensión, factores ambos que a través de un compromiso vascular uteroplacentario puede inducir a tal fin. (Kitzmilller, 1988; Moya, 1988). Creemos que tiene su origen en la frecuencia de episodios hipoglucémicos que presentaron estas mujeres a lo largo de la gestación, los cuales a través de un incremento de hormonas contrarreguladoras, favorecieron el desarrollo temprano del citado surfactante pulmonar.

El retardo de la madurez, comprobado en otro subgrupo de gestantes diabéticas, parece tener relación directa con el grado de compensación metabólica de su diabetes, ya que se trata de las pacientes que aún dentro del grupo de mal control metabólico ($HbA_{1C} > 6\%$) presentaban en un principio glucemias y hemoglobina glicada más elevadas.

No obstante, no siempre el retardo de la madurez pulmonar está asociado con el mal control metabólico, ya que existen trabajos en gestantes diabéticas con glucemias medias ≤ 110 mg/dl en las que en la semana 39^a, aun cerca de un 20% de las mismas no presentan fosfatidil glicerol en el líquido amniótico (Ojomo, 1990).

5.3. - ANALISIS DE LAS PROTEINAS GLICADAS EN LA ESTRATEGIA DIAGNOSTICA DE LA DIABETES GESTACIONAL.

A la hora de plantear el papel de las proteínas glicadas como test de despistaje en el diagnóstico de la diabetes gestacional, hay que tener en cuenta las diferencias existentes en los estudios realizados tanto por lo que se refiere a metodología (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, colorimetría, etc.) como al período de la gestación estudiado o los niveles críticos o de discriminación utilizados para las diversas proteínas.

En lo referente a la hemoglobina glicada, la mayoría de los trabajos revisados (Artal, 1984; Baxi, 1984; Cousins, 1984; Shah, 1984; Dierksheide, 1985), como el nuestro propio, no encuentran utilidad de la misma como test de despistaje en la diabetes gestacional. Unicamente Morris y cols. en 1986b llegaron a conclusiones opuestas.

En algunos de estos estudios, puede no obstante comprobarse una diferencia significativa en los niveles de hemoglobina glicada entre los grupos de gestantes normales y de diabéticas gestacionales (Baxi, 1984; Cousins, 1984; Morris, 1986b). En este sentido, valorando en nuestro trabajo los niveles de glicohemoglobina y HbA_{1c}, solo encontramos para esta última, valores significativamente superiores en el grupo de diabéticas gestacionales.

Por otra parte, lo que sí pudimos objetivar fue una correlación significativa entre los valores de ambas hemoglobinas y los datos de glucemia basal, suma de glucemias ó área glucemia bajo la curva, tras la administración de la sobrecarga oral de glucosa en el total de mujeres gestantes; circunstancia similar a la comprobada por otros autores. (Artal, 1984; Baxi, 1984).

Considerando los conceptos de sensibilidad y especificidad indispensables para juzgar la utilidad de una prueba como test de despistaje, Baxi y cols. demostraron para la HbA₁ una sensibilidad de 63,6% y una especificidad de 81,6% al adoptar como nivel crítico valores de la misma de 6,78% ($\bar{X} + 1DS$). Recordemos como término comparativo que la sensibilidad y especificidad del test de screening de glucosa (administración oral de 50 g. de glucosa), (TS), referidas por O'Sullivan y Mahan en 1973 con un nivel discriminativo de glucosa plasmática de 143 mg/dl. a los 60' de la sobrecarga, fueron 79% y 87%, y que las comunicadas por Carpenter y Coustan en 1982 con un nivel discriminativo de 130 mg/dl. alcanzaron resultados para ambos parámetros de un 99%.

Cousins y cols. en 1984 para un valor crítico de HbA₁ de 6,8%, encuentran una sensibilidad y especificidad de 80% y 57% respectivamente. Si este valor se eleva al 9,2%, la sensibilidad desciende al 36% y la especificidad aumentará al 92%. Comparados estos resultados con los obtenidos mediante el test de screening de glucosa y expresados mediante las curvas de rendimiento diagnóstico (CRD). (Cousins, 1984; Dierksheide, 1985), se llega a la conclusión de la escasa utilidad de la hemoglobina glicada como test de despistaje de la diabetes gestacional.

Por el contrario, Morris y cols. (1986b), con valores críticos de GHb de 6,3% ($\bar{X} \pm 1DS$) comprobaron una sensibilidad y especificidad de 93,3% y 85,8%, frente a las halladas para el test de screening de glucosa de 66,6% y 85,8% respectivamente, con niveles de discriminación de glucemia a la hora de la sobrecarga de 135mg/dl, por lo que otorgan a la referida hemoglobina glicada un cierto papel predictivo en el diagnóstico de la diabetes gestacional.

En nuestro trabajo, la sensibilidad y especificidad correspondientes a niveles críticos de $\bar{X} + 1DS$ fueron de 44% y 82% para la HbA_{1c} y de 50% y 80% para la glicohemoglobina, resultados verdaderamente poco relevantes según se desprende del examen de la oportuna CRD.

Si comparamos asimismo los porcentajes de ambas hemoglobinas en los grupos de gestantes estudiados con TS (+) o TS (-), vemos como resultan significativamente superiores en el grupo TS (+). Existe a su vez, una correlación significativa, si bien relativamente pobre entre HbA_{1c} y glucemia basal y a la hora y entre glicohemoglobina y glucemia a la hora en el grupo total de gestantes con o sin TS (+), resultados similares a los aportados por otros trabajos de la literatura (Cousins, 1984; Morris, 1986b).

En cuanto a las proteínas totales glicadas y a la fructosamina en particular, nuestro estudio y los de la casi totalidad de los grupos (Mc Farland, 1984; Bourgeois, 1986; Comtois, 1989; Cefalu, 1990), a excepción de los de Morris, 1986a, y Roberts y cols. (1983;1986) confirman el escaso valor de las mismas como test de despistaje de la diabetes gestacional, si bien éste último grupo en reciente trabajo (Roberts, 1990) cuestiona su utilidad.

Los niveles de proteínas totales glicadas, fructosamina, fructosamina corregida en relación con valores de albúmina, ó de proteínas totales séricas, han mostrado resultados variables en la comparación de los grupos de gestantes normales y diabéticas gestacionales, no existiendo en ocasiones diferencias entre ambos (Bourgeois, 1986; Ryan, 1987; Vermes, 1989), al tiempo que en otras los valores fueron superiores en diabéticas gestacionales (Roberts, 1983; Mc Farland, 1984; Comtois, 1989).

En nuestro trabajo no se objetivaron diferencias significativas en los niveles de proteínas totales glicadas, fructosamina, fructosamina corregida y albúmina glicada entre gestantes normales y diabéticas gestacionales, al tiempo que tampoco se pudo establecer correlación entre estas y las correspondientes glucemias obtenidas a partir de la SOG en el total de las mujeres gestantes, contrariamente a Roberts y Baker (1986) que encontraron un elevado coeficiente de correlación entre fructosamina y glucemia basal ($r = 0,81$) y área bajo la curva ($r = 0,77$) ($p < 0,001$).

El rendimiento diagnóstico de la fructosamina de acuerdo con el análisis de sensibilidad y especificidad, ha resultado poco convincente en nuestra experiencia y en la de otros autores (Comtois, 1989; Nasrat, 1990) refiriendo datos aceptables solo Roberts y Baker en 1986 que señalaron una sensibilidad de 86% y una especificidad de 96% para un valor crítico correspondiente al percentil 95, propio de la edad gestacional. Esta aparente diferencia de resultados parece deberse al hecho de que los niveles de glucemia basal que presentaban las diabéticas gestacionales de este último estudio (137 ± 45 mg/dl.) eran sensiblemente superiores a los obtenidos en otras publicaciones ($107 \pm 13,7$ mg/dl.) (Comtois, 1989).

Al tratar de comparar las diferentes proteínas glicadas plasmáticas en los grupos de gestantes con TS (+) y TS (-) no hemos encontrado diferencias en sus valores entre ellos, ni tampoco hemos obtenido relación entre las mismas y la glucemia basal y a la hora del referido TS.

De todo lo hasta aquí expresado con respecto a nuestros datos y a los de la literatura, y en cuanto a la utilidad de la hemoglobina glicada y fructosamina como test de despistaje en la diabetes gestacional, podríamos señalar las tres siguientes consideraciones:

- Existencia ocasional de diferencias significativas de hemoglobina glicada y fructosamina en los grupos de gestantes normales y diabéticas gestacionales.
- Correlaciones esporádicas entre los niveles de las proteínas glicadas y diferentes valores glucémicos tras sobrecarga oral de glucosa, casi siempre coetáneos y raramente previos a las determinaciones de dichas proteínas.
- Escaso rendimiento diagnóstico como test de despistaje de la diabetes gestacional.

6.- CONCLUSIONES.

- 1 - Se comprueba en gestantes normales un descenso de los niveles de HbA_{1c} al comienzo del segundo trimestre del embarazo (16ª semana), recuperando sus valores iniciales a partir de la 32ª semana, siendo estas modificaciones un reflejo de las variaciones glucémicas durante la gestación. Comportamiento similar muestra la glicohemoglobina.
- 2 - No se objetivan en gestantes normales, modificaciones en los niveles de fructosamina, fructosamina corregida, proteínas totales glicadas y albúmina glicada a lo largo del embarazo.
- 3 - En diabéticas pregestacionales y en relación con el control progresivo de su diabetes, se asiste a partir del 2º trimestre de gestación, a una disminución significativa en las concentraciones de HbA_{1c}, proteínas totales glicadas y albúmina glicada.
- 4 - No existen cambios en las diabéticas pregestacionales en cuanto a la glicohemoglobina, y fructosamina, cuando se corrige ésta por los niveles de albúmina, que disminuye significativamente a lo largo de la gestación. Debido a lo cual, glicohemoglobina, fructosamina, y fructosamina corregida, presentan escasa utilidad en el control evolutivo de la diabetes de este grupo de pacientes.
- 5 - No se observan descensos de ningún tipo de las proteínas glicadas estudiadas en diabéticas gestacionales, debido en parte al momento tardío (20ª semana) a partir del cual se empiezan a cuantificar dichas proteínas.

- 6 - No existe correlación lineal entre las diferentes proteínas glicadas y las glucemias previas en los grupos de gestantes normales y diabéticas gestacionales. En las diabéticas pregestacionales la mejor correlación se obtiene con la glucemia basal previa, sin poder extraer ninguna conclusión definitiva sobre cual es el período anterior de tiempo a considerar en cada proteína para establecer mayor relación.
- 7 - La correlación entre las proteínas glicadas estudiadas es superior en diabéticas pregestacionales que en diabéticas gestacionales y gestantes normales, por lo que se refiere a proteínas de similar vida media.
- 8 - Los niveles de HbA_{1c} son significativamente superiores durante el 3^{er} trimestre en las diabéticas pregestacionales con macrosomía fetal, frente a las que no presentaron macrosomía, no observándose diferencias con respecto a las otras proteínas glicadas.
- 9 - No existen diferencias en los porcentajes de HbA_{1c} durante el 1^{er} trimestre de embarazo entre diabéticas pregestacionales con o sin malformaciones congénitas.
- 10- Las diabéticas pregestacionales con niveles elevados de HbA_{1c} presentan en un 25 % aceleración, o retardo en un 75 % de la madurez pulmonar fetal en relación con el patrón evolutivo normal, influyendo decisivamente en el primer caso, la presencia concomitante de frecuentes episodios hipoglucémicos.

- 11- De las diferentes proteínas glicadas cuantificadas, solo la HbA_{1c} presenta valores mas elevados en diabéticas gestacionales que en gestantes con sobrecarga oral de glucosa normal, existiendo correlación entre sus niveles, así como los de la glicohemoglobina, con diferentes parámetros glucémicos estudiados (glucemia basal, área bajo la curva y suma de glucemias).

- 12- Los cálculos de sensibilidad y especificidad, y la expresión mediante curvas de rendimiento diagnóstico, para las diferentes proteínas glicadas consideradas, confirman su escasa utilidad como test de despistaje en el diagnóstico de la diabetes gestacional.

7.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.-ABRAHAM E.C., STALLINES M., ABRAHAM A., CLARDY R. Demonstration of a minor hemoglobin with modified chains. An additional modified hemoglobins in normal and diabetic adults. **Biochim Biophys Acta** 1983; 744: 335-341.
- 2.-ALBERTI K.G.M.M., GRIES F.A. Management of non-insulin-dependent diabetes mellitus in Europe: a Consensus View. **Diabetic Medicine** 1988; 5: 275-280.
- 3.-ALEYASSINE H. Glycosylation of hemoglobin S and hemoglobin C. **Clin Chem** 1980; 26: 526-527.
- 4.-ALEYASSINE H., GARDINER R.J., BLANKSTEIN L.A., DEMPSEY M.E. Agar gel electrophoretic determination of glycosylated hemoglobin: effect of variants hemoglobins, hyperlipidemia and temperature. **Clin Chem** 1981; 27: 472-475.
- 5.-ALLEN D.W., SCHROEDER W. A., BALOG Y. Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin. **J Am Chem Soc** 1958; 80: 1628-1634.
- 6.-ARDAWI M.S.M., NASRAT H.N., MIRA S.A., FATANI H.H. Comparison of glycosylated fibrinogen, albumin and haemoglobin as indices of blood glucose control in diabetic patients. **Diabetic Medicine** 1990; 7: 819-824.
- 7.-ARMBRUSTER D.A. Fructosamine: structure, analysis and clinical usefulness. **Clin Chem** 1987; 33: 2153-2163.
- 8.-ARMITAGE P., BERRY G. **Statistical methods in medical research.** Oxford: Blackwell, 1987.
- 9.-ARNQUIST H., CEDERBLAD G., HERMANSSON G., LUDVIGSON J., WETTRE A. A chromatographic method for measuring hemoglobin A1: Comparison with two commercial kits. **Ann Clin Biochem** 1981; 18: 240-242.
- 10.-ARTAL R., MOSLEY G. M., DOREY F. J. Glycohemoglobin as a screening test for gestational diabetes. **Am J Obstet Gynecol** 1984; 148: 412-414.
- 11.-ASHBY J.P., DEACON A.C., FRIER B.M. Glycosylated haemoglobin. Part I.- Measurement and clinical interpretation. **Diabetic Medicine** 1985; 2: 83-87.
- 12.-ASHBY J.P., FRIER B.M. Is serum fructosamine a clinically useful test ? **Diabetic Medicine** 1988; 5: 118-121.
- 13.-AUSTIN G.E., MULLINS R.H., MORIN L.G. Nonenzymatic glycation of individual plasma proteins in normoglycemic and hyperglycemic patients. **Clin Chem** 1987; 33: 2220-2224.
- 14.-BAKAN E., BAKAN N. Glycosylation of nail in diabetics: possible marker of long-term hyperglycemia. **Clin Chim Acta** 1985; 147:1-5.
- 15.-BAKER J.R., O'CONNOR J.P., METCALF P.A., LAWSON M.R., JOHNSON R.N. Clinical usefulness of estimation of serum fructosamine concentration as a screening test for diabetes mellitus. **Br Med J** 1983; 287: 863-867.

- 16.-BAKER J.R., METCALF P.A., HOLDAWAY I.M., JOHNSON R.N. Serum fructosamine concentration as measure of blood glucose control in type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Br Med J* 1985a; 290: 352-355.
- 17.-BAKER J.R., METCALF P.A., JOHNSON R.N., NEWMAN D., RIETZ P. Use of protein-base standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin Chem* 1985b;31: 1550-1554.
- 18.-BAKER J., METCALF P., TATNELL M., LEVER M., JOHNSON R. Quality assessment of determination of serum fructosamine in 33 clinical chemistry laboratories. *Clin Chem* 1986; 32:2133-2136.
- 19.-BAKER J., METCALF P., SCRAGG R. Fructosamine concentrations in general population of Kawerau. *Diabetes Care* 1988; 11:239-245.
- 20.-BALSELLS M., CORCOY R., MAURICIO D., PUIG M., POU J.M., DE LEIVA A. Tratamiento intensivo en la diabetes gestacional: ausencia de correlación entre hemoglobina glicada, fructosamina y glucemia media con el peso del recién nacido. *Avances en Diabetología* 1990; 3: 121-124.
- 21.-BANNON P., LESSAARD F., LEPAG R., JOLY J.G., DUFRESNE L. Glycated hemoglobin in uremic patients as measured by affinity and ion-exchange chromatography. *Clin Chem* 1984; 30:485-486.
- 22.-BATAGLIA F.C., LUBCHENCO L.O. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr* 1967; 71: 159-163.
- 23.-BAXI L., BARAD D., REECE E.A., FARBER R. Use of glycosylated hemoglobin as a screen for macrosomia in gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 347-350.
- 24.-BAYNES J.W., BUNN H.F., GOLDSTEIN D.E., HARRIS M., MARTIN D.B., PETERSON C., WINTERHALTER K. National Diabetes Data Group: Report of expert committee on glucosylated hemoglobin. *Diabetes Care* 1984; 7: 602-605.
- 25.-BERNSTEIN R. E. Glycosylated hemoglobins: Hematological considerations determine which assay for glycohemoglobin is advisable. *Clin Chem* 1980; 26: 174-175.
- 26.-BERNSTEIN R.E. Nonenzymatically glycosylated proteins. In: *Advances in Clinical Chemistry*. London: Academic Press Inc., 1987; 26: 1-78.
- 27.-BERNTORP K., LINDGARDE F., MALMQUIST J. High and low insulin responders: relations to oral glucose tolerance, insulin secretion and physical fitness. *Acta Med Scand* 1984; 216: 111-117.
- 28.-BISSE E., BERGER W., FLÜCKIGER R. Quantification of glycosylated hemoglobin. Elimination of labile glycohemoglobin during sample hemolysis at pH 5. *Diabetes* 1982; 31: 630-633.
- 29.-BODEN G., MASTER R.W., GORDON S.S., SHUMAN C.R., OWEN O.E. Monitoring metabolic control in diabetic outpatients with glycosylated hemoglobin. *Ann Intern Med* 1980; 92: 357-360.

- 30.-BOURGEOIS F.J., HARBERT G.M., PAULSEN E.P., THIAGARAJAH S. Glycosylated serum protein level as a diagnostic test for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 493-496.
- 31.-BRAVERMAN P., SHOWSTACK J., BROWNER W., SELBY J., TEUTSCH S., SEPE S. Evaluating outcomes of pregnancy in diabetic women. *Diabetes Care* 1988; 11: 281-287.
- 32.-BRIGHTON M.W., FURTH A.J. Fructosamine concentration changes in serum during hemodialysis of kidney disease patients. *Clin Chem* 1988; 34: 2378-2379.
- 33.-BROOCHIN R.M., GALLOP M.P. Structure of hemoglobin A1c: Nature of the N-terminal chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun* 1968; 32: 86-93.
- 34.-BROOKS A. P., METCALFE J., DAY J. L., EDWARDS M.S. Iron deficiency and glycosylated haemoglobin. *Lancet* 1980; 2:141-143
- 35.-BROWNLEE M., VLASSARA H., CERAMI A. Nonenzymatic glycosylation reduces the susceptibility of fibrin to degradation by plasmin. *Diabetes* 1983; 32: 680-684.
- 36.-BROWNLEE M., VLASSARA H., CERAMI A. Inhibition of heparin catalyzed antithrombin III activity by nonenzymatic glycosylation: Possible role in fibrin deposition in diabetes. *Diabetes* 1984; 33: 532-535.
- 37.-BROWNLEE M. VLASSARA H., CERAMI A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985; 34: 938-941.
- 38.-BROWNLEE M., VLASSARA H., KOONEY A., CERAMI A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986; 232: 1629-1632.
- 39.-BROWNLEE M., CERAMI A., VLASSARA H. Advanced glycosylation end-products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Eng J Med* 1988; 318: 1315-1321.
- 40.-BROWNLEE M. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. In: *Diabetes Mellitus*. 4^a ed. Rifkin H., Porte Jr. D. eds. New York: Elsevier, 1990: 279-291.
- 41.-BUNN H.F., HANEY D.N., KAMIN S. The biosynthesis of human hemoglobin A1c: Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J Clin Invest* 1976; 57: 1652-1659.
- 42.-BUNN H.F., SHAPIRO R., MCMANUS M., GARRICK J., McDONALD M.Y., GALLOP P.M., GABBAY K.H. Structural heterogeneity of human hemoglobin A due to nonenzymatic glycosylation. *J Biol Chem* 1979; 254: 3892-3898.
- 43.-BUNN H. F., HIGGINS P.J. Reaction of monosaccharides with proteins. Possible evolutionary significance. *Science* 1981a; 213: 222-224.
- 44.-BUNN H.F. Evaluation of glycosylated hemoglobin in diabetic patients. *Diabetes* 1981b; 30: 613-617.
- 45.-CARDONNA P., PICCARO M., CASTAGNOLA M., MONETA E. Glycosylated hemoglobin in preeclampsia. *G Ital Diabetol* 1982; 2: 17-20.

- 46.-CARPENTER M.W., COUSTAN D.R. Criteria for screening tests for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 144: 768-774.
- 47.-CARPENTER M.W. Testing for gestational diabetes. In: **Diabetes Mellitus in Pregnancy** Reece E.A., Coustan D.R. eds. New York: Churchill Livingstone, 1988: 423-439.
- 48.-CARRASCO J.L. **El método estadístico en la investigación médica** Madrid: Ciencia 3, 1983.
- 49.-CAUCHI M. N., BALLOCH A. Glycosylated fetal haemoglobin. *Br Med J* 1982;284: 273-275.
- 50.-CEDERHOLM J., RONQUIST G., WIBELL L. Comparison of glycosylated hemoglobin with the oral glucose tolerance test. *Diabète Metab* 1984; 10: 224-229.
- 51.-CEFALU W.T., PRATHER K.L., CHESTER D.L., WHEELER C.J., BISWAP M., PERNOLL M. L. Total serum glycosylated proteins in detection and monitoring of gestational diabetes. *Diabetes Care* 1990; 13: 872-875.
- 52.-CERAMI A., VLASSARA H., BROWNLEE M. Role of advanced glycosylation products in complications of diabetes. *Diabetes Care* 1988; 11 (suppl. 1): 73-79.
- 53.-CERIELLO A., DELLO RUSSO P., CURCIO F., GIUGLIANO D., D'ONOFRIO F. Acetylsalicylic acid and lysine inhibit protein glycosylation in vitro: a preliminary report. *Diabète Metab* 1984; 10: 128-129.
- 54.-CERIELLO A., GIUGLIANO D., QUATRARO A., DONZELLA C., DIPALO G., LEFEBVRE P.J. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. *Diabetes Care* 1991; 14: 68-72.
- 55.-CHOU P. P., KERKAY J., CUPTA M.K. Development of a laser nephelometric method for the quantitation of human glycohemoglobins. *Anal Lett* 1981; 14: 1071-1087.
- 56.-CLEMENTS R.S. Jr. Diabetic neuropathy -new concepts of its etiology. *Diabetes* 1979; 28: 604-608.
- 57.-COHEN M. P., URDANIVIA E. SURMA M., WU V.Y. Increased glycosylation of glomerular basement membrane collagen in diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 95: 765-769.
- 58.-COHEN M.P. **Diabetes and protein glycosylation**. New York: Springer-Verlag, 1986: 5-25.
- 59.-COMPAGNUCCI P., CARTECHINI M.G., BOLLI G., SANTEUSIANO F., BRUNETTI P., CALABRESE J. Rapid variations of HbA1: relevance to the control of diabetes. *Diabetologia* 1980; 19: 266-270.
- 60.-COMTOIS R., DESJARLAIS F., NGUYEN M., BEAUREGARD H. Clinical usefulness of estimation of serum fructosamine concentration as screening test for gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 651-654.
- 61.-CORCOY R., CERQUEIRA M.J., CODINA M., ORDOÑEZ J., LEIVA A., CABERO L. Diagnóstico de la diabetes gestacional: Importancia del screening rutinario y utilidad relativa de los factores de riesgo. *Avances en Diabetologia* 1988; 1: 90-94.

- 62.-COUSINS L., RIGG L., HOLLINGSWORTH D., BRINK G., AURAND J., YEN S. S. C. The 24-hour excursion and diurnal rhythm of glucose, insulin and C-peptide in normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 136: 433-488.
- 63.-COUSINS L., DATTEL B. J., HOLLINGSWORTH D.R., ZETTNER A. Glycosylated hemoglobin as a screening test for carbohydrate intolerance in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150: 455-460.
- 64.-COUSTAN D.R. Hyperglycemia-hyperinsulinemia. Effect on the infant of diabetic mother. In: **Diabetes and Pregnancy**. Jovanovic L., Peterson C.M., Fuhrmann K. K. eds. New York: Praeger, 1986: 131-156.
- 65.-CRACE C.J. How does maternal diabetes disrupt embryonic and fetal development? *Diabetic Medicine* 1989; 6: 387-393.
- 66.-DAMM P., MOLSTED-PEDERSEN L. Significant decrease in congenital malformations in newborn infants of an unselected population of diabetic women. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 1163-1167.
- 67.-D'ANTONIO J.A., ELLIS D., DOFT B.H., BECKER D.J., DRASH A.L., KULLER L.H. ORCHARD T.J. Diabetes complications and glycemic control. The Pittsburg prospective insulin-dependent-diabetes cohort study: status report after 5 yr. of IDDM. *Diabetes Care* 1989; 12: 694-700.
- 68.-DAVIS J.E., McDONALD J.M., JARETT L.A. A high performance liquid chromatography method for hemoglobin A1c. *Diabetes* 1978; 27: 102-107.
- 69.-DAY J. F., THORPE S. R., BAYNES J.W. Non enzymatically glucosylated albumin: In vitro preparation and isolation from normal serum. *J Biol Chem* 1979; 254: 595-597.
- 70.-D. C. C. T. Research Group. Feasibility of centralized measurements of glycated hemoglobin in the Diabetes Control and Complications Trial: A Multicenter Study. *Clin Chem* 1987; 33: 2267-2271.
- 71.-DEEG R., SCHMITT U., POLLINGER W., ZIEGENHORN J. A new approach to photometry of glycated hemoglobin in human blood. *Clin Chem* 1984; 30: 790-793.
- 72.-DELAHUNTY T. Convenient screening for hemoglobin variants by using the Diamat HPLC system. *Clin Chem* 1990; 36: 903-905.
- 73.-DIAMANDIS E. P., ELLIS G., DANEMAN D., ALLEN L.C. Liquid chromatography of glycated hemoglobins with the Daiichi HA-8110 automated analyzer. *Clin Chem* 1984; 30: 503-504.
- 74.-DIERKSHEIDE W.C. Receiver operating characteristic analysis of glycosylated hemoglobin and the standard test for carbohydrate intolerance in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153: 113-114.
- 75.-DIEZ J. J., PALLARDO L.F., GRANDE C. Hemoglobina glucosilada, fructosamina sanguínea y péptido C en el líquido amniótico de gestantes diabéticas en relación con el peso fetal. *Med Clin (Barc)* 1988; 90: 484-489.

- 76.-DIEZ J.J., GRANDE C., PALLARDO L.F., DE LA MORENA M.L., IBARS T. Detección de la diabetes gestacional con la prueba de 50 gramos de glucosa: prevalencia y relación con factores de riesgo. *Med Clin (Barc)* 1989; 93: 41-45.
- 77.-DODS R.F., BOLMEY C. Glycosylated hemoglobin assay and oral glucose tolerance test compared for detection of diabetes mellitus. *Clin Chem* 1979; 25: 764-768.
- 78.-DOERY J. C. G., REGAN J., HEALY D., BISHOP S., TIPPETT C. Fructosamine in gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 162: 1635-1636.
- 79.-DOLHOFER R., WIELAND O.H. In vitro glycosylation of hemoglobin by different sugars and sugars phosphates. *FEBS Lett* 1978; 85: 86-90.
- 80.-DOLHOFER R., WIELAND O.H. Increased glycosylation of serum albumin in diabetes mellitus. *Diabetes* 1980; 29: 417-422.
- 81.-DOMENECH J. M. *Bioestadística. Métodos estadísticos para investigadores*. Barcelona: Herder, 1982.
- 82.-DOMINICZAK M. H., ORREL J.M., FINLAY W.E.I. The effect of hypoalbuminaemia and renal failure on serum fructosamine concentration in non-diabetic individuals. *Clin Chim Acta* 1989; 182:123-130.
- 83.-DOMINICZAK M. H. The significance of the products of the Maillard (browning) reaction in diabetes. *Diabetic Medicine* 1991; 8; 505-516.
- 84.-DOUMAS B.T., WATSON W., BIGGS H.C. Albumin standards in the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 87-96.
- 85.-DOUMAS B.T., BAYSE D.D., CARTER R.J. A candidate reference method for determination of total protein in serum. Development and validation. *Clin Chem* 1981; 27: 1642-1650.
- 86.-DUDLEY D., BLACK D. Reliability of lecithin / sphingomyelin ratios in diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1985; 66: 521-524.
- 87.-EBERENTZ-LHOME C., DUCROCQ R., INTRATOR S., ELION J., NUÑENZ A., ASSAN R. Hemoglobinopathies: a pitfall in the assessment of glycosylated hemoglobin by ion-exchange chromatography. *Diabetologia* 1984; 27: 596-598.
- 88.-EBLE A.S., THORPE S.R., BAYNES J.W. Nonenzymatic glucosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem* 1983; 258: 9506-9512.
- 89.-ELLIS G.P. The Maillard reaction. *Adv Carbohydr Chem* 1959; 258:9406-9412.
- 90.-ELLIS G.P., DIAMANDIS E.P., GIESBRECHT E.E., DANEMAN D., ALLEN C.L. An automated "high-pressure" liquid-chromatographic assay for hemoglobin A1c. *Clin Chem* 1984; 11: 1746-1752.
- 91.-ENGLE M., LANGAN S., SANDERS R. The effects of insulin and hyperglycemia on surfactant phospholipid synthesis in organotypic cultures of type II pneumocytes. *Biochim Biophys Acta* 1983; 753: 6-13.

- 92.-EROSS J., KREUTZMAN D., JIMENEZ M. Colorimetric measurement of glycosylated protein in whole blood, red blood cells, plasma and dried blood. *Ann Clin Biochem* 1984; 21: 477-483.
- 93.-ESPERSEN T., KLEBE J.G. Self-monitoring of blood glucose in pregnant diabetics. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1985; 64:11-16.
- 94.-FADEL H.E., HAMMOND S.D., HUFF T.A., HARP R.J. Glycosylated hemoglobins in normal pregnancy and gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 1979; 54: 322-326.
- 95.-FELDMAN F., RUBIN N., NAWABI I., ABBONDANTE A.M., POSNER N.A., STEFANYSHYN N.I. Glycosylated fetal hemoglobin: Correlation with hyperglycemia and birth weight in infants of diabetic mothers. *Diabetes* 1984; 33: 81-85.
- 96.-FINOT P.A. Nonenzymatic browning products. Physiologic effects and metabolic transit in relation to chemical structure. A review. *Diabetes* 1982; 31(suppl.3): 22-28.
- 97.-FIRPO A., JOVANOVIĆ L., PETERSON C.M. Basement membrane thickening of placenta from pregnancies complicated by diabetes. *Diabetes* 1981; 30: 140-144.
- 98.-FISHER P.M., HAMILTON P.M., SUTHERLAND H.W., STOWERS J.M. The effect of pregnancy on intravenous glucose tolerance. *J Obstet Gynecol Br Comm* 1974; 81: 285-290.
- 99.-FISKE C.H., SUBBAROW Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925; 66: 375-396.
- 100.-FITZGIBBONS J.K., KOLER R.D., JONES R.T. Red cell age-related changes of hemoglobin Ala+b and Alc in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest* 1976; 58: 820-824.
- 101.-FLÜCKIGER R., WINTERHALTER K. H. In vitro synthesis of hemoglobin Alc. *FEBS Lett* 1976; 71:356-360.
- 102.-FLÜCKIGER R., HARMAN W., MEIER W. Hemoglobin carbamylation in uremia. *N Eng J Med* 1981; 304: 823-827.
- 103.-FLÜCKIGER R., GALLOP P.M. Measurement of nonenzymatic protein glycosylation. *Methods Enzymol* 1984; 106: 77-84.
- 104.-FLÜCKIGER R., WOODTLI T., BERGER W. Evaluation of the fructosamine test for the measurement of plasma protein glycation. *Diabetologia* 1987; 30: 648-652.
- 105.-FORREST R.D., JACKSON C.A., YUDKIN J.S. The glycohaemoglobin assay as a screening test for diabetes mellitus: The Islington Diabetes Survey. *Diabetic Medicine* 1987; 4: 254-259.
- 106.-FORREST R.D., JACKSON C. A., GOULD B. J., CASBURN-BUDD M., TAYLOR J.E., YUDKIN J.S. Four assay methods for glycated hemoglobin compared as screening tests for diabetes mellitus: The Islington Diabetes Survey. *Clin Chem* 1988; 34:145-148
- 107.-FRANSEN E.K., SABAGH T., BACCHUS R.A. Serum fructosamine in diabetic pregnancy. *Clin Chem* 1988; 34: 316-319.
- 108.-FREINKEL N. Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 1980; 29: 1023-1035.

- 109.-FREINKEL. N., PHELPS R., METZGER B. E. The mother in pregnancies complicated by diabetes. In: **Diabetes Mellitus**. 4^a ed. Rifkin H., Porte Jr. eds. New York: Elsevier, 1990: 634-650.
- 110.-FÜHRMANN K., REIHER H., SEMMLER K., FISCHER M., GLOCKNER E. Prevention of congenital malformations in infants of insulin-dependent diabetic mothers. **Diabetes Care** 1983; 6: 219-223.
- 111.-GABBAY K. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. **N Engl J Med**. 1976a; 295: 443-447.
- 112.-GABBAY K., HASTY K., BRESLOW J., ELLISON R., BUNN H., GALLOP P. Glycosylated hemoglobins and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. **N Engl J Med** 1976b; 295: 417-420.
- 113.-GABBE S. G. Diabetes mellitus: Obstetric management. In: **Clinical Diabetes Mellitus**. Davidson J.K. ed. New York: Thieme Inc. 1986: 485-498.
- 114.-GALLOP P.M., FLÜCKIGER R., HANNEKEN A., MININSOHN M.M., GABBAY K.H. Chemical quantitation of hemoglobin glycosylation: fluorometric detection of formaldehyde released upon periodate oxidation of glycoglobin. **Anal Biochem** 1981; 117: 427-432.
- 115.-GARLICK R.L., MAZER J.S. The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. **J Biol Chem** 1983 258: 6142-6146.
- 116.-GHOSH G., PILDES R.S., RICHTON S., AJAYI O. Maternal and cord serum glycosylated protein in neonatal macrosomia and correlation with birth weight. **Obstet Gynecol** 1990; 75:79-83.
- 117.-GILLERY P., MAQUART F.X., CORCY J.M. A glucose transfer from membrane glycoconjugates to hemoglobin in isolate young red blood cells: another biosynthetic way for glycosylated hemoglobins. **Eur J Clin Invest** 1984; 14: 317-322.
- 118.-GILLMER M. D. G., BEARD R. W., BROOKE F. M., OAKLEY N.W. Carbohydrate metabolism in pregnancy. Diurnal plasma glucose profile in normal and diabetic women. **Br Med J** 1975; 3:399-402
- 119.-GOLDMAN J.A., DICKER D., FELDBERG D., YESHAYA A., SAMUEL N., KARP M. Pregnancy outcome in patients with insulin-dependent diabetes mellitus with preconceptional diabetic control. A comparative study. **Am J Obstet Gynecol** 1986; 155: 293-297.
- 120.-GOLDSTEIN D.E., PARKER K.M., ENGLAND J.D., ENGLAND Jr. J.E., WIEDMEYER H.M., RAWLINGS S.S., HESS R., LITTLE R.R., SIMONDS J.F., BREYFOGLE R.P. Clinical application of glycosylated hemoglobin measurements. **Diabetes** 1982; 31 (suppl.3): 70-78.
- 121.-GOLDSTEIN D. E., LITTLE R. R., WIEDMEYER H.N., ENGLAND J.D., MCKENZIE E.M. Glycated hemoglobin: Methodologies and clinical applications. **Clin Chem** 1986; 32: 64-70.
- 122.-GOLDSTEIN D.E., LITTLE R.R., ENGLAND J.D., WIEDMEYER H., MCKENZIE E. Glycated hemoglobin: is it a useful screening test for diabetes mellitus. In: **Frontiers of diabetes research: current trends in non-insulin-dependent diabetes mellitus**. Alberti K.G.M.M., Mazze R., eds. Amsterdam: Elsevier, 1989: 141.-152.

- 123.-GONEN G., ROCHMAN H., RUBENSTEIN A., TANEGA S., HORWITZ D. Hemoglobin A1: An indicator of the metabolic control of diabetic patients. *Lancet* 1977; 2: 734-736.
- 124.-GONEN B., BAENZIGER J., SCHONFELD G., JACOBSON D., FARRAR P. Non-enzymatic glycosylation of low density lipoproteins in vitro. *Diabetes* 1981; 30: 875-878.
- 125.-GOULD B.J., HALL P.M., COOK J.G.H. A sensitive method for measurement of glycosylated plasma proteins using affinity chromatography. *Ann Clin Biochem* 1984; 21: 16-21.
- 126.-GRAM-HANSEN P., ERIKSEN J., MOURITS-ANDERSEN T., OLESEN L. Glycosylated haemoglobin (HbA1c) in iron and vitamin B12 deficiency. *Journal of Internal Medicine* 1990; 227: 133-136.
- 127.-GRANDE C., DIEZ J.J., DE LA MORENA M.L., EZQUIETA B., LUNA R., PALLARDO L.F. Evolución de parámetros de glucación proteica a lo largo de la gestación en pacientes diabéticas. *Endocrinología* 1989; 36: 322-326.
- 128.-GRANDE R. M., ARGÜELLES F. Bases metodológicas para la confección de curvas de crecimiento intrauterino. *An Esp Pediat* 1974; 7 (suppl.1): 33-46.
- 129.-GREENE M.F. Congenital malformations. In: *Diabetes complicating pregnancy*. Hare J.W. ed. New York: Alan R. Liss, 1989: 147-161.
- 130.-GUILLAUSSEAU P. J., CHARLES H. A., PAOLAGGI F., TIMSIT J., CHANSON P., PEYNET J., GODARD V., ESCHWEGE E., ROUSSELET F., LUBETZKI J. Comparison of HbA1 and fructosamine in diagnosis of glucose-tolerance abnormalities. *Diabetes Care* 1990; 13: 898-900.
- 131.-HADDEN D.R., KENNEDY L. Fructosamine (glycosylated protein) and the diagnosis of diabetes. *Diabetic Medicine* 1984; 1:91-92
- 132.-HALL P. M., COOK J.G.H., SHELDON J., RUTHERFORD S.M., GOULD B.J. Glycosylated hemoglobins and glycosylated plasma proteins in the diagnosis of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 1984; 7: 147-150.
- 133.-HAMMER M.R., JOHN P.N., FLYNN M.D., BELLINGHAM A.J., LESLIE R.D.G. Glycated fibrinogen: a new index of short-term diabetic control. *Ann Clin Biochem* 1989; 26: 58-62.
- 134.-HANEY D.N., BUNN H.F. Glycosylation of hemoglobin in vitro: affinity labelling by glucose-6-phosphate. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1976; 73: 3534-3538
- 135.-HANSON U., PERSSON B., THUNELL S. Relationship between haemoglobin A1c in early type 1 (insulin-dependent) diabetic pregnancy and the occurrence of spontaneous abortion and fetal malformations in Sweden. *Diabetologia* 1990; 33: 100-104.
- 136.-HAYASHI Y., MAKINO M. Fluorometric measurement of glycosylated albumin in human serum. *Clin Chim Acta* 1985; 149: 13-19.
- 137.-HENRICHS H.R., LEHMANN P., VORBERG E. An improved fructosamine assay for monitoring blood glucose control. *Diabetic Medicine* 1991; 8: 580-584.
- 138.-HIGGINS P.J., BUNN H.F. Kinetic analysis of the nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. *J Biol Chem* 1981; 256: 5204-5208

- 139.-HINDLE E.J., ROSTRON G.M., GATT J.A. The diagnostic value of glycated hemoglobin levels in post-mortem blood. **Ann Clin Biochem** 1985a; 22: 144-145.
- 140.-HINDLE E.J., ROSTRON G.M., GATT J.A. The estimation of serum fructosamine: an alternative measurement to glycated haemoglobin. **Ann Clin Biochem** 1985b; 22: 84-89.
- 141.-HODGE J.E. The Amadori rearrangement. **Adv Carbohydr Chem** 1955; 10: 169-205.
- 142.-HOLMAN R.R., JELES R., CAUSIER P.M., MOORE J.C., TURNER R.C. Glycosylated haemoglobin measurement on blood samples taken by patients: An additional aid for assessing diabetic control. **Diabetic Medicine** 1987; 4: 71-73.
- 143.-HOM Aidan F.R., KRICKA L.J., PENEPOE M.S. Acetaldehyde-hemoglobin adducts: an unreliable marker of alcohol abuse. **Clin Chem** 1984; 30: 480-482.
- 144.-HOWEY J. E. A., BROWNING M.C., FRASER C.G. Assay of serum fructosamine that minimizes standardization on matrix problems: use to assess components of biological variation. **Clin Chem** 1987; 33: 269-270.
- 145.-HOWEY J.E.A., BENNET W.M., BROWNING M.C.K., JUNG R.T., FRASER C.G. Clinical utility of assays of glycosylated haemoglobin and serum fructosamine compared: Use of data on biological variation. **Diabetic Medicine** 1989; 6: 793-796.
- 146.-HUD E., COHEN M.P. Evaluation and performance characteristics of a novel ELISA using monoclonal antibody to glycated albumin **Clin Chim Acta** 1989; 185: 157-164.
- 147.-HUFFAKER J. Fetal pulmonary maturation in infant of the diabetic mother. In: **Diabetes and Pregnancy**. Jovanovic L., Peterson C.M., Fuhrmann K. eds. New York: Praeger, 1986: 361-392.
- 148.-HUISSMAN W., KUIJKEN J.P., TAN-TJIONG H.L., DUURKOOP E.P., LEIJNSE B. Unstable glycosylated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. **Clin Chim Acta** 1982; 118: 303-309.
- 149.-HURST P. L. Effect of anticoagulants on fructosamine determination. **Clin Chem** 1987; 33: 1947.
- 150.-IBERG N., FLÜCKIGER R. Non-enzymatic glycosylation of albumin in vivo: Identification of multiple glycosylated sites. **J Biol Chem** 1986; 261: 13542-13545.
- 151.-JASPAN J., MOSELLI R., BARTKUS C. Treatment of severely painful diabetic neuropathy with an aldose reductase inhibitor. Relief of pain and improved somatic and autonomic nerve function. **Lancet** 1983; 2: 578-581.
- 152.-JAVID J., PETTIS P.K., KOENIG R.J., CERAMI A. Immunologic characterization and quantitation of HbA1c. **Br J Haematol** 1978; 38: 329-337.
- 153.-JAYNES P.K., WILLIS M.C., CHOU P.P. Evaluation of a minicolumn chromatographic procedure for the measurement of hemoglobin A1c. **Clin Biochem** 1985; 18: 32-36.

- 154.-JERNTORP P., SUNDKVIST G., FEX G., JEPSSON J.O. Clinical utility of serum fructosamine in diabetic mellitus compared with hemoglobin Alc. *Clin Chim Acta* 1988; 175: 135-142.
- 155.-JOHN W.G., ALBUTT E.C., HANDLEY G., RICHARDSON R.W. Affinity chromatography method for the measurement of glycosylated haemoglobin: Comparison with two methods in routine use. *Clin Chim Acta* 1984; 136: 257-262.
- 156.-JOHN W.G., WEBB A.M.C., JONES A.E. Glycosylated hemoglobin and glycosylated albumin in non-diabetic and diabetic mothers and their babies. *Diabetic Medicine* 1985a; 2: 103-104.
- 157.-JOHN W.G., JONES A.E. Affinity chromatography: a precise method for glycosylated albumin estimation. *Ann Clin Biochem* 1985b ;27: 79-83.
- 158.-JOHN W.G., RICHARDSON R.W. Glycosylated hemoglobin levels in patients referred for oral glucose tolerance tests. *Diabetic Medicine* 1986; 3: 46-48.
- 159.-JOHNSON R.N., METCALF P.A., BAKER J.R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982; 127: 87-95.
- 160.-JOHNSON R.N., BAKER J.R. The alkaline reducing activity of glycated serum proteins and its relevance to diabetes mellitus. *Clin Chem* 1986; 32: 368-370.
- 161.-JOHNSON R.N., METCALF P.A., BAKER J.R. Relationship between albumin and fructosamine concentration in diabetic and non-diabetic sera. *Clin Chim Acta* 1987; 164: 151-162.
- 162.-JONES I. R., OWENS D.R., WILLIAMS S., RYDER R.E., BIRTWELL A.J., JONES M.K., GICHERN K., HAYES T.M. Glycosylated serum albumin: an intermediate index of diabetic control. *Diabetes Care* 1983; 6: 501-505.
- 163.-JOVANOVIC L., PETERSON C. M. Management of the pregnant insulin-dependent diabetic woman. *Diabetes Care* 1980; 3:63-68.
- 164.-JOVANOVIC J., PETERSON C. M. The clinical utility of glycosylated hemoglobin. *Am J Med* 1981a; 70: 331-338.
- 165.-JOVANOVIC L., DRUZIN M., PETERSON C.M. Effect of euglycemia on the outcome of pregnancy in insulin-dependent diabetic women as compared with normal control subjects. *Am J Med* 1981b; 71: 921-927.
- 166.-KARLSSON K., KJELLMER I. The outcome of diabetic pregnancies in relation to the mother's blood sugar level. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 112: 213-217.
- 167.-KEMP S.F., CREECH R.H., HORN T.R. Glycosylated albumin and transferrin: short-term markers of blood glucose control. *J Pediatr* 1984; 105: 394-398.
- 168.-KENNEDY A.L., MERIMEE T. J. Glycosylated serum protein and hemoglobin A1 levels to measure control of glycemia. *Ann Intern Med* 1981; 95: 56-68.

- 169.-KITZMILLER J. L. Macrosomia in infants of diabetic mothers: Characteristics, causes, prevention. In: **Diabetes and Pregnancy**. Jovanovic L., Peterson C.M., Fuhrmann K., eds. New York: Praeger, 1986: 85-120.
- 170.-KITZMILLER J.L. Diabetic nephropathy. In: **Diabetes Mellitus in Pregnancy**. Reece E.A., Coustan D.R., eds. New York: Churchill Livingstone, 1988: 489-513.
- 171.-KJAERGAARD J.J., DITZEL J.J. Hemoglobin A1c as an index of long-term blood glucose regulation in diabetic pregnancy. **Diabetes** 1979; 28: 694-696.
- 172.-KLENK D.C., HERMANSON G.T., KROHN R.I., FUJIMOTO E.K., MALLIA A.K., SMITH P.K., ENGLAND J.D., WIEDMEYER H.M. LITTLE R.R., GOLDSTEIN D.E. 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.
- 173.-KOENIG R.J., PETERSON C.M., KILO C., CERAMI A., WILLIAMSON J.R. Hemoglobin A1c as a indicator of the degree of glucose intolerance in diabetes. **Diabetes** 1976;25: 230-232.
- 174.-KOENIG R. J., BLOBSTEIN S. H., CERAMI A. Structure of carbohydrate of hemoglobin A1c. **J Biol Chem** 1977; 252: 2992-2997.
- 175.-KOHN R. R., SCHNIDER S. L. Glucosylation of human collagen. **Diabetes** 1982; 31 (suppl.3): 47-51.
- 176.-KOSKINEN P., IRJALA K., VIKARI J., PANOLA-ONTTO R., MATIKAINEN M.T. Serum fructosamine in the assessment glycemic control in diabetes mellitus. **Scand J Clin Lab Invest** 1987; 47: 285-292.
- 177.-KRANTZ S., LOBER M., HENSCHL L. The nonenzymatic glycation of proteins and nucleic acids, their importance for the development of diabetic complications, possible molecular basis of aging and autoimmunological processes. **Exp Clin Endocrinol** 1986; 88: 257-269.
- 178.-KRAUS J. S., JONAH M. H., YOU S.J., TRINH M. Proportion of glycosylated hemoglobin in erythrocytes of a person with hemoglobin A, S and G Philadelphia. **Clin Chem** 1983; 29: 713-714.
- 179.-KRISHNAMOOR R., GACON G., LABIE D. Isolation and characterization of hemoglobin Alb. **FEBS Lett** 1977; 77:99-101
- 180.-KYNOCHE P.A.M., LEHMAN H. Rapid estimation (2 1/2 h.) of glycosylated haemoglobin for routine purposes. **Lancet** 1977;2: 16
- 181.-LARSEN M.L., HORDER M., MOGENSEN E.F. Effect of long-term monitoring of glycosylated hemoglobin levels in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med** 1990; 323: 1021-1025.
- 182.-LAVIN Jr. J.P. Screening of high-risk and general population for gestational diabetes mellitus. **Diabetes** 1985; 34(suppl.2) 24-27.

- 183.-LEE T.C., PINTAURO S. J., CHICHESTER C. O. Nutritional and toxicologic effect of nonenzymatic Maillard Browning. **Diabetes** 1982; 31 (suppl.3): 37-46.
- 184.-LEIPER J.M., TALWAR D., ROBB D.A., LUNAN C.B., MCCUISH A.C. Glycosylated albumin and glycosylated proteins: Rapidly changing indices of glycaemia in diabetic pregnancy. **Quart J Med** 1985; 218: 225-231.
- 185.-LESLIE R.D.G., PYKE D.A., JOHN P.N., WHITE J.M. Haemoglobin A1 in diabetic pregnancy. **Lancet** 1978;2: 958-959.
- 186.-LESTER E., FRAZER A. D., SEPHERD C. A., WOODROFFE F.J. Glycosylated hemoglobin as an alternative to the glucose tolerance test for the diagnosis of diabetes mellitus. **Ann Clin Biochem** 1985; 22: 74-78.
- 187.-LESTER J.A. The clinical value of glycated haemoglobin and glycated plasma proteins. **Ann Clin Biochem** 1989; 26: 213-219.
- 188.-LEVENO K.J., HAUTH J.C., GILSTRAP L.C. Appraisal of "rigid" blood glucose control during pregnancy in the overtly diabetic woman. **Am J Obstet Gynecol** 1979; 135: 853-858.
- 189.-LIM Y.S., STALEY M.J. Measurement of plasma fructosamine evaluated for monitoring diabetes. **Clin Chem** 1985; 31: 731-733.
- 190.-LIN T.M., HALBERT S.P., SPELLACY W.N. Relation of obstetric parameters to the concentration of four pregnancy-associated plasma proteins at term in normal gestation. **Am J Obstet Gynecol** 1976; 125: 17-24.
- 191.-LIND T., CHEYNE G.A. Effect of normal pregnancy upon the glycosylated haemoglobins. **Br J Obstet Gynecol** 1979; 86: 210-213.
- 192.-LIND T., GILMORE E.A. Physiological changes during normal human pregnancy and those complicated by diabetes mellitus. In: **Carbohydrate metabolism in pregnancy and the newborn**. Sutherland H. W., Stowers eds. Edimburgh: Churchill Livingstone, 1984: 38-46.
- 193.-LIND T., ASPILLAGA M. Metabolic changes during normal and diabetic pregnancies. In: **Diabetes mellitus in pregnancy**. Reece E.A., Coustan D.R. eds. New York: Churchill Livingstone 1988: 75-102.
- 194.-LITTLE R.R., WIEDMEYER H.M., ENGLAND J. D., KNOWLER W.C., GOLDSTEIN D.E. Measurement of glycosylated whole-protein for assessing glucose control in diabetes: Collection and storage of capillary blood on filter paper. **Clin Chem** 1985; 31:213-216
- 195.-LITTLE R. R., ENGLAND J. D., WIEDMEYER H., MCKENZIE E.M., PETTITT D. J., KNOWLER W.C., GOLDSTEIN D.E. Relationship of glycosylated hemoglobin to oral glucose tolerance. **Diabetes** 1988; 37: 60-64.
- 196.-LLOYD D., MARPLES J. Simple colorimetry of glycated serum protein in a centrifugal analyzer. **Clin Chem** 1984; 30: 1686-1688.
- 197.-LLOYD D. R., MARPLES J. Serum fructosamine and thyroid function. **Clin Chem** 1986; 32: 1985.

- 198.-MADSEN H., DITZEL J., HAHNEMANN N., ANDERSEN O., KJAERGAARD J. Haemoglobin A1c determinations in diabetic pregnancy. *Diabetes Care* 1981; 4: 541-546.
- 199.-MADSEN H., KJAERGAARD J. J., DITZEL J. Relationship between glycosylation of haemoglobin and the duration of diabetes: A study during the third trimester of pregnancy. *Diabetologia* 1982; 22: 37-40.
- 200.-MAILLARD L. C. Action des acides aminés sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C R Acad Sci* 1912; 154: 66-68.
- 201.-MALLIA A.K. HERMANSON G.T., KROHN R.I., FUJIMOTO E.K., SMITH P.K. Preparation and use of a boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins. *Anal Lett* 1981; 14: 649-661.
- 202.-MANDEL S.S., SHIN D.H., NEWMAN B.L., LEE J.H., LUPOVITCH A., DRAKES G. Glycosylation in vivo of human lens capsule (basement membrane) and diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117: 51-56.
- 203.-MARUNA P., SKRHA J., STREJC P. Serum fructosamine after death. *Diabetic Medicine*. 1989; 6: 460.
- 204.-MAYER T. K., FREEDMAN Z.R. Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and their clinical utility. *Clin Chim Acta* 1983; 127: 147-184.
- 205.-McCANCE D.R., RITCHIE C.M., KENNEDY L. Is HbA1 measurement superfluous in NIDDM ? *Diabetes Care* 1988; 11: 512-514.
- 206.-McDONALD M. J., SHAPIRO R., BLEICHMAN M., SOLWAY J.B., BUNN H.F. Glycosylated minor component of human adult hemoglobin *J Biol Chem* 1978; 253: 2327-2332.
- 207.-McFARLAND K.F., MURTIASHAW M., BAYNES J.W. Clinical value of glycosylated serum protein and glycosylated hemoglobin levels in the diagnosis of gestational diabetes mellitus. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 516-518.
- 208.-McVERRY B.A., THORPE S., JOE F., GAFFNEY P.J., HUEHNS E.R. Non-enzymatic glycosylation of fibrinogen. *Hemostasis* 1981; 10: 261-270.
- 209.-MENARD L., DEMSEY M.E., BLANSTEIN L.A., ALEYASSINE H., WACKS M., SOELDNER J.S. Quantitative determination of glycosylated hemoglobin A1 by agar gel electrophoresis. *Clin Chem* 1980; 26: 1598-1602.
- 210.-MENON R.K., COHEN R.M., SPERLING H.A., CUTFIELD W.S., MIMOUNI F., KHOURY J.C. Transplacental passage of insulin in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990; 323: 309-315.
- 211.-MILLER E., HARE J.W., CLOHERTY J.P., DUNN P.J., GLEASON R.E., SOELDNER S., KITZMILLER J.L. Elevated maternal hemoglobin A1c in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of diabetic mothers. *N Engl J Med* 1981; 304: 1331-1334.
- 212.-MILLER J. M. A reappraisal of "tight control" in diabetic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 158-160.

- 213.-MILLS J.L., KNOPP R.H., SIMPSON J.L., JOVANOVIC-PETERSON L., METZGER B.F., HOLMES L.B., AARONS J.H., BROWN Z., REED G.F., BIERER F.R., VAN ALLEN M., HOLZMAN I., OBER C., PETERSON C.M., WITHIAM M.J., DUCKLES A., MUELLER-HEUBACH E., POLK B.F. Lack of relation of increased malformations rates in infants of diabetic mothers to glycemic control during organogenesis. *N Engl J Med* 1988; 318: 671-676.
- 214.-MIMOUNI F., MIODOVNIK M., WHITSETT A., HOLROYDE J.C., SIDDIQUI T.A., TSANG R.C. Respiratory distress syndrome in infants of diabetic mothers in the 1980s. No direct adverse effect of maternal diabetes with modern management. *Obstet Gynecol.* 1987; 69: 191-195.
- 215.-MIODOVNIK M., MIMOUNI F., TSANG R.C., AMVIAR E., KAPLAN L., SIDDIQUI T.A. Glycemic control and spontaneous abortion in insulin-dependent diabetic women. *Obstet Gynecol* 1986; 68:366-369.
- 216.-MIODOVNIK M., MIMOUNI F., DIGNAN P.J., BERK M.A., BALLARD J.L., SIDDIQUI T.A., KHOURY J., TSANG R.C. Major malformations in infants of IDDM women. Vasculopathy and early first-trimester poor glycemic control. *Diabetes Care* 1988;11: 713-718.
- 217.-MODAN M., MEYTES D., ROZEMAN P., BEN YOSEF S., SEHAYEK E., BEN YOSEF N., LUSKY A., HALKIN H. Significance of high HbA1 levels in normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 1988; 11: 422-428.
- 218.-MONNIER V.M., KOHN R.R., CERAMI A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 583-587.
- 219.-MONNIER V.M., VISHWANATAH V., FRANK K.E., ELMETS C.A., DAUCHOT P., KOHN R. R. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med* 1986; 314: 403-408.
- 220.-MORRIS A. M., GRANDIS A. S., LITTON J. The correlations of glycosylated serum proteins and glycosylated hemoglobin concentrations with blood glucose in diabetic pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153: 257-260.
- 221.-MORRIS M.A., GRANDIS A.S., LITTON J.C. Longitudinal assesment of glycosylated blood proteins concentrations in normal pregnancy and gestational diabetes. *Diabetes Care* 1986a; 9:107-110.
- 222.-MORRIS M.A., GRANDIS A.S., LITTON J. Glycosylated hemoglobin. A sensitive indicator of gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1986b; 68: 357-361.
- 223.-MOSCA A., CARENINI A., ZOPPI F., CARPINELLI A., BANFI G., CERLOTTI F., BONINI P., POZZA G. Plasma protein glycation as measured by fructosamine assay. *Clin Chem* 1987; 33: 1141-1146
- 224.-MOYA F.R., GROSS I. Diabetes and fetal lung development. In: *Diabetes Mellitus in Pregnancy*. Reece E.A., Coustan D.R., eds. New York: Churchill Livingstone, 1989: 123-141.
- 225.-NASRAT H.A., AJABNOOR M.A., ARDANI M.S.M. Fructosamine as a screening test for gestational diabetes mellitus: a reappraisal. *Int J Gynecol Obstet* 1990; 34: 27-33.

- 226.-NATHAN D.M., FRANCIS T.B., PALMER J.L. Effect of aspirine on determination of glycosylated hemoglobin. *Clin Chem* 1983; 29: 466-468.
- 227.-NATHAN D.M., SINGER D.E., HURXTHAL K., GOODSON J. D. The clinical information value of glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984a; 310: 341-346.
- 228.-NATHAN D. M., BUNN B.S., FRANCIS T.B. Two comercial methods evaluated for eliminating the labile fraction from the assay for glycated hemoglobin. *Clin Chem* 1984b; 30: 109-110.
- 229.-NATIONAL DIABETES DATA GROUP. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance *Diabetes* 1979; 28: 1039-1057.
- 230.-NAYAK S.S., PATTABIRAMAN T. A new colorimetric method for the estimation of glycosylated hemoglobin. *Clin Chim Acta* 1981;109: 267-274.
- 231.-NELSON D. M., BARROWS H. J., CLAPP D. H., ORTMAN-NABI J., WHITERHURST R. M. Glycosylated serum proteins levels in diabetic and nondiabetic pregnant patients: An indicator of short-term glycemic control in the diabetic patient. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151: 1042-1047.
- 232.-NEY K.A., COLLEY K.J., PIZZO S.V. The standarization of the thiobarbituric acid assay for nonenzymatic glucoylation of human serum albumin. *Ann Biochem* 1981; 118: 294-300.
- 233.-NICOL D.J., DAVIES D.R., McCANN V.J. Hemoglobinopathy in patients with diabetes mellitus: A complication factor in the measurement of glycosylated hemoglobin. *Diabetes* 1983; 6: 520-524.
- 234.-OJOMO E. O., COUSTAN D.R. Absence of evidence of pulmonary maturity at amniocentesis in term infants of diabetic mothers. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 954-957.
- 235.-O'SHAUGHNESSY R., RUSS J., ZUSPAN F. P. Glycosylated hemoglobins and diabetes mellitus in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 135: 783-790.
- 236.-O'SULLIVAN J. B., MAHAN C.M. Criteria for the oral glucose tolerance test in pregnancy. *Diabetes* 1964; 13: 278-285.
- 237.-O'SULLIVAN J. B., MAHAN C. M., CHARLES D., DANDROW R.V. Screening for high-risk gestational diabetes patients. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 116: 895-899.
- 238.-O'SULLIVAN J. B. Subsequent morbidity among gestational diabetic women. In: *Carbohydrate metabolism in pregnancy and the newborn*. Sutherland H.W., Stowers J.M. eds. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1984: 174-180.
- 239.-OSWALD G. A., YUDKIN J. S. Hyperglycaemia following acute miocardial infarction: The contribution of undiagnosed diabetes. *Diabetic Medicine* 1987; 4: 68-70.
- 240.-PAISEY R.B., CLAMP J.R., KENT M.J.C., LIGHT N.D., HAPTON M., HARTOG M. Glycosylation of hair: possible measure of chronic hyperglycemia. *Br Med J* 1984; 288: 669-671.

- 241.-PALLARDO L.F., SAEZ DEL CASTILLO M.I., SICILIA A., LOPEZ J., GONZALEZ A., CERDAN A. La hemoglobina A1 en el control de la embarazada diabética. *Med Clin (Barc.)* 1981; 77: 162-166.
- 242.-PALLARDO L. F. Concepto, clasificación y diagnóstico. In: **Diabetes mellitus no insulín dependiente**. Barcelona: Boehringer Mannheim S.A., 1989: 11-22.
- 243.-PALLARDO L.F., GRANDE C., LUNA R., DE LA MORENA M.L., GONZALEZ A. Diabetes y embarazo. Nuestra experiencia en diabetes pregestacional (1977-88). *Endocrinología* 1990a; 37: 19-24.
- 244.-PALLARDO L. F., GRANDE C., LUNA R., MEGIA A., GONZALEZ A. Diabetes y embarazo. Nuestra experiencia en diabetes gestacional (1977-1988). *Med Clin (Barc)* 1990b; 95: 406-410.
- 245.-PANZER S., KRONIK G., LECHNER K., BETTELHEIMN A., NEUMAN E., DUDEZAK R. Glycosylated hemoglobin (GHb): an index of red cell survival. *Blood* 1982; 59: 1348-1350.
- 246.-PECK R.W., PRICE D.E., LANG G.D., McVICAR J., HEARNshaw J.R. Birthweight of babies born to mothers with type 1 diabetes: is it related to blood glucose control in the first trimester? *Diabetologia* 1991; 8: 258-262.
- 247.-PECORARO R.E., GRAF R. J., HALTER J.B., BELTER H., PORTE D. Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. *Diabetes* 1979; 28:1120-1125
- 248.-PEDERSEN J. **The pregnant diabetic and their newborn: Problems and management**. 2ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1977, 211-220.
- 249.-PEDERSEN J. F., MOLSTED-PEDERSEN L., MORTENSEN H.B. Fetal growth delay and maternal hemoglobin A1c in early diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1984; 64: 351-352.
- 250.-PETERSON C.M., KOENIG R.J., JONES R.L., SAUDEK C.D., CERAMI A. Correlation of serum tryglyceride level and hemoglobin A1c concentrations in diabetes mellitus. *Diabetes* 1977; 26: 507-509
- 251.-PHELPS R.L., HONIG G.R., GREEN D., METZGER B.E., FREDERIKSEN M. C., FREINKEL N. Biphasic changes in hemoglobin A1c concentrations during normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 651-653.
- 252.-PIERCE J., SUELTER C. H. An evaluation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 dye-binding method for quantitative protein determination. *Anal Biochem* 1977; 81: 478-480.
- 253.-POLLAK A., WIDNESS J. A., SCHWARTZ R. Minor hemoglobins: an alternative approach for evaluating glucose control in pregnancy. *Biol Neonate* 1979; 36: 185-192.
- 254.-POLLAK A., LISCHKA A., BARTL W., LANGER M., WALDHAUSER F., LEVIN S., SCHMID R., GHERARDINI R. Glycated plasma proteins in normal and diabetic mothers and their offspring. *Acta Endocrinologica* 1986; 277 (suppl.):141-144.
- 255.-PONGOR S., ULRICH P.C., BENCSATH F.A., CERAMI A. Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2684-2688.

- 256.-RAHBAR S. An abnormal hemoglobin in red cells of diabetes. *Clin Chim Acta* 1968; 22: 296-298.
- 257.-RAI K.B., SHARMA K., PATTABIRAMAN T.N. A short duration colorimetric method based on phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of glycosylhemoglobin. *Biochem Med* 1984; 31:65-72.
- 258.-REDONDO F.L. *La lógica en la interpretación de las pruebas diagnósticas*. Madrid: Garsi S.A., 1989: 137-177.
- 259.-REECE E.A., BATES S., DeGENNARO N. Glucose evaluation and control. In: *Diabetes Mellitus in Pregnancy*. Reece E.A., Coustan D.R. eds. New York: Churchill Livingstone, 1988: 249-270.
- 260.-RENDELL M., STEPHEN P. M., PAULSEN R. An interspecies comparison of normal levels of glycosylated hemoglobin and glycosylated albumin. *Comp Biochem Physiol* 1985a; 81B: 819-822
- 261.-RENDELL M., KAO M., MECHERIKUNNEL P., PETERSEN B., DUHANEY R., NIERENBERG J., RASBOLD K., KLENK D., SMITH P. Use of aminophenylboronic acid affinity chromatography to measure glycosylated albumin levels. *J Lab Clin Invest* 1985b; 105: 63-69.
- 262.-RICHARDSON D. K., SCHWARTZ J. S., WEINBAUM P.J., GABBE S. Diagnostic tests in obstetrics. A method for improved evaluation. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152: 613-618.
- 263.-ROBERT M.F., NEFF R.K., HUBBELL J.P., TAEUSCH H.W., AVERY M.E. Association between maternal diabetes and the respiratory distress-syndrome in the newborn. *N Engl J Med* 1976; 294: 357-360.
- 264.-ROBERTS A.B., BAKER J.R., COURT D.J., JAMES A.G., HENLEY P., RONAYNE I.D. Fructosamine in diabetic pregnancy. *Lancet* 1983; 2: 998-1000.
- 265.-ROBERTS A.B., BAKER J.R. Serum fructosamine: a screening test for diabetes in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 1027-1030.
- 266.-ROBERTS A.B., BAKER J.R. Relationship between fetal growth and maternal fructosamine in diabetic pregnancy. *Obstet Gynecol* 1987; 70: 242-246.
- 267.-ROBERTS A.B., BAKER J.R., JAMES A.G., HENLEY P. Fructosamine in the management of gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159: 66-71.
- 268.-ROBERTS A.B., BAKER J.R., METCALF P. MULLARD C. Fructosamine compared with a glucose load as a screening test for gestational diabetes. *Obstet Gynecol* 1990; 76: 773-775.
- 269.-ROSEL P., BALLESTER J., RIVERA A., GUILLEN E., ARRANZ B., NAVARRO M. A. Glicohemoglobina: estudio del efecto de la temperatura y de la fracción lábil en diferentes métodos cromatográficos. *Química Clínica* 1990; 9: 407-410.
- 270.-ROSENTHAL M.A. Effect of temperature on the fast hemoglobin test system. *Hemoglobin* 1979; 3: 215-217.

- 271.-ROSS L.S., MITCHELL A.F., STROUD R.E. Glycated haemoglobin and glycated plasma proteins: a comparative study. *Clin Chim Acta* 1986; 156: 329-336.
- 272.-ROTH M. "Glycated" hemoglobin, not "glycosylated" or "glucosylated". *Clin Chem* 1983; 29: 1991.
- 273.-RYAN E. A., STARK R., CROCKFORD P. M., SUTHIJUMROON A. Assessment of value of glycosylated albumin and protein in detection of gestational diabetes. *Diabetes Care* 1987; 10:213-216.
- 274.-SADLER T.W., HUNTER III E.S., WYNN R.E., PHILIPS L.S. Evidence for a multifactorial origin of diabetes induced embryopathies. *Diabetes* 1989; 38: 70-74.
- 275.-SAIBENE V., BREMBILLA L., BERTOLETI A. Chromatographic and colorimetric detection of glycosylated hemoglobins: A comparative analysis of two different methods. *Clin Chim Acta* 1979; 93: 199-205.
- 276.-SALEH A.K., MOUSSA M.A.A. An automated liquid-chromatographic system for convenient determination of glycated hemoglobin. *Alc.Clin Chem* 1985; 31: 1872-1876.
- 277.-SALTMARCH M., LABUZZA T.P. Nonenzymatic browning via the Maillard reaction in foods. *Diabetes* 1982; 31(suppl.3):29-36
- 278.-SAMAJA M., MELOTTI D., LARENINI A., POZZA G. Glycosylated haemoglobins and the oxygen affinity of whole blood. *Diabetologia* 1982; 23: 399-402.
- 279.-SANGIL F., SCHIER G. M., MOSES R.G., GAN J.E.T. Improved estimation of fructosamine as a measure of glycated serum protein with the Technicon RA-1000 analyzer. *Clin Chem* 1985; 31:2005-2006.
- 280.-SANTIAGO J.V., DAVIS J.E., FISHER F. Hemoglobin Alc levels in a diabetic detection program. *J Clin Endocrinol Metab* 1978; 47: 578-580.
- 281.-SCHELLEKENS A. P. M., SANDERS G. T. B., THORNTON W., VAN GROENESTEIN T. Sources of variation in the column-chromatographic determination of glycohemoglobin (HbA1). *Clin Chem* 1981;27:94-99.
- 282.-SCHLEBUSCH H., SORGER M., LIAPPIS N., WEEK C., PAFFENHOLZ I. Fructosamine reference ranges for pregnant women, children and adolescents determined by an improved NBT method. *Wiener Klin Woch* 1990; suppl.180: 51-56.
- 283.-SCHLEICHER E., SCHELLER L., WIELAND O. H. Quantitative investigation of nonenzymatic glucosylation of erythrocyte membrane from normal and diabetic persons. *Horm Metab Res* 1981 ;11 (suppl.): 95-97.
- 284.-SCHLEICHER E. D., GERBITZ K. D., DOLHOFER R., REINDL E., WIELAND O.H., EDELMANN E., HASLBECK M., KEMMLER W., WALTER H., MEHNERT H. Clinical utility of nonenzymatically glycosylated blood proteins as an index of glucose control. *Diabetes Care* 1984; 7: 548-556.
- 285.-SCHLEICHER E. D., BERND W. V. Standardization of serum fructosamine assays. *Clin Chem* 1990; 36: 136-139.

- 286.-SCHNIDER S. L., KOHN R. R. Glycosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1980;66:1179-1181
- 287.-SCHROEDER W. A., HOLMQUIST W. R. **Structural chemistry and molecular biology**. Rich A., Davidson N. eds. San Francisco: Freeman, 1968: 238-255.
- 288.-SCHWARTZ H.C., KING K.C., SCHWARTZ A.L., EDMUNDS D., SCHWARTZ R. Effects of pregnancy in hemoglobin Alc in normal, gestational diabetic and diabetic women. *Diabetes* 1976; 25: 1118-1122.
- 289.-SHAFRIR E., BERGMAN M., FELIG P. The endocrine pancreas: Diabetes mellitus .In **Endocrinology and Metabolism**.2nd ed.Felig P.,Baxter J. D., Broadus A.E.,Frohman L.A., eds.New York: Mc Graw-Hill Book Company, 1987: 1043-1178.
- 290.-SHAH B. D., COHEN A. W., MAY C., GABBE S. Comparison of glycohemoglobin determination and the one-hour oral glucose screen in the identification of gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 144: 774-777.
- 291.-SHAPIRO R., McMANUS M. J., ZALUT C. Sites of nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin A. *J Biol Chem* 1980; 225: 3120-3127.
- 292.-SIMON M., EISSLER J. Critical factors in the chromatographic measurement of glycohemoglobin (HbA1). *Diabetes* 1980; 29: 467-474.
- 293.-SIMON M., CUAN J. Hemoglobin Alc by isoelectric focusing. *Clin Chem* 1982; 28: 9-12.
- 294.-SIMON D., COIGNET M.C., THIBULT N., SENAN C., ESCHWEGE I. Comparison of glycosylated hemoglobin and fasting plasma glucose with two-hour post-load plasma glucose in the detection of diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 1985; 122: 589-593.
- 295.-SINGER D. E., COLEY C. M., SAMET J.H., NATHAN D.M. Tests of glycemia in diabetes mellitus. Their use in establishing a diagnosis and in treatment.*Ann Intern Med* 1989; 110:125-137
- 296.-SKYLER J. S., SKYLER D. L., SEIGLER D.L., O'SULLIVAN M.J. Algorithms for adjustments of insulin dosage by patients who monitor blood glucose. *Diabetes Care* 1981; 4: 311-316.
- 297.-SLEMENDA C.W., MARRERO D.G., FINEBERG S.E., MOORE P., GIBSON R. Mail in paper strip vs. microcolumn technique for measurement of glycosylated hemoglobin. *Diabetes Care* 1990; 13: 886-888.
- 298.-SMART L.M., HOWIE A.F., YOUNG R.J., WALKER S.W., CLARKE D.F., SMITH A. F. Comparison of fructosamine with glycosylated hemoglobin and plasma proteins as measures of glycemic control *Diabetes Care* 1988; 11: 433-436.
- 299.-SMID E., FERENCZ A., FODOR M. Use of pooled human serum in the standardization process of the serum fructosamine determination for the estimation of glycosylated serum proteins. *Clin Chim Acta* 1986; 156: 215-220.

- 300.-SOLER N. G., FRANK S. Value of glycosylated hemoglobin measurements after myocardial infarction. **JAMA** 1981;246: 1690-1693.
- 301.-SOSENKO I. R., KITZMILLER J. L., LOO S.W., BLISE P., GABBAY K. H., RUBENSTEIN A. H. The infant of diabetic mother: correlation of increased C-peptide levels with macrosomia and hypoglycemia. **N Engl J Med** 1979; 301: 859-862.
- 302.-SOSENKO J. M., KITZMILLER J. L., FLÜCKIGER R., LOO S.W.H., YOUNGER D., GABBAY K.H. Umbilical cord glycosylated hemoglobin in infants of diabetic mothers: Relationships to neonatal hypoglycemia, macrosomia and cord serum C-peptide. **Diabetes Care** 1982; 5: 566-570.
- 303.-SPIRO R.G. Search for a biochemical basis of diabetic microangiopathy. **Diabetologia** 1976; 12: 1-7.
- 304.-STANDEFER J.C., EATON R.P. Evaluation of a colorimetric method for determination of glycosylated hemoglobin. **Clin Chem** 1983; 29: 135-140.
- 305.-STARMAN H. S., WACKS M., SOELDNER J.S. Effect of acute blood loss on glycosylated hemoglobin determinations in normal subjects. **Diabetes Care** 1983; 6: 291-294.
- 306.-STEEL J.M., THOMSON P., JOHNSTONE F. Glycosylated haemoglobin concentrations in mothers of large babies. **Br Med J** 1981; 282: 1357-1358.
- 307.-STEEL J.M. Preconception, conception and contraception .In: **Diabetes Mellitus in Pregnancy**. Reece E.A., Coustan D.R. eds. New York: Churchill Livingstone, 1988: 601-620.
- 308.-STEVENS V.J., VLASSARA H., ABATI A., CERAMI A. Nonenzymatic glycosylation of hemoglobin. **J Biol Chem** 1977; 252: 2998-3002
- 309.-STOLBA P., HATLE K., KRNAKOVA A., STREDA M., STARKA L. Effects of ascorbic acid on nonenzymatic glycation of serum proteins in vitro and in vivo. **Diabetologia** 1987; 30: 529a.
- 310.-STUBBS S.M., LESLIE R.D.G., JOHN P.N. Fetal macrosomia and maternal diabetic control in pregnancy. **Br Med J** 1981; 282: 439-440.
- 311.-STUBBS S.M., DODDRIGE M., JOHN P.N., STEEL J.M., WRIGHT A.D. Haemoglobin A1 and congenital malformations. **Diabetic Medicine** 1987; 4: 156-159.
- 312.-Summary and recommendations of the Second International Workshop Conference on Gestational Diabetes Mellitus. **Diabetes** 1985; 34 (suppl.2): 123-126.
- 313.-SUSA J. B., WIDNESS J.A., HINTZ R., FRANCES L., SEHGAL P., SCHWARTZ R. Somatomedins and insulin in diabetic pregnancies. Effects on fetal macrosomia in the human and Rhesus monkey. **J Clin Endocrinol Metab** 1984; 58: 1099-1105.
- 314.-SWAI A. B.H., HARRISON K., CHUWA L.H., MAKENE W., McLARTY D., ALBERTI K.G:M.M. Screening for diabetes. Does measurement of serum fructosamine help ? **Diabetic Medicine** 1988; 5:648-652.

- 315.-TALWAR D., BARR B.B., KESSON C.M., ROBB D.A. Determination of glycosylated adult and foetal haemoglobins by affinity chromatography. *Clin Chim Acta* 1983; 128: 61-67.
- 316.-TATTERSALL R., PEACOCK I. Assessment of diabetic control. In: *The Diabetes Annual/3*. Alberti K.G.M.M., Krall L.P., eds. Amsterdam: Elsevier, 1987: 143-157.
- 317.-TEGOS C., BEUTLER E. Glycosylated hemoglobin A2 components. *Blood* 1980; 56: 571-572.
- 318.-TEGOS C., RAHBAR S., BLUME K., JOHNSON C., BEUTLER E. Glycosylated minor C, D and E hemoglobins. *Biochem Med* 1981; 26: 121-125.
- 319.-TRIVELLI L.A., RANNEY H.M., LAI H.T. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1971; 284: 353-357.
- 320.-TYDEN O., ERIKSON V.J., BERNE C. Fetal lung maturation in diabetic pregnancy. *Acta Endocrinologica* 1986; suppl.277: 101-105.
- 321.-VAN DIEIJEN-VISSER M. P., SEYNAEVE C., BROMBACHER P. J. Influence of variations in albumin and total protein on serum fructosamine concentrations. *Clin Chem* 1986a; 32: 1610-1613.
- 322.-VAN DIEIJEN-VISSER M. P., SALEMANS T., VAN WERSCH J.W.J., SCHELLEKENS L.A., BROMBACHER P.J. Glycosylated serum proteins and glycosylated haemoglobin in normal pregnancy. *Ann Clin Biochem* 1986b; 23: 661-666.
- 323.-VERILLO A., DE TERESA A., GOLIA R., NUNZIATA V. The relationship between glycosylated hemoglobin levels and various degrees of glucose intolerance. *Diabetologia* 1983; 24: 391-393.
- 324.-VERMES I., ZEYEN L.J.J.M., VAN ROON E., BRANDIS H. The role of serum fructosamine as a screening test for gestational diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1989; 21: 73-76.
- 325.-VINTZILEOS A.M., THOMSON J.P. Glycohemoglobin determinations in normal pregnancy and in insulin-dependent diabetes. *Obstet Gynecol* 1980; 56: 435-439.
- 326.-VLASSARA H., BROWNLEE M., CERAMI A. Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5190-5192.
- 327.-WALINDER O., RONQUIST G., FAGER P.J. New spectrophotometric method for determination of hemoglobin A1 compared with a microcolumn technique. *Clin Chem* 1982; 28: 96-99.
- 328.-WELCH S.G., BOUCHER B. J. A rapid microscale method for the measurement of haemoglobin A1 (a+b+c). *Diabetologia* 1978; 14: 209-211.
- 329.-WHITE P. Pregnancy and diabetes. In: *Joslin's Diabetes Mellitus*. 11^a ed. Marble A., White P., Bradley R.F., Krall L.P. eds. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971: 581-604.
- 330.-W.H.O. Expert Committee on Diabetes Mellitus. Technical Report Series 727. *World Health Organization*. Geneva 1985.

- 331.-WIDNESS J. A., SCHWARTZ H.C., THOMPSON D., KAHN C.B., OH W., SCHWARTZ R. Hemoglobin A_{1c} (glycohaemoglobin) in diabetic pregnancy: an indicator of glucose control and fetal size. *Br J Obstet Gynecol* 1978; 85: 812-817.
- 332.-WIDNESS J. A., SCHWARTZ H. C., KAHN C.B. OH W., SCHWARTZ R. Glycohemoglobin in diabetic pregnancy: A sequential study. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 136: 1024-1029.
- 333.-WILLEY D. G., ROSENTHA M. A., CALDWELL S. Glycosylated haemoglobin and plasma glycoprotein assays by affinity chromatography. *Diabetologia* 1984; 27: 56-58.
- 334.-WINDELER J., KÖBBERLING J. The fructosamine assay in diagnosis and control of diabetes mellitus. Scientific evidence for its clinical usefulness ?. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 129-138.
- 335.-WINOCOUR P.H., BHATANAGAR D., KALSI P., HILLIER V.F., ANDERSON D.C. Relative clinical usefulness of glycosylated serum albumin and fructosamine during short-term changes on glycemic control in IDDM. *Diabetes Care* 1989; 12: 665-672.
- 336.-WITZTUM J. L., STEINBRECHER U. P., FISHER M., KESANIEMI A. Nonenzymatic glycosylation of homologous low density lipoprotein and albumin renders them immunogenic in the guinea-pig. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 2757-2761.
- 337.-WORTH R., ASHWORTH L., HOME P., GERRARD J., LIND T., ANDERSON J., ALBERTI K.G.M.M. Glycosylated haemoglobin in cord blood following normal and diabetic pregnancies. *Diabetologia* 1983; 25: 482-485.
- 338.-WORTH R., POTTER J. M., DRURY J., FRASER R.B., CULLEN D.R. Glycosylated haemoglobin in normal pregnancy: a longitudinal study with two independent methods. *Diabetologia* 1985; 28: 76-79.
- 339.-YASTCOFF R.W., TAVAARWERK G.J.M., McDONALD J.C. Quantitation of non enzymatically glycated albumin and total serum protein by affinity chromatography. *Clin Chem* 1984; 30: 446-449.
- 340.-YLINEN R., RAVIO K., TERAMO K. Haemoglobin A_{1c} predicts the perinatal outcome in insulin-dependent diabetic pregnancies. *Br J Obstet Gynecol* 1981; 88: 961-967.
- 341.-YLINEN K., AULA P., STENMAN U. H., KESANIEMI-KUOKKANEN T., TERAMO K. Risk of minor and major fetal malformations in diabetics with high haemoglobin A_{1c} values in early pregnancy. *Br Med J* 1984; 289: 345-346.
- 342.-YUDKIN J.S., FORREST R.D., JACKSON C.A., RYLE A.J., DAVIE S., GOULD B.J. Unexplained variability of glycated haemoglobin in non-diabetic subjects not related to glycaemia. *Diabetologia* 1990; 33: 208-215.
- 343.-ZAPATA A., HERNANDEZ GARCIA J.M., DE LA FUENTE P. Amniotic fluid phospholipids and foetal lung maturation. *Scand J Clin Lab Invest* 1988; 48: 39-43.
- 344.-ZELLER W.P., SUSAN J.B., WIDNESS J.A., SCHWARTZ C., SCHWARTZ R. Glycosylation of hemoglobin in normal and diabetic mothers and their fetuses. *Pediatr Res* 1983; 17: 200-203.

- 345.-ZIEL F. H., DAVIDSON M. B. The role of glucosylated serum albumin in monitoring glycemic control in stable insulin requiring diabetic out-patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 269-273.