



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpm1@sbpc.org.br, adagmar.andriolo@gmail.com

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Santos Menezes, Maria das Graças; Couto, Fábio David; Santos Junior, Lázaro Silveira; Adorno, Elisângela Vitória; Gomes Barbosa, Cynara; de Souza Gonçalves, Marilda; Couto, Ricardo David

Determinação de HbA1c por CLAE: interferência de variantes de hemoglobinas S e C e alta concentração de HbF

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 48, núm. 5, outubro, 2012, pp. 337-344

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541968006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Determinação de HbA1c por CLAE: interferência de variantes de hemoglobinas S e C e alta concentração de HbF

Primeira submissão em 14/01/12
Última submissão em 30/01/12
Aceito para publicação em 09/05/12
Publicado em 20/10/12

HbA1c determination by HPLC: interference of hemoglobin variants HbS, HbC and HbF high concentration

Maria das Graças Santos Menezes¹; Fábio David Couto²; Lázaro Silveira Santos Junior³; Elisângela Vitória Adorno⁴; Cynara Gomes Barbosa⁵; Marilda de Souza Gonçalves⁶; Ricardo David Couto⁷

unitermos	resumo
Hemoglobina glicada	<p>Introdução: O diabetes <i>mellitus</i> (DM) é considerado um problema importante de saúde pública; possui prevalência elevada e nos últimos anos observa-se aumento progressivo na sua incidência. Objetivo: verificar possíveis variações na concentração de hemoglobina (Hb) glicada (HbA1c) na presença de Hbs S e C e avaliar o impacto da redução da HbA1c na avaliação clínica e no monitoramento do paciente diabético. Material e métodos: Foram incluídos no estudo, 150 indivíduos diabéticos oriundos da cidade de Salvador, Bahia, de ambos os gêneros, com idade média de 56 anos. Foram determinadas a glicemia de jejum e a HbA1c por metodologia de oxidase-peroxidase e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), respectivamente. Resultados: Foram observadas variações na concentração da HbA1c em função da presença de variantes de Hb, como 7,85%, AA; 7,30%, AS e 7,15%, AC. Discussão e conclusão: A metodologia analítica a ser utilizada para determinação de HbA1c deve ser escolhida com base nas características gerais da população atendida e nas comorbidades associadas, pois a presença de Hbs S e C ocasiona reduções significativas de glicação. Essa redução pode levar a interpretações clínicas inadequadas relativas ao controle glicêmico dos pacientes.</p>
Hemoglobina variante	
Interferência metodológica	
CLAE	

abstract	key words
<p>Introduction: Diabetes mellitus (DM) is considered an important public health problem. It is highly prevalent and its incidence has progressively increased in recent years. Objective: To verify possible variations of glycated hemoglobin (HbA1c) concentration in the presence of Hb S and Hb C and to evaluate the impact of HbA1c reduction on clinical evaluation and monitoring of diabetic patients. Material and methods: This study comprised 150 diabetic individuals from Salvador city, Bahia, from both genders and average age of 56 years old. Fast blood glucose and HbA1c were determined by oxidase-peroxidase and high-performance liquid chromatography (HPLC) methods, respectively. Results: There were variations in the concentration of HbA1c in the presence of hemoglobin variants such as AA (7.85%), AS (7.30%), and AC (7.15%). Discussion and conclusion: The analytical method used to determine HbA1c needs to be chosen according to the general population characteristics and associated comorbidities, since the presence of hemoglobin S and C causes significant reductions in hemoglobin glycation, which may lead to clinical misinterpretation of patients' glycemic control.</p>	<p>Glycated hemoglobin</p> <p>Variant hemoglobin</p> <p>Methodological interference</p> <p>HPLC</p>

1. Especialista em Análises Clínicas; farmacêutica bioquímica pela Universidade Federal da Bahia (UFBA).

2. Doutor em Patologia Humana; professor adjunto I de Biologia Molecular e Genética do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCAAB/UFRB).

3. Habilitação em Análises Clínicas e Saúde Pública; farmacêutico bioquímico do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFBA (setor de Bioquímica Clínica).

4. Doutora em Patologia Humana; professora adjunta I de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFBA.

5. Doutora em Patologia Humana; professora Adjunta I de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFBA.

6. Pós-doutora em Genética Médica Antropológica e Molecular; professora associada III de Hematologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFBA; pesquisadora titular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CpQGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)-BA.

7. Pós-Doutor em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa; professor adjunto IV de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFBA; coordenador dos Laboratórios dos Hospitais da UFBA.

Introdução

O diabetes *mellitus* é uma doença crônica caracterizada por estados hiperglicêmicos, que requer cuidados médicos constantes e educação dos pacientes para o automonitoramento, a fim de prevenir complicações agudas e reduzir o risco a longo tempo. O cuidado com o diabetes é complexo e remete a várias especialidades médicas e condições que vão além do controle glicêmico⁽¹⁷⁾. Aproximadamente 30% das pessoas com diabetes permanecem não diagnosticadas e destas, mais de 25% já apresentam complicações microvasculares quando descobrem a doença⁽⁴⁾. A Associação Americana de Diabetes (ADA)⁽¹⁶⁾ recomenda a triagem de adultos assintomáticos a partir dos 45 anos, especialmente entre aqueles que apresentam sobrepeso, índice de massa corpórea (IMC) maior ou igual a 25 kg/m². Se os resultados dos exames de apoio diagnóstico forem normais, as avaliações devem ser realizadas em intervalos de três anos, ou com maior frequência em função de valores elevados de glicose plasmática de jejum (GPJ), presença de marcadores e fatores de risco associados^(4, 17). Atualmente, o monitoramento laboratorial do diabetes vem sendo realizado com a utilização de marcadores para acompanhamento, como glicemia de jejum, glicemia aleatória, pós-prandial, produtos de glicação proteica (frutossamina, hemoglobina [Hb] glicada e, mais recentemente, *advanced glycated products* [AGES]), além da determinação do perfil lipídico, urina tipo I e monitoramento das funções renal, hepática e, em alguns casos, tireoidiana⁽¹⁷⁾. É óbvio que a análise integrada/global do paciente diabético depende também da presença de comorbidades associadas que devem ser consideradas durante a avaliação, como disfunções hepáticas, renais, Hb F em alta concentração e presença de variantes de Hb C e S que podem, em função da sua concentração ou crises (sequestro esplênico ou hemolíticas), alterar o percentual de Hb glicada, conduzindo a uma interpretação clínica inadequada. Desconsiderar esses fatores pode resultar em correlação equivocada entre HbA1c e glicemia plasmática média⁽²¹⁾. Existem cerca de 20 métodos que são mais frequentemente utilizados para a determinação da HbA1c. Esses métodos podem ser afetados pela presença de variantes de Hb, como HbC, HbS, HbE ou HbD, e por altas concentrações de HbF (considerada variação metodológica > 7% para HbA1c de 6% e/ou 9%); destes, pode-se citar: Abbott Architect/Aeroset, Bayer A_{1c}Now e Beckman AU Systems; todos esses sofrem interferência com a presença de HbC e HbS; Bio-Rad *in2it* para a presença de HbC e HbE e Bio-Rad Variant II turbo para presença de HbE

e HbD. Bio-Rad D10 (A_{1c} program) e Bio-Rad variant II NU para HbF > 10%, Bio-Rad variant II turbo para HbF > 5% e turbo 2.0 para HbF > 25%. Para os métodos imunoquímicos específicos utilizados nos sistemas diagnósticos Axis-Shield Afinion, Beckman Synchron System, Ortho-Cinical Vitros, Roche Cobas Integra Gen2 e Roche/Hitachi (Tina Quant II), as variações foram indicadas apenas para a presença de HbF superior a 10%-15% (<http://www.ngsp.org/interf.asp>)⁽¹⁵⁾. Atenção maior é observada em regiões com prevalências elevadas para os alelos variantes da Hb, como as S e C⁽²⁰⁾. Os indivíduos heterozigotos para HbS (AS) têm hemácias com aproximadamente 20% a 45% de Hb variante e os indivíduos que apresentam a forma homozigótica do alelo para HbS (SS), portadores de anemia falciforme, contêm 80% ou mais de HbS^(5, 8, 14, 23, 24). Na Bahia, a prevalência da doença falciforme é a mais elevada do país. Azevedo *et al.*⁽³⁾ descreveram 7,4% de heterozigotos AS em um grupo de 1.200 alunos de escolas públicas e demonstraram que as frequências dos alelos para Hbs variantes aumentam de brancos a negros e se mantêm de forma balanceada entre mulatos claros, médios e escuros. Adorno *et al.*⁽¹⁾ realizaram um estudo em 590 recém-nascidos em Salvador-BA e encontraram 57 (9,8%) indivíduos fenótipo (F) AS; 36 (6,5%) FAC; cinco (0,9%) FSC; e um (0,2%) FS. Couto *et al.*⁽⁶⁾ encontraram, também em Salvador-BA, 60 (7,9%) indivíduos com perfil FAS; 30 (3,9%) FAC; seis (0,8%) FSC e um (0,1%) FS entre 763 recém-nascidos. O Brasil apresenta miscigenação racial elevada de aproximadamente 97%, resultado do processo migratório de mais de cinco milhões de pessoas de nacionalidades diversas entre os anos de 1750 e 1850⁽²⁾, com participação expressiva de genes africanos devido ao fluxo contínuo do tráfico de escravos trazidos da África entre os séculos XVI a XIX⁽¹⁰⁾. Kirk *et al.*⁽¹²⁾ demonstraram diferenças entre os níveis séricos de HbA1c entre afrodescendentes, asiáticos, latinos e caucasianos não hispânicos.

Objetivos

Avaliar percentuais de glicação de Hb (HbA1c) em função da presença de Hbs A, S e C em pacientes diabéticos da cidade de Salvador-BA, atendidos em laboratórios clínicos do Sistema Universitário de Saúde da Universidade Federal da Bahia (SIUNIS/UFBA), com recursos do Sistema Único de Saúde (SUS), considerando a alta miscigenação racial e a elevada prevalência de Hbs variantes nessa população.

Material e métodos

Casuística

Foram coletadas entre maio e outubro de 2008 para avaliação laboratorial, 150 amostras de sangue periférico de pacientes diabéticos de ambos os gêneros, sendo 96 mulheres e 54 homens, com idade média de 56 anos. O estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Os pacientes foram selecionados por conveniência no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFBA, após explicação sobre a pesquisa e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Neste estudo, foram avaliados os resultados da determinação da glicemia de jejum, do cálculo de estimativas a partir da glicemia de jejum, da Hb glicada e de outras frações de Hb. Os critérios de inclusão foram ser paciente diabético (em utilização ou não de hipoglicemiantes via oral (VO) ou insulina) maior de 18 anos e assinar o TCLE; para exclusão, pacientes portadores de disfunções hepáticas e renais (agudas ou crônicas), em crise de sequestro eritrocitário e/ou hemolítico e não assinar o TCLE.

Metodologia

Para a determinação da glicemia de jejum, foram colhidas amostras de sangue periférico dos participantes entre 9 e 12 horas de jejum, em tubo sem aditivos, seguido de retração de coágulo e separação imediata de soro, a fim de evitar hemólise e redução da concentração de glicose na amostra. A glicemia foi medida utilizando a metodologia da Oxidase-Peroxidase (Biosystems®, Espanha), em equipamento automatizado – A25 Clinical Chemistry Analyzer (Biosystems®, Espanha). Para a obtenção da amostra de Hb glicada, o sangue foi colhido a vácuo, em tubos selados, contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) liofilizado como anticoagulante. As determinações da Hb glicada foram realizadas em tubo primário por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em equipamento D10 – Hemoglobin A_{1c} Testing System (Bio Rad®, França). A CLAE é uma metodologia de ponta padronizada para determinação de HbA1c, certificada pelo National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) com rastreabilidade de desempenho analítico aos métodos de referência do Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) e United Kingdom Prospective Diabetes Study Group (UKPDS)^(13, 16). O princípio baseia-se na separação cromatográfica de alta eficiência da HbA1c utilizando como fase estacionária uma coluna de troca iônica (catiônica, 4 mm × 30 mm).

A separação foi otimizada para minimizar as interferências da presença de variantes de Hbs, A1C lábil e Hb carbamilada⁽⁹⁾. As amostras foram recolhidas a partir de tubo primário, onde foram automaticamente diluídas e injetadas em coluna analítica. O D10 proporciona à coluna gradiente programado de tampão de força iônica crescente, sendo as Hbs separadas com base nas respectivas interações iônicas com o material da coluna. As Hbs separadas foram medidas na célula de fluxo óptico em função da absorção a 415 nm. O *software* analítico executou redução dos dados brutos recolhidos de cada análise, gerando relatório e cromatograma. Para cada amostra, a área da A1C foi calculada utilizando o algoritmo de Gauss exponencialmente modificado (EMG), que exclui a HbA1c lábil. Para quantificar os valores da HbA1c, foram utilizados calibradores rastreáveis em dois níveis. Essa metodologia supera as demais em função da pequena suscetibilidade a interferências decorrentes da presença de Hbs anômalas, inclusive sinalizando a presença destas⁽²²⁾. Os reagentes utilizados foram tampão de eluição 01 – tampão de bi/tri/fosfato, pH 6; tampão de eluição 02 – tampão bi/tri/fosfato, pH 6,7; e solução de lavagem/diluyente – água deionizada. Todos os reagentes contendo < 0,05% de azida sódica como conservante. Durante as determinações, foram feitas avaliações para a validação dos resultados e, quando necessário, as amostras foram analisadas por segunda metodologia (gel de troca catiônica em tubo) como diferencial. Os reagentes utilizados na segunda metodologia foram resina ligante – suspensão de resina de troca catiônica fraca, em tampão pH 7, ácido bórico a 150 mmol/l e azida sódica 0,1 g/dl; resina não-ligante – suspensão de resina de troca catiônica fraca, em tampão pH 8,5 e azida sódica 0,1 g/dl; hemolisante – solução hemolisante em tampão pH 6,9, ácido bórico a 1 mol/l, detergente não iônico a 0,25%, cianeto de potássio a 12 mmol/l e azida sódica a 0,1 g/dl. Para as determinações da HbA1c por gel de troca catiônica em tubo, foi utilizado o equipamento semiautomatizado Bio 2000 (BioSystems®, Espanha) (dados não mostrados). Realizou-se também, em alguns casos, como determinação discriminante, frutamina, Biosystems®, método cinético-colorimétrico (dados não mostrados). As determinações de frutamina foram realizadas a 530 nm, no equipamento A 25 Clinical Chemistry Analyzer (BioSystems®, Espanha). Os casos sugestivos de HbS, HbC e persistência hereditária de Hb fetal (PHHF) foram confirmados em equipamento Variant I (Bio Rad®, França) (Laboratório de Pesquisas em Anemias [LPA], Faculdade de Farmácia da UFBA).

Resultados

A **Tabela** apresenta a análise descritiva dos dados de perfil cromatográfico das frações de Hbs e glicemia de jejum obtidas das 150 amostras de sangue dos participantes do estudo.

A análise inferencial, comparativa, entre os dados de %HbA1c: AA, AS e AC obtidos das amostras de sangue dos 150 participantes do estudo, não foi significativa, $p > 0,05$ (análise de variância unilateral, *one-way analysis of variance* [ANOVA]). O teste de Bartlett não foi significativo, $p = 0,464$. Os casos avaliados como Hb AA foram considerados controles normais para as avaliações subsequentes. A análise inferencial das áreas totais dos cromatogramas das frações das Hbs mostrou-se estatisticamente significativa, $p = 0,0028$ (Kruskal-Wallis [KS] test, *nonparametric ANOVA*). Após análise de comparação múltipla (Dunn's multiple comparisons test) verificou-se que a área total de Hbs dos clientes com genótipo AA foi diferente de AS, $p < 0,01$, KS; por outro lado, não houve diferença entre as áreas totais para as bs AA e AC e AC e AS, $p > 0,05$. As diferenças médias observadas foram -26,526 entre AA e AS, $p < 0,01$; -20,869 entre AA e AC, $p > 0,05$ e 5,656 entre AS e AC, respectivamente, $p > 0,05$. Observa-se que as áreas percentuais de A1C apresentadas nas **Figuras 1a, 1b, 1c e 1d** são proporcionais à glicação nessas frações, considerando a presença (traços) de Hbs variantes. Nos casos raros em que há homozigose, por exemplo, HbSS e HbCC, ou dupla heterozigose "HbSC", em função da ausência de HbA, não houve A1C detectável.

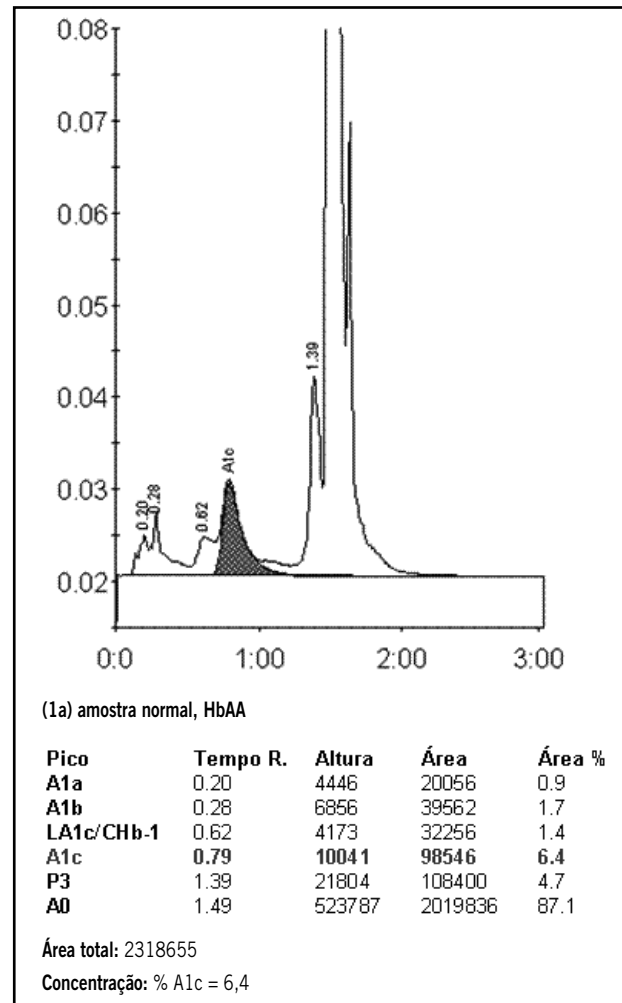


Figura 1a – Cromatograma de hemoglobinas glicadas e parâmetros de análise por CLAE, equipamento D10, Bio Rad; (a) normal. Pico de A1C mostrado em hachurado
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; R: retenção; P3: indicador de qualidade de amostra.

Tabela Análise descritiva de dados de HbA1c, área de Hb, % de área de Hb e glicemia de jejum associados ao perfil cromatográfico por HPLC dos clientes com genótipos de Hb AA, AS e AC obtidas das amostras de sangue total periférico dos 150 clientes participantes do estudo

Variáveis	(n)	Média	Mediana	Desvio padrão	EPM
A1c HbAA	78	8,05	7,85	1,92	0,21
Área HbAA	–	1768592,37	1729388	396034	44842
GJ HbAA	–	159	147	65,20	7,383
A1c HbAS	40	7,96	7,30	2,18	0,34
Área HbAS	–	2049242,17	2028470	482988	76367
GJ HbAS	–	155	132	80,14	12,67
% Área S	–	34,51	35,05	2,73	0,43
A1c HbAC	32	7,65	7,15	2,26	0,40
Área HbAC	–	2088948,25	1962029	772525	136564
GJ HbAC	–	153	133	81,46	15,97
% Área C	–	30,36	30,45	3,54	0,62

Hb: hemoglobina; HPLC: high-performance liquid chromatography; EPM: erro padrão da média; GJ: glicemia de jejum.

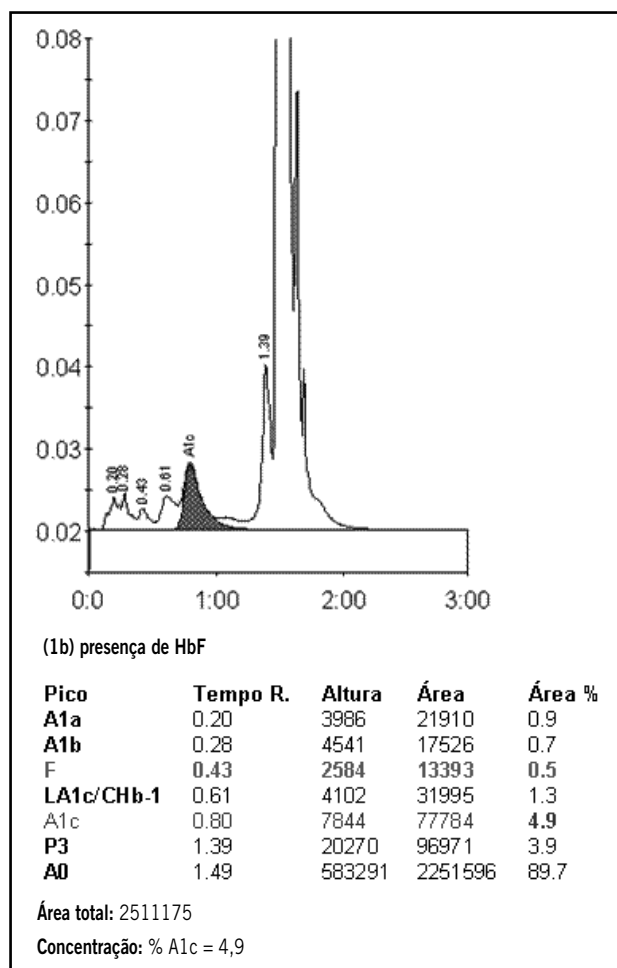


Figura 1b – Cromatograma de hemoglobinas glicadas e parâmetros de análise por CLAE, equipamento D10, Bio Rad; (b) presença de Hb fetal. Pico de A1C mostrado em hachurado

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; Hb: hemoglobina; R: retenção; P3: indicador de qualidade de amostra.

Durante a avaliação laboratorial das amostras dos participantes, três não incluídas na análise inferencial apresentaram perfil cromatográfico de Hb compatível com PHHF, um com 26,2% de HbF e hemoglobinopatia SC e dois com ausência completa de HbA1c. Na primeira situação, a glicação mostrou-se inferior ao valor esperado de 451 mg/dl, ou seja, 7,4% para glicemia de jejum de 322 mg/dl e pós-prandial (75 g dextrose a 25%, VO) após duas horas. A título de comparação, a glicemia plasmática média (GPM) pode ser estimada utilizando a fórmula de regressão: $GPM = 35,6 \times (\%HbA1c) - 77,3$, facilitando, assim, a comparação para verificação dos valores esperados de HbA1c. Neste estudo, utilizou-se a análise de regressão múltipla para criar modelos matemáticos explicativos a fim de comparar a concentração de glicemia de jejum com os percentuais de HbA1c obtidos a partir da análise das amostras dos pacientes com perfil HbAA, AS e AC.

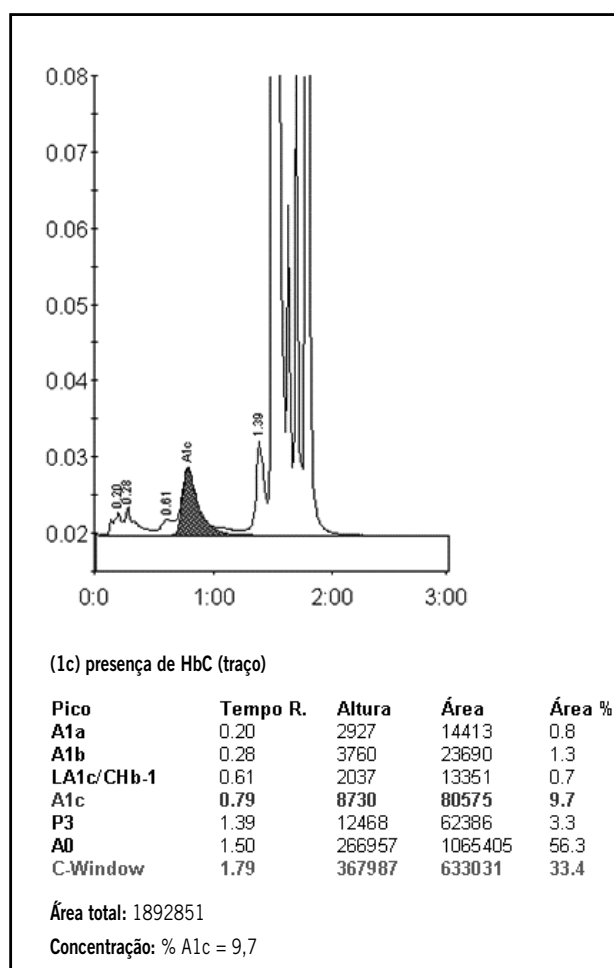


Figura 1c – Cromatograma de hemoglobinas glicadas e parâmetros de análise por CLAE, equipamento D10, Bio Rad; (c) presença de HbC (traço). Pico de A1C mostrado em hachurado

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; Hb: hemoglobina; R: retenção; P3: indicador de qualidade de amostra.

A análise inferencial do percentual das áreas das variantes S e C foi bastante significativa, $p < 0,0001$ (teste de Mann-Whitney). As medidas de centralidade e dispersão dos dados de área foram apresentadas na Tabela. As glicemias de jejum dos participantes, independente do perfil hemoglobínico das amostras, não foram diferentes, $p > 0,05$; ANOVA (Tabela). A análise de regressão múltipla dos dados mostrou modelos explicativos significantes para a variável dependente (HbA1c), independente da presença de variantes de Hb (traços). Para os clientes com genótipos de HbAA, o modelo matemático foi: $A1C = 4,941 + 0,01953 \times (GJ\ AA)$, com r^2 de 43,70%, $p < 0,0001$. Para HbAS: $A1C = 4,957 + 0,01926 \times (GJ\ AS)$, com r^2 de 49,76%, $p < 0,0001$. Para HbAC: $A1C = 4,438 + 0,01860 \times (GJ\ AS)$, com r^2 de 53,10%, $p < 0,0001$. Não foram observadas multicolinearidades. Os r^2 foram inferiores a 0,75%, ou seja, as variáveis (x) no modelo foram independentes.

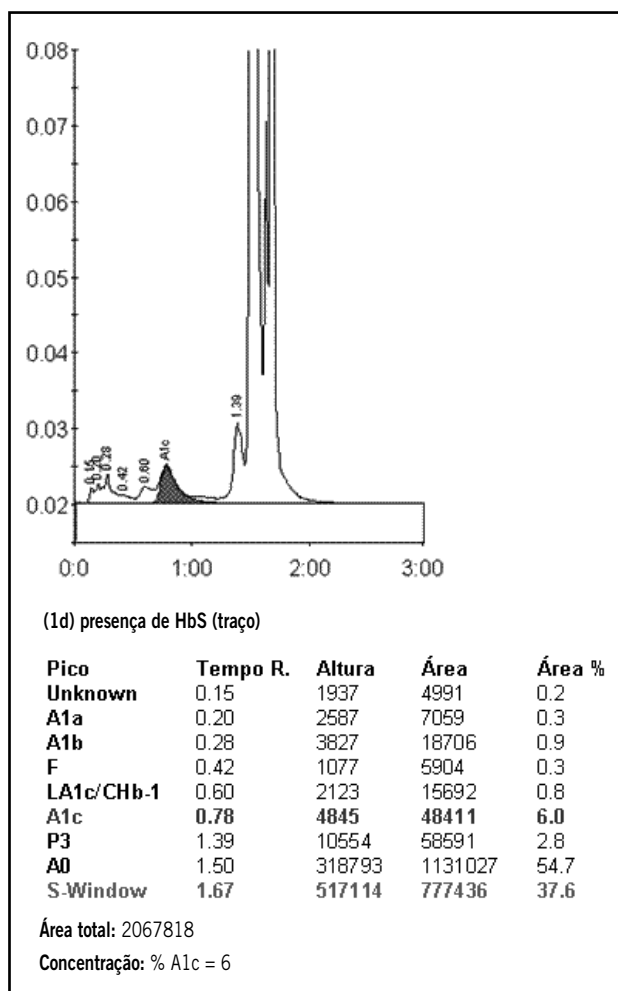


Figura 1d – Cromatograma de hemoglobinas glicadas e parâmetros de análise por CLAE, equipamento D10, Bio Rad; (d) presença de HbS (traço). Pico de A1C mostrado em hachurado

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; Hb: hemoglobina; R: retenção; P3: indicador de qualidade de amostra.

A análise de proporção dos perfis de Hbs na amostra estudada foi HbAA 52%, HbAS 26,7% e HbAC 21,3% do total de casos estudados. Os casos sugestivos de HbS, HbC e PHHF foram confirmados em equipamento Variant I (Bio Rad®, França) do LPA da Faculdade de Farmácia da UFBA.

Discussão

O advento tecnológico tem criado ferramentas cada vez mais eficientes para utilização diagnóstica. Neste estudo, verificamos os resultados da CLAE em relação aos cromatogramas obtidos para HbA1c na presença de Hbs variantes e PHHF, característica marcante na população de Salvador-BA. Embora a análise comparativa dos percentuais de HbA1c entre as amostras dos 150 participantes

com genótipos de HbAA, HbAS e HbAC não tenham sido estatisticamente significantes, $p > 0,05$ (ANOVA), a diferença observada entre média, mediana e intervalos de confiança (IC) mostraram reduções clinicamente importantes, pois cada 1% de HbA1c representa cerca de 35 mg/dl de glicose na glicemia média⁽¹⁷⁾. Esse achado demonstra a falsa redução/controle de aproximadamente 0,7% de HbA1c (24,5 mg/dl de glicose na glicemia média) entre os portadores do perfil de HbAC e 0,6% (21 mg/dl de glicose na glicemia média) entre os portadores de genótipo AS (Tabela), considerando o perfil AA como controle, referencial, e ausência detectável de crises de sequestro esplênico e/ou hemolíticas.

A análise das áreas totais dos cromatogramas das Hbs mostrou diferença percentual entre HbAS e HbAA ($p = 0,0028$), tendo áreas totais diferentes. Embora não tenham existido diferenças significativas entre as áreas totais de S e C, percentualmente, a quantidade de S foi maior do que a de C ($p < 0,0001$) para o grupo analisado (Tabela). As áreas percentuais de A1C obtidas no estudo foram proporcionais à glicação nessas frações, considerando a presença (traços) de Hbs variantes, ou seja, a glicação referida em termos de A1C pode, nos casos em que há redução dessa fração, trazer informações clinicamente contraditórias em relação à glicemia média, como nos casos em que há homozigose para HbS e HbC ou dupla heterozigose HbSC; nessas situações não há HbA1c detectável. Para a comparação entre percentual de HbA1c e GPJ, foi utilizado o mesmo modelo matemático de regressão para GPM: $35,6 \times (\%HbA1c) - 77,3^{(3, 11)}$. Segundo esse modelo, os casos de perfil cromatográficos compatíveis com PHHF (um) e hemoglobinopatia SC (dois) mostraram-se inferiores ao valor esperado, ou seja, HbA1c de 7,4% (percentual compatível com 186 mg/dl de glicemia média), glicemia de jejum de 322 mg/dl e pós-prandial de 451 mg/dl. Nesse caso, o percentual de HbF medido foi 26,2%, bem superior aos 10% testados na literatura técnica como limite superior para interferência⁽¹⁴⁾. Para os dois casos observados de HbSC, as análises mostraram ausência completa de HbA1c. Embora não contemplada no manual do equipamento (D10, Bio Rad®), as amostras dos participantes com genótipo HbSC também não possuem A1C detectável. Várias metodologias têm sido propostas para quantificação da HbA1c desde seu advento em 1978⁽⁷⁾, por isso deve ser feita a avaliação cuidadosa dos resultados obtidos em função de limitações do método diagnóstico utilizado. Os modelos de regressão obtidos a partir de cálculos matemáticos no estudo para estimar A1C a partir da GPJ foram (HbAA) $A1C = 4,941 +$

0,01953*(GJ AA), (HbAS) A1C = $4,957 + 0,01926*(GJ AS)$ e (HbAC) A1C = $4,438 + 0,01860*(GJ AS)$, comparados com o indicado pela ADA^(3, 11) para GPM: $35,6 \times (\%HbA1C) - 77,3$ ou, reescrevendo, HbA1c = $77,3 + 0,02808* (GPM)$, sem considerar a presença de Hbs variantes, que mostraram valores inferiores de GPM para percentuais de HbA1c entre 6% e 13% (dados não apresentados).

A discrepância observada entre os modelos surge basicamente da diferença entre as amostras utilizadas para observação da glicemia, ou seja, glicemia de jejum e GPM. Em geral, a concentração de glicose na GPM é maior, o que remete aos valores inferiores obtidos com os modelos matemáticos aqui sugeridos. Neste estudo, a glicemia de jejum entre os grupos HbAA, HbAS e HbAC não diferiu significativamente ($p > 0,05$), obtendo, assim, o necessário para verificar variações clinicamente importantes na utilização de HbA1c nos grupos estudados em função da presença de Hbs variantes S e C.

Conclusão

A prevalência elevada de Hbs variantes na população diabética atendida no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UFBA (HbAS 26,7% e HbAC 21,3% do total de casos estudados), serviço de atendimento diagnóstico gratuito do SUS, mostra a necessidade de alertar a comunidade médica, principalmente nos serviços públicos municipais, estaduais e federais, para avaliar cuidadosamente os resultados laboratoriais obtidos dessa população em função dos tipos de metodologias utilizadas para apoio diagnóstico, observação ratificada no posicionamento oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes, em 2009, e da ADA, em 2011⁽¹⁸⁾. Deve-se, ainda, considerar a presença de comorbidades associadas, como hepatopatias cursando com deficiência de síntese proteica, doenças renais com perda proteica e, principalmente, agregar à anamnese dados relativos às características étnicas e socioeconômicas da população atendida.

Referências

- ADORNO, E. V. *et al.* Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. *Cad Saúde Pública*, v. 21, p. 292-8, 2005.
- AZEVEDO, E. Historical note on inheritance of sickle cell anemia. *Am J Hum Genet*, v. 25, p. 457-8, 1973.
- AZEVEDO, E. S. *et al.* Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. *Am J Phys Anthropol*, v. 53, p. 509-12, 1980.
- BUELL, C. *et al.* Utility of A1C for diabetes screening in the 1999-2004 NHANES population. *Diabetes Care*, v. 30, p. 2233-5, 2007.
- CHANG, Y. P. *et al.* The relative importance of the X-linked FCP locus and beta-globin haplotypes in determining haemoglobin F levels: a study of SS patients homozygous for beta S haplotypes. *Br J Haematol*, v. 96, p. 806-14, 1997.
- COUTO, F. D. *et al.* C677T polymorphism of the MTHFR gene and variant hemoglobins: a study in newborns from Salvador, Bahia, Brazil. *Cad Saúde Pública*, v. 20, p. 529-33, 2004.
- ECKFELD, J. H.; BRUNS, D. E. Another step toward standardization of methods for measuring hemoglobin A1C. *Clin Chem*, v. 43, p. 1811-3, 1997.
- EMBURY, S. H. Sickle cell disease. In: HOFFMAN, R. *et al.* *Hematology*. 2. ed. New York: Churhill Livingstone, 1995. p. 611-40.
- FLÜCKIGER, R. *et al.* Hemoglobin carbamylation in uremia. *N Engl J Med*, v. 304, p. 823-7, 1981.
- FREYRE, G. *Casa-grande & senzala*. Introdução à história da sociedade patriarcal no Brasil. 40. ed. Rio de Janeiro: Record, 2000.
- Grupo interdisciplinar de padronização da Hemoglobina Glicada-A1C. Hemoglobina glicada. Posicionamento oficial (2009). Atualização sobre hemoglobina glicada (A1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais, 2009.
- KIRK, J. K. *et al.* Disparities in HbA1c levels between African-American and Non-Hispanic white adults with diabetes. *Diabetes Care*, v. 29, p. 2130-6, 2006.
- LITTLE, R. R. *et al.* Effects of blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. *Clin Chem*, v. 29, p. 1113-5, 1983.
- Manual de Instruções D-10 TM hemoglobin A1C program. UNITED STATES, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA 94547. FRANCE, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette. REF 220-0101, L20012103PT00, 22 p.
- NGSP. HbA1c Assay Interferences. HbA1c methods: effects of hemoglobin variants (HbC, HbS, HbE and HbD traits) and elevated fetal hemoglobin (HbF). Disponível em: <<http://www.ngsp.org/interf.asp>>. Acesso em: 26 mar. 2012.
- PANZER, S. *et al.* Glycosylated hemoglobins (GHb): an index of red cell survival. *Blood*, v. 59, p. 1348-50, 1982.
- Position Statement, American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes, *Diabetes Care*, v. 31, p. S12-S54, 2008.

18. Position Statement, American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes, *Diabetes Care*, v. 34, p. S11-S61, 2011.
19. Procedure Manual – IFCC Network of Reference Laboratories for HbA1c. Dr. Cas Weykamp, IFCC Network Coordinator. Disponível em: <<http://www.ifcchba1c.com>>. Acesso em: 25 fev. 2009.
20. ROBERTS, W. L. *et al.* Effects of sickle cell trait and hemoglobin C trait on determinations of HbA1c by an immunoassay method. *Diabetes Care*, v. 21, p. 983-6, 1998.
21. ROHLFING, C. L. *et al.* Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c: analysis of glucose profiles and HbA1c in the diabetes control and complications trial. *Diabetes Care*, v. 25, p. 275-8, 2002.
22. SCHNEDL, W. J. *et al.* Evaluation of HbA1c determination methods in patients with hemoglobinopathies. *Diabetes Care*, v. 23, p. 339-44, 2000.
23. SMITH, I. I. *et al.* Variable deformability of irreversibly sickled erythrocytes. *Blood*, v. 58, p. 71-7, 1981.
24. WEATHERALL, D. J.; PROVAN, A. B. Red cells. In: Inherited anaemias. *Lancet*, v. 355, p. 1169-75, 2000.

Endereço para correspondência

Ricardo David Couto
Laboratório de Bioquímica Clínica
Faculdade de Farmácia da UFBA
Campus Universitário de Ondina
Rua Barão de Geremoabo, S/N –
Ondina
CEP: 41170-290 – Salvador-BA