

# M

# MEMORIA MOLECULAR DE CETOAMINAS PLASMÁTICAS Y HEMOGLOBINAS GLICOSILADAS PARA INDAGAR EL ESTADO DEL METABOLISMO HIDROCARBONADO\*

\*  
Trabajo presentado en la 2ª Reunión Latinoamericana de Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, UNRC, Río Cuarto (Córdoba), diciembre de 1996.

Coppo, J. A. / Coppo, N. B.

MOLECULAR MEMORY OF PLASMATIC KETOAMINES AND GLYCATED HAEMOGLOBINS TO INQUIRE THE CARBOHYDRATE METABOLISM STATUS

A bibliographical review about the diagnostic utility of glycated haemoglobin (HbA1c) and fructosamine, was made. Haemoglobin and seric proteins can receive a non-enzymatic glycation; so they reflect retrospectively the average glycaemia from the last 2-3 months (HbA1c) or 8-12 days (fructosamine). The obtained values of glycated proteins from various species of healthy animals, as well as normal human samples used as reference, were reported. "Batch" chromatography and nitroblue tetrazolium were the methods used to measure HbA1c and fructosamine, respectively. No statistically significant differences between sexes and ages ( $p < 0.05$ ) have been found.

HbA1c and fructosamine increases in samples from both diabetic human beings and animals, were detected. In hyperglycaemic non-diabetic canines, fructosamine stayed in normal values, but this parameter significantly decreased on a lot of normoglycaemic hypoproteinemic dogs. The obtained results from both healthy and non-healthy subjects, were compared with the published by other authors, which used the same or different laboratory method. Coincidences and discrepancies are found. The apparent low prevalence rate for canine diabetes mellitus in our region, perhaps attributable to complementary diagnosis failure, was discussed. For the diagnosis improvement, glycated proteins determination is recommended. These parameters are independent to the actual glycaemia and evaluate the carbohydrate metabolism for long term (HbA1c) or moderate term (fructosamine). Moreover, glycated proteins are useful in the animal hypo/hyperglycaemia differential diagnosis.

KEY WORDS: fructosamine, glycated haemoglobin, glycaemia, domestic animals.

Se efectúa una actualización bibliográfica sobre la utilidad diagnóstica de glucoproteína (HbA1c) y fructosamina, proteínas que al glicosilarse en forma no-enzimática, reflejan retrospectivamente la glucemia correspondiente a los últimos 2-3

ABSTRACT

meses y 8-12 días respectivamente. Se narran los valores obtenidos para ambos analitos en animales sanos de distintas especies, así como en personas normales utilizadas como referencia, empleando las técnicas de cromatografía "batch" (HbA1c) y azul nitrotetrazolio (fructosamina). No se hallan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre sexos y edades. Se destacan los incrementos de HbA1c y fructosamina hallados en personas y animales diabéticos. En caninos hiperglucémicos no-diabéticos constatan normalidad en las concentraciones de fructosamina, parámetro que disminuyó significativamente en un grupo de perros normoglucémicos hipoproteinémicos. Se comparan los resultados hallados en sujetos sanos y enfermos, con los reportados por otros autores para la misma o distinta técnica de laboratorio, surgiendo coincidencias y discrepancias. Se discute la aparentemente baja tasa de prevalencia de diabetes mellitus canina en nuestro medio, quizás atribuible a falencias del diagnóstico complementario, aconsejándose el dosaje de proteínas glicosiladas para subsanarlas. Por ser independientes de la glucemia actual, evalúan a largo plazo (HbA1c) o mediano plazo (fructosamina) el metabolismo hidrocarbonado y son útiles en el diagnóstico diferencial de las hipo/hiperglucemias animales.

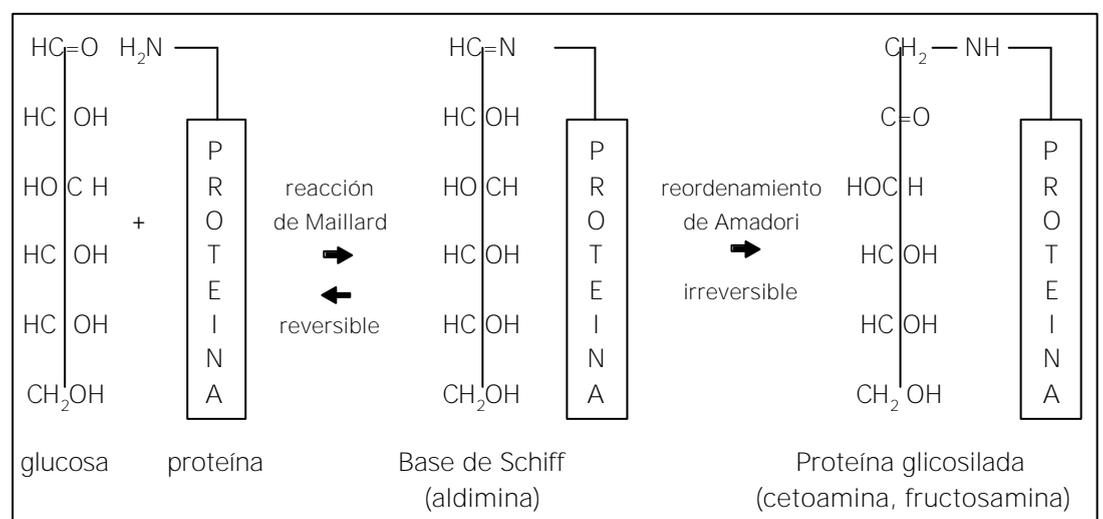
**PALABRAS CLAVE:** fructosamina, glucohemoglobina, glucemia, animales domésticos.

## INTRODUCCIÓN

### LA GLICOSILACIÓN PROTEICA

Cualquier proteína del organismo (hemoglobina, albúmina, colágeno, mielina, elastina, apolipoproteínas, factores de la coagulación, etc.) posee la capacidad de adicionar moléculas de aldosas en forma lenta pero continua; esta glicosilación será tanto más intensa cuanto más elevada y persistente sea la concentración de glucosa en el medio interno [1, 2, 3].

La *Figura 1* ilustra la síntesis de las proteínas glicosiladas, proceso no-enzimático que se inicia cuando el grupo aldehído del monosacárido se une a un grupo epsilon-amino de residuos de lisina o valina de una proteína (reacción de Maillard), produciendo una aldimina inestable (Base de Schiff). Esta última sufre una redistribución (reordenamiento de Amadori), constituyéndose una cetoamina (fructosilamina) estable. Así glicosilada, la proteína "informa" sobre los niveles glucémicos de manera retrospectiva e independiente del valor actual de la aldosa ("memo-



**FIGURA 1:** Mecanismo de la glicosilación no enzimática de una proteína. La glucosa se fija lentamente a grupos amino libres de una proteína formando aldimas inestables, las que sufren un reordenamiento y se tornan estables.

ria molecular”), con la única limitación que le impone la vida media de la proteína [4, 5].

Las proteínas glicosiladas serían responsables de varias alteraciones propias de la diabetes mellitus y del envejecimiento humano [6], tales como desmielinización, modificación del colágeno intercelular y opacidad del cristalino [7]. Las proteínas séricas sufrirían anomalías funcionales al glicosilarse: las albúminas perderían afinidad por bilirrubina/ácidos grasos, las LDL serían captadas en menor grado por los fibroblastos, el colesterol de HDL disminuiría, la fibrina sería degradada escasamente por la plasmina, decrecerían ciertas inmunoglobulinas y muchas enzimas se inactivarían [2, 8, 9]. La acumulación de proteínas glicosiladas en los tejidos de animales viejos y/o diabéticos produciría complicaciones tales como retinopatías y cataratas [10], y trastornos glomerulares con alteración de la función renal [1, 11, 12].

#### GLICOSILACIÓN DE LA HEMOGLOBINA

La hemoglobina (Hb) es una proteína conjugada formada por cuatro cadenas polipeptídicas (globina), cada una de las cuales posee un grupo prostético (hem). Este último es idéntico en hombre y animales, residiendo las diferencias en los polipéptidos. La Hb está contenida en los eritrocitos, células donde el pasaje de glucosa es insulino-independiente. En seres humanos la Hb más abundante es la HbA (dos cadenas alfa y dos cadenas beta); las hemoglobinas glicosiladas representan un pequeño porcentaje de la HbA (0.4% de HbA1a, 0.5% de HbA1b y 3-6% de HbA1c) [5,13]. La HbA1c se conoce comúnmente como “hemoglobina glicosilada” o “glucohemoglobina”, aunque algunos prefieren englobar las tres fracciones: HbA1(a+b+c) [5].

La glicosilación de la Hb ocurre en el extremo aminoterminal de las cadenas beta a lo largo de la vida del eritrocito (130 días en el hombre, 140-150 días en equinos y bovinos, 100-120 días en caninos, 35 días en la gallina) [14]. En los perros el único tipo de Hb es “A” ( $\alpha_2\beta_2$ ), donde la secuencia de los últimos cuatro aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena b es idéntica a la del ser humano; el hecho de que los caninos posean HbA1c, sumado a una similar vida media de Hb e idéntica tasa de glucosa sanguínea, implica que su glicosilación responde al mismo mecanismo fisiopatológico y refleja el promedio de la gluce-

mia de los últimos 2-3 meses [10] o las últimas 5-7 semanas [4].

#### GLICOSILACIÓN DE LAS SEROPROTEÍNAS

Así como la Hb intraeritrocitaria, las proteínas séricas también pueden glicosilarse. Genéricamente se denomina “fructosamina” al compuesto resultante de la fijación no-enzimática de moléculas de glucosa a grupos amino libres de proteínas plasmáticas, principalmente albúminas. Dado que la magnitud de glicosilación depende de los niveles promedio de glucosa, la fructosamina es una excelente indicadora de hiper o hipoglucemias crónicas en seres humanos [3], caninos [15, 16], felinos [17] y roedores [18]. Su concentración también se afectaría ante hiper e hipoproteinemias prolongadas [19], aunque la variación proteica debería ser grande para llegar a afectar la concentración de fructosamina [20].

Las seroproteínas glicosiladas permiten discriminar entre perros hiperglucémicos diabéticos y no-diabéticos, con altas sensibilidad y especificidad [21]. Su determinación es útil para el diagnóstico de la toxemia gestacional de la oveja [22], la cetosis subclínica del bovino [23] y el carcinoma pancreático secretor de insulina del canino [24].

Fructosamina representa el nivel promedio de la glucemia de las últimas 1-2 semanas [4], o 1-3 semanas [15] u 8-12 días [16].

#### OBJETIVOS

El propósito de esta comunicación es brindar una breve actualización sobre la utilidad diagnóstica de las proteínas glicosiladas, así como relatar los trabajos que desde hace dos décadas venimos llevando a cabo en nuestro grupo.

En la década de 1980, ante la aparición de las primeras técnicas para el dosaje de HbA1c, obtuvimos sus valores de referencia en seres humanos y diferentes especies animales [25], constatamos su elevación en la diabetes canina [26] y su utilidad en la evaluación de la insulinoterapia [27].

En la década de 1990 se incorpora al laboratorio clínico la determinación de fructosamina, ante lo cual procedimos a obtener su intervalo de referencia en seres humanos [28] y caninos [29], abocándonos luego a relacionar este parámetro con los niveles hemáticos de glucosa y proteínas tota-

les en ejemplares sanos y pacientes afectados por diabetes mellitus y otras enfermedades.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### SUJETOS EXPERIMENTALES

Se recopilan, a manera de controles de referencia, valores obtenidos en 66 personas (50% de cada sexo, edades: 2 a 70 años) incluidas en una investigación tendiente a determinar índices aterogénicos en población del nordeste argentino (47 sanas + 19 diabéticas) [30], así como 359 seres humanos (50% de cada sexo, edades: 60 a 92 años) involucrados en una búsqueda de intervalos de referencia en geriatría (335 sanos + 24 diabéticos) [31].

Ciento setenta caninos de distintas razas, ambos sexos y edades de 1 a 12 años fueron incorporados al estudio (126 sanos, 7 diabéticos, 11 hiperglucémicos no-diabéticos y 26 normoglucémicos hipoproteinémicos).

El muestreo incluyó 16 bovinos, 12 equinos, 20 gallinas y 5 gatos, en todos los casos clínicamente sanos. Una alícuota de la sangre venosa extraída fue anticoagulada con EDTA y con el resto se obtuvo suero.

### TÉCNICAS DE LABORATORIO

HbA1c fue determinada por cromatografía "batch", donde la sangre hemolizada con un tensoactivo a base de azida se contacta con resinas de intercambio catiónico, las que fijan la Hb no-glicosilada, separable por sedimentación. En el sobrenadante queda la HbA1c, cuantificable espectrofotométricamente a 415 nm [32].

Fructosamina fue valorada por la técnica de reducción alcalina del azul nitrotetrazolio hasta formazano, cuantificándose fotocolorimétricamente a 546 nm utilizando calibradores y sueros

patrones de control de calidad (normales y patológicos) provistos por la empresa elaboradora [33].

Para el resto de las determinaciones se utilizaron técnicas clásicas: Hb (cianmetahemoglobina), proteínas totales (biuret) y glucosa (O-toluidina y glucosa-oxidasa) [32, 33], efectuándose las lecturas en un fotómetro Labora Mannheim 4010 digital, provisto de microprocesador y termostatizador, con cubetas de cuarzo semi-micro de 1 cm de paso de luz.

### MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los valores de individuos sanos fueron estudiados a efectos de constatar si mostraban distribución gaussiana de las frecuencias mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov; las estadísticas descriptivas y el análisis de la varianza paramétrica (ANOVA) se calcularon acorde con los métodos convencionales [34].

En las muestras de sujetos enfermos se empleó media aritmética ( $X$ )  $\pm$  desviación estándar (DE). La significación estadística fue considerada a partir de  $p < 0.05$ . El intervalo de referencia (rango que comprende el 95.44% de los valores estudiados) fue calculado a partir de  $X \pm DE$ .

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

HbA1c: la *Tabla 1* permite deducir que el intervalo de referencia de este analito en perros clínicamente sanos fue del 6.99 al 11.15% de la Hb total. No podemos discutir esta cifra por no haber hallado trabajos sobre HbA1c dosada por cromatografía "batch" en perros, pero sí podemos comparar los valores que obtuvimos en personas sanas (5.08 a 9.60%) con el rango humano reportado para dicha técnica: 6.60 a 8.60% [32] y 5 a 8% [4], los que resultaron muy aproximados entre sí.

población	n	HbA1c (%)	Hb (g/dl)	glucosa (g/l)
caninos sanos	37	9.07 $\pm$ 1.04	14.58 $\pm$ 0.32	0.86 $\pm$ 0.12
ref : humanos sanos	47	7.34 $\pm$ 1.13	15.10 $\pm$ 0.26	0.85 $\pm$ 0.09
ref : humanos diabéticos	19	13.64 $\pm$ 2.61	15.33 $\pm$ 0.29	2.41 $\pm$ 1.02
caninos diabéticos	4	19.48 $\pm$ 8.30	15.92 $\pm$ 0.41	12.98 $\pm$ 0.27

Por cromatografía de intercambio iónico otros autores obtuvieron en perros sanos niveles de HbA1c =  $7.1 \pm 1.1\%$  (rango: 5.1 a 9.7%) y en perros diabéticos: 14%, guarismos muy semejantes a los aquí obtenidos [35]. Otros reportaron niveles más bajos de HbA1c dosada por cromatografía en columna:  $4.35 \pm 0.82\%$  en sujetos sanos y  $8.4 \pm 1.73\%$  en diabéticos [5]. Las diferencias entre sexos y edades fueron no-significativas en nuestro ensayo.

Glucemias y hemoglobinemias totales de personas y caninos sanos encuadraron en rangos normales [36, 37], excluyendo probabilidades de hipo/hiperglucemias, así como anemia/hemoconcentración [5, 9].

En personas diabéticas la glucemia promedió  $2.41 \pm 1.02$  g/l y la HbA1c se elevó a  $13.64 \pm 2.61\%$ , en consonancia con las cifras de 8.4 a 16.0% citadas para estos casos [32]. Perros con diabetes mellitus arrojaron valores de glucemia de  $2.98 \pm 0.27$  g/l con incrementos de HbA1c a niveles de  $19.48 \pm 8.30\%$  y hemoglobina total ligeramente elevada, quizás por efecto de la deshidratación propia de esta afección [11, 36].

En gatos normales obtuvimos HbA1c =  $8.58 \pm 0.79\%$  y en gallinas aparentemente sanas =  $9.02 \pm 0.98\%$  (para glucemias de  $1.41 \pm 0.20$  g/l). Llama la atención que las aves, cuya glucemia es más elevada que la de los mamíferos [38], obtuvieran tasas de HbA1c similares a las del ser humano y los caninos; quizás ello pueda relacionarse a la escasa vida media de sus eritrocitos [14]. En seres humanos la HbA1c decrece cuando se reduce la vida media del glóbulo rojo [39]. En la diabetes mellitus ello sucedería por pérdida de la elasticidad de su membrana [1].

Fructosamina: la *Tabla 2* posibilita calcular el intervalo de referencia de este parámetro en suero de caninos normales, que resultó de 192.6 a 357.4  $\mu\text{mol/l}$  (distribución normal, kurtosis = -0.75, asimetría = 0.07). No hubo diferencias significativas entre sexos ( $p = 0.76$ ) ni edades ( $p = 0.27$ ). Proteinemias y glucemias fueron normales.

Nuestro intervalo de referencia resultó algo más amplio que el reportado para perros Beagle utilizando otro método de valoración de fructosamina (258.6 a 343.8  $\mu\text{mol/l}$ ) [22], diferencia quizás atribuible a la heterogeneidad de nuestra población. El límite máximo admisible citado por otros (350  $\mu\text{mol/l}$ ) [24] se acerca bastante al aquí obtenido (357.4  $\mu\text{mol/l}$ ). Con el mismo método de laboratorio, recientes investigaciones [16] permitieron constatar distribución no-paramétrica de los valores de fructosamina en una población heterogénea de caninos europeos, con niveles individuales entre 187 y 386  $\mu\text{mol/l}$  (mediana = 312  $\mu\text{mol/l}$ ), los que resultan similares a los emergentes de este trabajo (198 a 351  $\mu\text{mol/l}$ ).

La media aritmética de fructosamina obtenida en seres humanos sanos ( $283.1 \pm 78.1$   $\mu\text{mol/l}$ ) coincide con el límite máximo estipulado por la medicina humana (285  $\mu\text{mol/l}$ ) [33], e indica que nuestros valores resultaron sensiblemente más altos y dispersos, efecto quizás debido a que se trataba de una población de ancianos, donde las seroproteínas glicosiladas podrían ser más elevadas por la deficiente regulación glucémica propia de la senectud [40]. Contrariamente, los valores de fructosamina parecen ser más bajos en la infancia y en el embarazo humanos [3, 41], aunque en algunos trabajos no se hallaron diferencias debidas a la edad (15 a 35 años) ni al sexo [42].

Tabla 2: Valores obtenidos para fructosamina, proteínas totales y glucosa sérica ( $\bar{X} \pm \text{DE}$ )

población	n	fructosamina ( $\mu\text{mol/l}$ )	proteínas totales (g/dl)	glucosa (g/l)
caninos sanos	89	$275.0 \pm 41.2$	$7.22 \pm 0.26$	$0.89 \pm 0.07$
ref: humanos sanos	335	$283.1 \pm 78.1$	$7.13 \pm 0.46$	$0.90 \pm 0.12$
ref: humanos diabéticos	24	$564.9 \pm 100.2$	$7.63 \pm 0.35$	$2.04 \pm 0.49$
caninos diabéticos	3	$550.7 \pm 93.9$	$7.36 \pm 0.19$	$2.62 \pm 0.61$
caninos hiperglucémicos no - diabéticos	11	$279.2 \pm 48.6$	$6.89 \pm 0.21$	$1.26 \pm 0.10$
caninos normoglucémicos hipoproteinémicos	26	$183.1 \pm 53.5$	$5.66 \pm 0.13$	$0.92 \pm 0.17$

Con tenores normales de proteinemia, seres humanos y caninos afectados de diabetes mellitus incrementaron sus glucemias ( $2.04 \pm 0.49$  y  $2.62 \pm 0.61$  g/l respectivamente), con el consiguiente aumento de fructosamina, muy por encima del límite máximo del intervalo de referencia ( $564.9 \pm 100.2$  y  $550.7 \pm 93.9$  umol/l respectivamente). Otros investigadores denuncian, para perros diabéticos, niveles de fructosamina con medianas de 490 umol/l y máximas individuales de hasta 971 umol/l [16], así como medias de 600 umol/l y máximas individuales de 1242.9 umol/l [10]. Por el contrario, en perros hipoglucémicos (0.25 g/l) por hiperinsulinismo, fructosamina alcanzó niveles tan bajos como 147 umol/l [24].

En nuestra experiencia, caninos normoproteinémicos con hiperglucemia ( $1.26 \pm 0.10$  g/l) atribuible a stress, tratamientos con ACTH / glucocorticoides, fiebre, anestesia, cirugía o infecciones agudas, ostentaron concentraciones de fructosamina ( $279.2 \pm 48.6$  umol/l) prácticamente normales, confirmando que los cambios agudos o transitorios de la glucemia no afectan la tasa de glicosilación seroproteica, tanto en perros [15] como en gatos [17].

Perros normoglucémicos ( $0.92 \pm 0.17$  g/l) con hipoproteinemias ( $5.66 \pm 0.13$  g/dl) debidas a trastornos crónicos con albuminuria, insuficiencia hepática, desnutrición o neoplasias, mostraron concentraciones de fructosamina ( $183.1 \pm 53.5$  umol/l) por debajo del intervalo de referencia, corroborando que la disminución sostenida de proteínas plasmáticas reduce el valor de fructosamina [20].

Los escasos gatos aquí encuestados revelaron niveles de fructosamina  $m = 238.4$  umol/l (glucemia = 0.83 g/l), que resultan encuadrados en los intervalos de referencia reportados en otras investigaciones: 146 a 271 umol/l [19] y 221 a 341 umol/l [17]. Gatos diabéticos (glucosa media = 3.48 g/l) incrementarían la tasa de glicosilación proteica hasta niveles de 820 umol/l [17]. Para el bovino, otros autores reportan valores normales de fructosamina entre 213.4 y 265.0 umol/l, sin constatar cambios atribuibles al ritmo circadiano ni a las variaciones transitorias de la glucemia [23].

## CONCLUSIÓN

El diagnóstico de diabetes mellitus en medicina veterinaria continúa basándose en la triada poliuria-polidipsia-polifagia y los hallazgos de hiperglucemia, glucosuria y anormalidad de la

prueba de tolerancia a la glucosa, raramente midiendo la insulinemia [20, 21, 36, 38]. Algunos de estos signos pueden deberse a otras causas, como afecciones renales, hepatobiliares, endometritis, hipercortisolismo, stress y acciones medicamentosas [20].

En el Servicio de Análisis Clínicos anexo a la Cátedra de Fisiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNNE), tras 20 años de labor (1977-1997) y miles de animales analizados, únicamente constatamos diabetes mellitus en no más de una decena de ocasiones y siempre en perros. Esta prevalencia está muy por debajo de la reportada a nivel internacional (1.5%) [20]. La reticencia del veterinario clínico hacia las determinaciones de laboratorio, sumada a la insolvencia monetaria de los propietarios, quizás provoque que esta endocrinopatía, la más común en el perro, no sea debidamente diagnosticada y tratada.

Las proteínas glicosiladas, ya sean de mediano plazo (fructosamina) o largo plazo (HbA1c), poseen un gran potencial para evaluar retrospectivamente el metabolismo hidrocarbonado de los animales domésticos. Falta aún investigar los cambios fisiopatológicos hallados en seres humanos, como la gestación [41, 43], la raza [44], la obesidad [45], ingestión de vitamina C [10], hipertensión arterial [46] e interferencias por hemoglobinopatías [5], estableciendo luego ventajas y limitaciones de cada determinación [47, 48, 49, 50] a efectos de no descartarlas como herramientas diagnósticas. •

COPPO, J. A. / Profesor Titular, Cátedras de Fisiología General (UNaM) y Fisiología Humana (UNNE). COPPO, N. B. / Profesora Adjunta, Cátedras de Fisiología General (UNaM) y Fisiología Veterinaria (UNNE).

## AGRADECIMIENTOS

A las empresas Wiener SRL y Boehringer de Argentina (División Diagnóstica) por su constante apoyo. A la Lic. Lucrecia Felquer (INICNE) por revisar el summary.

## REFERENCIAS

1. REBOLLEDO, O. R. Aspectos bioquímicos de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 20: 365-393. 1986.
2. ACTIS DATO, S. M. Alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas en la diabetes

- mellitus y en la obesidad. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 22: 359-378. 1988.
3. ACTIS DATO, S. M.; REBOLLEDO, O. R. Avances en la valoración de fructosamina: ventajas de un nuevo equipo diagnóstico aplicado a estudios poblacionales. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 25: 391-402. 1991.
  4. BERMÚDEZ, M. C.; REBOLLEDO, O. R. Valoración de las proteínas glicosiladas del suero como índice retrospectivo del control glucémico. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 22: 279-288. 1988.
  5. GONZÁLEZ, S.; TOMIO, J. M. Separación y cuantificación de HbA. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 14: 427-434. 1980.
  6. TRETON, J. A.; COURTOIS, Y. Biomarkers of aging. *Ann. Biol. Clin.* 48: 319-322. 1990.
  7. MCCARTHY, A. D. Glicosilación no enzimática de proteínas: su rol en las complicaciones crónicas de la diabetes y el envejecimiento. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 29: 173-190. 1995.
  8. ARDAWI, M. S.; NASRAT, H. A.; BAHNASSY, A. A. Serum immunoglobulin concentrations in diabetic patients. *Diab. Med.* 11: 384-387. 1994.
  9. BORDAS FONDREDE, M.; SAUSER, E.; JARDEL, C.; JAUDON, M. C.; THERVET, F.; ROTTEBOURG, J.; DELATTRE, J. Protéines glyquées plasmatiques dans l'insuffisance rénale chronique. *Ann. Biol. Clin.* 48: 717-720. 1990.
  10. JENSEN, A. L. Glycated blood proteins in canine diabetes mellitus. *Vet. Rec.* 137: 401-405. 1995.
  11. ERRECALDE, J. O.; GIORDANI, C. Insulina: aspectos fisiológicos. *Therios* 6: 25-34. 1985.
  12. HILL, R. P.; MCKENZIE, I.; BUSHBY, P.; ORWYN, P.; LLOYD, R. H.; SANDS, K. A. Changes in fructosamine and haemoglobin A1 in patients with microalbuminuria and poor diabetic control. *Anales XV Congreso Internacional de Química Clínica, Melbourne.* 1993.
  13. PENHOS, J. C. La medición de las hemoglobinas glicosiladas en la diabetes mellitus. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 18: 3-12. 1984.
  14. JAIN, N. C. *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th. edn, Lea & Febiger, Philadelphia. 1986.
  15. JENSEN, A. L. Serum fructosamine in canine diabetes mellitus. An initial study. *Vet. Res. Comm.* 16: 1-9. 1992.
  16. REUSCH, C.; HOYER-OTT, M. Zur bedeutung der fructosamin-bestimmung in der uberwachung des diabetes mellitus. I: Hunden. *Kleintierpraxis* 40: 85-94. 1995.
  17. REUSCH, C.; KIRSCH, M.; VOCHERZER, R. Zur bedeutung der fructosamin-bestimmung in der uberwachung des diabetes mellitus. II: Katzen. *Kleintierpraxis* 40: 95-100. 1995.
  18. GRONBAEK, H.; NIELSEN, B.; OSTERBY, R.; HARRIS, A.; ORSKOV, H.; FLYVBJERG, A. Effect of octreotide and insulin on manifest renal and glomerular hypertrophy and urinary albumin excretion in long-term experimental diabetes in rats. *Diabetol.* 38: 135-144. 1995.
  19. THORESEN, S. I.; BREDAL, W. P. Determination of a reference range for fructosamine in feline serum samples. *Vet. Res. Comm.* 19: 353-361. 1995.
  20. JENSEN, A. L. Various protein and albumin corrections of the serum fructosamine concentration in the diagnosis of canine diabetes mellitus. *Vet. Res. Comm.* 17: 13-23. 1993.
  21. JENSEN, A. L. Serum fructosamine as a screening test for diabetes mellitus in non-healthy middle-aged to older dogs. *J. Vet. Med. Assn.* 41: 480-484. 1994.
  22. JENSEN, A. L.; AAES, H. Reference interval and critical difference for canine serum fructosamine concentration. *Vet. Res. Comm.* 16: 317-325. 1992.
  23. JENSEN, A. L.; PETERSEN, M. B.; HOUE, H. Determination of the fructosamine concentration in bovine serum samples. *J. Vet. Med. Assn.* 40: 111-117. 1993.
  24. THORESEN, S. I.; ALEKSANDERSEN, M.; LONAAS, L.; BREDAL, W. P.; GRONDALEN, J.; BERTHELESEN, K. Pancreatic insulin-secreting carcinoma in a dog: fructosamine for determining persistent hypoglycaemia. *J. Small Anim. Pract.* 36: 282-286. 1995.
  25. COPPO, J. A.; SANDOVAL, G. L.; TUCKEY, B. E.; REYES, A. D.; SCORZA, S. H.; TERRAES, J. C. Valores de referencia para hemoglobina glicosilada. *Rev. Fac. Vet. Maracay (Venezuela)* 32: 77-89. 1985.
  26. COPPO, J. A.; SANDOVAL, G. L.; SCORZA, S. H.; TERRAES, J. C. Hemoglobina glicosilada en el canino normal y diabético. *Anales del X Congreso Panamericano de Veterinaria, Buenos Aires.* 1985.
  27. COPPO, J. A.; LÓPEZ, J. A.; SANDOVAL, G. L.; SCORZA, S. H. Diabetes mellitus canina: variaciones de la glucohemoglobina y evaluación bioquímica de la respuesta a la insulino terapia. *Anales IX Sesión Comunic. Científ. FCV-UNNE, Corrientes.* 1990.
  28. COPPO, J. A.; COPPO, N. B.; BÁEZ, M. C.; SERRANO, C. P.; CRISTALDO, D. O.; CARDOZO, S.

- Niveles de fructosamina en población geriátrica clínicamente sana del nordeste argentino. *Anales del III Congreso Argentino de Bioquímica Clínica*, Buenos Aires. 1995.
29. COPPO, J. A.; COPPO, N. B. Serum fructosamine: reference interval for a heterogeneous canine population (*Vet. Res. Comm.*, en prensa). 1996.
30. COPPO, J. A.; SANDOVAL, G. L. Índices aterogénicos en la población de las ciudades de Resistencia y Corrientes. *La Semana Médica* 174: 123-129. 1990.
31. COPPO, J. A.; COPPO, N. B.; CRISTALDO, D. O.; SERRANO, C. P.; CARDOZO, S.; BÁEZ, M. C.; ALEGRE, H. M. Valores hematológicos y bioquímicos en población geriátrica de Resistencia y Corrientes. *Anales del II Congreso Nacional de Bioquímica*, Posadas. 1993.
32. WIENER S.R.L. Gluco-Hb, determinación por cromatografía "batch" (Rosenthal, P.K.: *Am. J. Clin. Pathol.* 75: 45-51, 1981). En: *Manual de Procedimientos Analíticos*, Rosario. 1984.
33. BOEHRINGER MANNHEIM S.A. Fructosamina: adaptación del método NBT (Johnson, R.N.; Metcalf, P.A.; Baker, J.R.: *Clin. Chem. Acta* 127: 87-95, 1982). En: *Metódicas de Trabajo para análisis manuales*, Buenos Aires. 1991.
34. STEEL, R. G.; TORRIE, J. H. *Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach*. 2nd. edn, McGraw-Hill, New York. 1992.
35. EASLEY, J. R. Glycosylated haemoglobin in dogs: precision, stability, and diagnostic utility. *Vet. Clin. Pathol.* 15: 12-15. 1986.
36. COLES, E. H. *Veterinary Clinical Pathology*, 4th. edn., Saunders, Philadelphia. 1986.
37. PESCE, A. J.; KAPLAN, L. A. *Química Clínica, Métodos*. 1ra. edn, Panamericana, Buenos Aires. 1990.
38. KANEKO, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th. edn, Academic Press, San Diego. 1989.
39. MARTINA, W. V.; MARTIJN, E. G.; MOLEN, M.; SCHERMER, J. G.; MUSKIET, F. A. Beta-N-terminal glycohemoglobins in subjects with common hemoglobinopathies: relation with fructosamine and mean erythrocyte age. *Clin. Chem.* 39: 2259-2265. 1993.
40. DYBKAER, R.; LAURITZEN, M.; KRAKAUER, R. Relative reference values for clinical chemical and haematological quantities in healthy elderly people. *Acta Med. Scand.* 209: 1-9. 1981.
41. VERMES, I.; ZEYEN, L. J.; VAN ROON, E.; BRANDTS, H. The role of serum fructosamine as a screening test for gestational diabetes mellitus. *Horm. Metab. Res.* 21: 73-76. 1989.
42. SCOCCIA, A. E.; GARDENAL, L. M.; BALLERINI, H. D.; FERRAROTTI, N. F.; GONZÁLEZ, M. B.; LAFUENTE, D. M.; MARCOS, C. Y.; MINERVINI, M. V. Estimación de proteínas séricas glicosiladas por reducción del NBT en medio alcalino. *Acta Bioq. Clín. Lat.* 25: 141-149. 1991.
43. ROSIC, B.; JEVREMOVIC, M.; MILACIC, D.; GLIGOROVIC, S.; STOJANOV, M.; LJUBIC, A.; TERZIC, M. Correlation of glycosylated hemoglobin and fructosamine in pregnant women with diabetes mellitus. *Srp. Arh. Celok. Lek.* 121: 17-19. 1993.
44. SIMMONS, D. Differences in umbilical cord insulin and birth weight in non-diabetic pregnancies of women from different ethnic groups in New Zealand. *Diabetol.* 37: 930-936. 1994.
45. ARDAWI, M. S.; NASRAT, H. A.; BAHNASSY, A. A. Fructosamine in obese normal subjects and type II diabetes. *Diab. Med.* 11: 50-56. 1994.
46. BILGIN, R.; DONMA, O.; SAGLIKER, Y. Glucose, glycated haemoglobin and fructosamine levels in essential hypertension. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31: 1129-1133. 1993.
47. FURUSETH, K.; BRUUSGAARD, D.; RUTLE, O.; VAALER, S. Fructosamine cannot replace HbA1c in the management of type II diabetes. *Scand. J. Prim. Health Care* 12: 219-224. 1994.
48. ISLAM, N.; AKHTER, J.; KAYANI, N.; KHAN, M. A. Fructosamine: an alternative assessment of past glycaemic control in developing countries. *J. Pak. Med. Assoc.* 43: 238-240. 1993.
49. SHIELD, J. P.; POYSER, K.; HUNT, L.; PENNOCK, C. A. Fructosamine and glycated haemoglobin in the assessment of long term glycaemic control in diabetes. *Arch. Dis. Child.* 71: 443-445. 1994.
50. WOOD, P. A.; SMITH, J. E. Glycosylated hemoglobin and canine diabetes mellitus. *J. Am. Vet. Med. Assn.* 176: 1267-1268. 1980.