

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

A1C no diagnóstico do diabetes mellitus: fatores que afetam sua interpretação e sua relação com a doença renal

Tese de Doutorado

Gabriela Cavagnoli

Orientadora: Joiza Lins Camargo

Porto Alegre, Dezembro de 2014.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia
Doutorado

A1C no diagnóstico do diabetes mellitus: fatores que afetam sua interpretação e sua relação com a doença renal

Gabriela Cavagnoli

Orientadora: Joiza Lins Camargo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Endocrinologia.

Porto Alegre, Dezembro de 2014.

CIP - Catalogação na Publicação

CAVAGNOLLI, GABRIELA

A1C no diagnóstico do diabetes mellitus: fatores que afetam sua interpretação e sua relação com a doença renal / GABRIELA CAVAGNOLLI. -- 2014.

91 f.

Orientadora: JOIZA LINS CAMARGO.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Hemoglobina glicada. 2. Diabetes mellitus. 3. Fatores interferentes. 4. Doença renal. 5. Albuminúria. I. LINS CAMARGO, JOIZA, orient. II. Título.

"Noventa por cento do sucesso se baseia simplesmente em insistir."

(Woddy Allen)

AGRADECIMENTOS

À minha Mestre, Profa. Dra. Joíza Lins Camargo pela orientação deste trabalho e todos os conhecimentos que me foram transmitidos durante todos esses anos desde a minha Especialização. Agradeço pela disponibilidade de sempre, principalmente pela paciência que teve comigo nestes últimos dois anos, pela força incondicional que me deu quando pensei que eu não conseguiria concluir este trabalho. Muito obrigada por todos esses anos que convivemos juntas, compartilhando muitos momentos de risos e alguns de lágrimas. A admiração que tenho por você como profissional me inspirou e me fez crescer muito tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Você sempre foi e continuará sendo uma referência para mim.

À minha família por ser meu porto seguro e por me apoiar sempre em todas as etapas e decisões, principalmente nessa questão de formação. Agradeço também pela força e amor incondicional de sempre, principalmente nestes últimos dois anos que foram muito difíceis, mas que ao mesmo tempo consegui superar de maneira serena por ter vocês sempre presente mesmo estando longe. À minha mãe, por ter cuidado de mim da melhor maneira possível e por ser minha fortaleza, ficando ao meu lado diariamente nos momentos mais difíceis e sempre me transmitindo força e determinação para continuar e não desistir.

As queridas colegas Ana Laura Pimentel e Priscila Aparecida Correa Freitas, por ser meu braço direito, pela intensa dedicação neste trabalho colaborando no desenvolvimento das tarefas e pelo tempo dispensado à pesquisa. Agradeço pela amizade, força, carinho, compreensão que sempre me foi dada.

À amiga Flávia Moraes Silva, que foi um presente que eu ganhei com o ingresso neste programa. Obrigada pela amizade, carinho, compreensão, força e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos demais colegas do grupo Paula, Ana Paula, Alexandre que de alguma forma contribuíram para que eu conseguisse realizar este trabalho e pela força que recebi sempre.

À aluna de Iniciação Científica que realizou parte da coleta de dados Maira Chaiben, obrigada pelo carinho e dedicação.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio prestado durante a realização da coleta de dados do protocolo de pesquisa.

Aos funcionários do Serviço de Patologia Clínica pelos anos de convívio, aprendizado e amizade.

Aos funcionários da Zona14 que auxiliaram na coleta de alguns pacientes.

Aos pacientes que participaram do estudo, pela disponibilidade, pela colaboração e por contribuírem com a construção do conhecimento.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação e do Serviço de Endocrinologia pela disponibilidade e pelo auxílio prestado em todos os momentos necessários.

Aos amigos e familiares que estiveram do meu lado apoiando e dando força sempre, vocês foram essenciais na minha recuperação e na conclusão deste trabalho. Não tenho como

citar nomes, pois são muitos, mas cada um de vocês, de uma forma muito particular, contribuiu muito com cada passo novo e cada conquista. Obrigada por cada gesto, palavra, carinho e pelos momentos especiais vividos com cada um de vocês. Vocês ocupam um espaço muito especial no meu coração!!!

SUMÁRIO

RESUMO	8
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
JUSTIFICATIVA	22
CAPÍTULO I	23
Potential factors affecting A1C values: a systematic review and meta-analyse	23
CAPÍTULO II	48
Efeito da etnia nos níveis de A1C em indivíduos sem diabetes mellitus: uma revisão sistemática e metanálise	48
CAPÍTULO III	74
A1C e prevalência de doença renal do diabetes do momento do diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

FORMATO DA TESE DE DOUTORADO

A presente tese de doutorado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, sendo apresentada através de uma fundamentação teórica e três manuscritos originais acerca do tema estudado:

1. Artigo original referente à revisão sistemática com meta-análise de estudos observacionais sobre o efeito da anemia, hemoglobinas variantes e uremia nos resultados da A1C.
2. Artigo original referente à revisão sistemática com meta-análise de estudos observacionais sobre o efeito das diferentes etnias nos resultados da A1C.
3. Artigo original referente a estudo transversal sobre a associação da albuminúria elevada com os níveis de A1C no momento do diagnóstico do diabetes.

Resumo

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que afeta aproximadamente 382 milhões de pessoas. Atualmente, o diagnóstico de DM é baseado nos resultados dos testes da hemoglobina glicada (A1C), além dos testes baseados em glicemia. Estes testes identificam grupos diferentes de pacientes e aqueles identificados pela A1C parecem ter um perfil mais desfavorável às complicações do que os identificados pelos testes de glicemia. No entanto, o uso da A1C apresenta algumas limitações e tem sido questionada como teste de escolha para o diagnóstico de DM devido a fatores que afetam a sua interpretação. A anemia pode ocasionar aumento ou diminuição dos níveis da A1C, devido à alteração no tempo de meia vida das hemácias. Hemoglobinopatias e a hemoglobina carbamylada podem aumentar ou diminuir os valores da A1C. Recentemente, estudos demonstraram que existe diferença nos níveis de A1C entre as etnias, a qual parece ser independente das alterações glicêmicas ou hematológicas. Neste trabalho analisamos a influência de possíveis fatores que podem afetar os níveis de A1C em adultos sem DM através de revisão sistemática e metanálise. Avaliamos também a associação dos níveis de A1C com os níveis de albuminúria e prevalência de DRD no momento do diagnóstico do DM tipo 2 em estudo transversal.

Nossos resultados mostraram que os efeitos da HbAS e uremia sobre os níveis de A1C em indivíduos sem DM estão dentro da variação individual esperada, e não devem afetar a interpretação dos resultados de A1C para diagnosticar DM. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos da anemia por deficiência de ferro e/ou deficiência de ferro nos níveis de A1C. Também demonstramos que os níveis de A1C são diferentes entre negros, asiáticos e latinos quando comparados com brancos na ausência de DM. Estas diferenças são relevantes quando se considera o uso da A1C como critério diagnóstico utilizando apenas um ponto de corte para todas as populações, sem considerar a origem étnica. Em relação à associação da A1C com DRD, nossos dados mostraram que indivíduos com maiores níveis de A1C tem um perfil renal desfavorável. No entanto, tanto A1C como os testes baseados na glicemia apresentam baixo desempenho para identificar pacientes com albuminúria elevada.

Palavras Chaves: Hemoglobina glicada, anemia, uremia, hemoglobinopatias, etnia, doença renal do diabetes, albuminúria.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica com alto índice de morbidade e mortalidade, sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública do século 21, afetando aproximadamente 382 milhões de pessoas. De acordo com dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF), existe aproximadamente, 316 milhões de pessoas com intolerância à glicose. Estima-se que em 2035, os casos de DM tipo 2 (DM2) aumentarão para 592 milhões de indivíduos com DM [1].

Atualmente, o diagnóstico de DM é baseado nos resultados dos testes hemoglobina glicada (A1C) $\geq 6,5\%$, glicemia de jejum (GJ) ≥ 126 mg/dL e/ou a glicemia após 2h da ingestão de 75g de glicose (G2h) ≥ 200 mg/dL, após o teste oral de tolerância a glicose (TOTG) [2,3].

Há mais de três décadas, a A1C é usada como medida de referência para o controle glicêmico do DM e é reconhecida como fator predito de complicações crônicas [4-7]. O teste deve ser realizado regularmente em todos os pacientes em intervalos de 4 a 6 meses. Sendo que este intervalo deve ser menor para aqueles pacientes que não atingem o controle glicêmico desejável [2,3].

O ponto de corte de A1C $\geq 6.5\%$ (48 mmol/mol) é considerado diagnóstico para DM. No entanto, estudos mostram que apesar da alta especificidade, este ponto possui baixa sensibilidade para o diagnóstico, e o uso isolado da A1C no diagnóstico do DM tem sido questionado [8-11].

Por outro lado, a vulnerabilidade dos resultados de A1C frente a situações fisiopatológicas e metodológicas prejudica a interpretação dos resultados em casos específicos [12]. Estes fatores adicionam mais controvérsias a este tema e questionam a utilidade da A1C em determinadas situações.

1. Metodologia laboratorial e Padronização

Após a publicação dos resultados dos estudos clínicos *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) e *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) na década de 1990 [5,6], a A1C tornou-se o teste de referência para determinar o *status* da glicemia em pessoas com DM. Contudo, foi muito difícil aplicar os alvos de A1C recomendados por estes estudos devido à falta de qualidade analítica dos ensaios utilizados para a determinação de A1C. Havia uma grande variabilidade intra e inter-métodos e também havia grandes diferenças

nos resultados de A1C para uma mesma amostra quando informados por diferentes laboratórios e a padronização dos ensaios era precária.

Desde 1996, o Programa Nacional Americano de Padronização da A1C (National Glycohemoglobin Standardization Program - NGSP - <http://www.ngsp.org>) é responsável pela padronização e calibração de metodologias para A1C, o que resultou em uma redução significativa na variação de resultados entre laboratórios nos Estados Unidos. Esta iniciativa forneceu meios para os laboratórios clínicos alinharem os resultados àqueles relatados nos estudos DCCT e UKPDS [13] e foi muito eficaz para melhorar a qualidade analítica dos ensaios de A1C. Dados de 2012 mostram que a maioria dos métodos de A1C está próxima dos valores-alvo do NGSP e a harmonização dos resultados mostrou grandes melhorias [14].

Além disso, no início dos anos 2000, um método de referência para A1C foi aprovado pela Federação Internacional de Química Clínica - IFCC e é agora reconhecido como o sistema de referência âncora para padronização mundial [15-17].

Historicamente, a A1C é expressa como um percentual (%) da hemoglobina total, baseado nos resultados do DCCT e UKPDS [5,6]. No entanto, o consenso mundial para padronização do teste recomenda que as unidades IFCC e NGSP sejam informadas no resultado da A1C. Desta forma, o resultado da A1C deve ser expresso em mmol/mol (unidade IFCC) e % (unidade NGSP) [15-17].

Atualmente, existem mais de 20 técnicas disponíveis no mercado para determinação da A1C. Quatro tipos de metodologia são mais comumente utilizadas: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de troca iônica, HPLC de afinidade, imunoenensaio, e ensaios enzimáticos [14]. O site do NGSP mantém uma lista atualizada de todos os métodos certificados e padronizados disponíveis no mercado (<http://www.ngsp.org/prog/index.html>).

2. Fatores que influenciam os resultados da A1C

Apesar de todos os esforços internacionais para harmonizar e padronizar os ensaios de A1C, ainda há muitas situações que podem afetar os resultados de A1C, relacionados ou não à metodologia de ensaio, tais como a presença de uma variante de hemoglobina, anemia, uremia e alguns medicamentos/drogas [12,14,19,20]. Recentemente, o papel da etnia na variabilidade inter-individual da A1C tem sido discutido [21-23]. Há relatos que os valores de A1C em negros são, em média, 0,5% maior do que em brancos na América e Europa [24,25] e que também existem diferenças entre outras populações [26-28].

O programa de certificação realizado pelo NGSP não inclui estudos de interferência [13]. No entanto, o NGSP está ciente das interferências analíticas nos ensaios de A1C e um resumo dos achados da literatura pode ser consultado em seu site (<http://www.ngsp.org/interf.asp>).

2.1. Anemia

A anemia por diferentes causas é descrita como interferente na medida da A1C, ocasionando aumento ou diminuição dos resultados, devido à alteração no tempo de meia vida das hemácias [12]. Estudos mostraram que a anemia por deficiência de ferro (ADF), a causa mais comum de anemia na população mundial, aumenta os níveis de A1C em pacientes com e sem DM, provavelmente devido ao aumento no tempo de meia-vida dos eritrócitos, expondo-os a um tempo maior à glicação do que em pacientes sem anemia [29-31]. O tamanho dos eritrócitos e a concentração de hemoglobina (Hb) apresentam uma relação negativa com os valores de A1C, compatível com a hipótese de que a deficiência de ferro aumenta a glicação da Hb [32].

Além disso, a deficiência de ferro é uma deficiência alimentar muito comum em todo o mundo e que pode ser ou não associada com a anemia. Foi relatado que mulheres com deficiência de ferro, mesmo na ausência de anemia, apresentaram valores de A1C mais elevados do que aqueles com um fornecimento adequado de ferro, independentemente da sua GJ [33]. Ainda, um estudo que comparou a acurácia da A1C com o TOTG para o diagnóstico de pré-diabetes (pré-DM) mostrou uma grande discrepância na prevalência desta doença detectada por esses dois testes (7,8% e 23,3% para o TOTG e A1C, respectivamente). Indivíduos com diagnóstico de pré-DM pela A1C apresentaram concentrações mais baixas de hemoglobina total, bem como uma tendência para níveis reduzidos de ferritina e vitamina B12. Foi sugerido pelos autores que o valor preditivo da A1C para diagnóstico de pré-DM é menor em pacientes com anemia, resultando em uma maior prevalência de pré-DM nessa população [34].

Por outro lado, a anemia hemolítica e episódios de sangramento podem reduzir os valores de A1C devido ao encurtamento da meia vida dos glóbulos vermelhos [12,35].

2.2. Hemoglobinas variantes

As hemoglobinopatias podem influenciar no resultado da A1C aumentando ou diminuindo os valores, dependendo da metodologia utilizada. As hemoglobinas variantes mais

comuns são HbS, HbC, HbD e HbE. Todas estas hemoglobinas têm substituições únicas de aminoácidos na cadeia β . Estudos realizados pelo NGSP indicam que as interferências são método-específicas [19, 36]. Em geral, HbS e HbC interferem em alguns imunoenaios, enquanto HbE e HbD interferem em alguns métodos de HPLC (<http://www.ngsp.org/interf.asp>; acesso em 11 de agosto de 2014).

A presença de qualquer uma das Hb variantes afeta a carga iônica da molécula de Hb, o que pode provocar interferência nos métodos de troca iônica, dependendo da habilidade de cada método em separar a Hb variante da HbA. Nos métodos de cromatografia por afinidade utilizando o boronato, a separação das frações glicadas e não glicadas se dá pela presença da molécula de glicose e não pela carga da Hb, e geralmente não há interferência da maioria das variantes, incluindo HbS, C, D e E [37-40].

Como as variantes S e C possuem substituições de aminoácidos perto do N-terminal na cadeia β , alguns imunoenaios são afetados pela presença destas variantes. Nas variantes HbD ou HbE as mutações ocorrem mais longe da cadeia β , a presença destas Hbs geralmente não afetam os métodos de imunoenensaio [37].

Vários estudos têm relatado uma superestimação dos resultados de A1C na presença de variantes de hemoglobina, principalmente dos traços HbC e HbS. No entanto, poucos métodos mostraram que essas interferências são clinicamente significativas [38-40].

A medida de A1C é inadequada para a avaliação do controle glicêmico na presença de homozigose para HbS e HbC, e doença HbSC ou qualquer condição que altera a vida dos glóbulos vermelhos. Nessas situações, medidas alternativas para estimar a glicemia média, como a albumina glicada, são necessárias [37, 41].

Além dos interferentes analíticos, as diferenças na taxa de glicação *in vivo* da HB variante e HbA pode contribuir para discrepâncias nas medidas de A1C. Assume-se que a taxa de glicação para Hb anormal e para a HbA é semelhante. No entanto, estudos mostraram que a cinética da glicação pode variar [42-43]. A glicação pode ocorrer em locais adicionais da molécula e uma modificação na estrutura da proteína pode limitar o número de grupos NH₂ disponível para reagir com a glicose. Esta questão tem sido pouco explorada na literatura.

2.3. Uremia

Em pacientes com nefropatias crônicas, além da anemia crônica associada à doença renal, a presença de altas concentrações de uréia pode carbamilar a hemoglobina, gerando um

derivado da Hb quimicamente modificado. Este composto afeta os resultados da A1C aumentando ou diminuindo seus níveis, dependendo da metodologia utilizada [12,37]. O ácido isociânico, produto da dissociação da uréia, reage fisiologicamente com a Hb gerando um produto final denominado Hb carbamila (CHb) [44].

Esta reação é semelhante à reação de glicação não enzimática para formar A1C. Devido a essa semelhança CHb pode afetar a acurácia do teste A1C e superestimar seus resultados em pacientes urêmicos, independentemente dos níveis de glicose [45, 46]. A intensidade desta interferência pode variar conforme a metodologia empregada na dosagem da A1C [47].

A CHb possui o ponto isoelétrico semelhante a A1C e pode afetar os métodos de HPLC de troca iônica, resultando em valores de A1C falsamente elevados [48]. Por outro lado, pode não ser detectada por outros métodos, tais como imunoensaios e cromatografia de afinidade [46].

Além das interferências analíticas, existe um fator fisiopatológico que pode afetar os valores de A1C na presença de uremia. Uréia e glicose competem para o mesmo N-terminal da valina nas cadeias β da Hb. A intensidade desta competição pode variar entre os indivíduos, dependendo das taxas de carbamilação e glicação, e pode resultar em falsos valores de A1C [46]. Assim, a interpretação dos valores de A1C em pacientes urêmicos deve ser realizada com cautela.

2.4. Etnia

Os valores de A1C diferem entre as populações. Em geral, indivíduos negros possuem níveis de A1C mais elevados que brancos [49,50]. Um grande estudo americano, que avaliou 14.611 indivíduos da população dos Estados Unidos, evidenciou uma baixa concordância entre o teste A1C e aqueles baseados na glicemia para prever o risco de desenvolver DM entre indivíduos negros, hispânicos e brancos, mesmo após o ajuste para fatores interferentes, demonstrando que a glicação da hemoglobina e/ou o tempo de vida dos eritrócitos pode ser diferente entre os grupos étnicos [51]. Outros estudos realizados em pacientes sem DM mostraram que asiáticos possuem níveis de A1C maior que pacientes brancos também sem DM [53, 54]. Dentre os asiáticos, os malásios e indianos tendem a ter níveis de A1C mais elevada que chineses [54]. Além disso, mexicanos parecem apresentar níveis de A1C mais elevados que brancos hispânicos, mas apresentam menores níveis de A1C quando comparados com negros não hispânicos [55].

Estas disparidades sugerem uma necessidade de adequação do uso da A1C em certas etnias, para que haja a correta interpretação dos resultados, tanto para o diagnóstico como para o controle do DM em grupos específicos de pacientes.

3. A1C e complicações do DM

A A1C é um preditor das complicações crônicas do DM a longo prazo, sendo que intervenções que acarretam redução ou normalização da A1C resultam em diminuição do risco de desenvolvimento de tais complicações [5,6]. A A1C deve ser medida regularmente em todos os pacientes em intervalos de 4 a 6 meses. Este intervalo deve ser menor, a cada 3 ou 4 meses, para aqueles pacientes que não atingem o controle glicêmico desejável [2,7]. Os estudos clínicos DCCT e o UKPDS determinaram que níveis de A1C > 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crônicas, sendo este o valor de referência desejável para indivíduos com DM [2,56]. Ainda, os portadores de DM2 apresentam um longo período hiperglicêmico assintomático não tratado antes do diagnóstico, o que aumenta o risco para as complicações do DM nestes indivíduos.

As complicações a longo prazo do DM incluem, principalmente, doença renal do diabetes (DRD), retinopatia diabética e doença cardiovascular (DCV). Cerca de 35% dos pacientes com DM desenvolvem DRD que é a principal causa de insuficiência renal crônica (IRC) em pacientes ingressando em programas de diálise [56,57,58]. No estágio inicial, a DRD caracteriza-se pelo aumento da excreção urinária de albumina (EUA) com ou sem redução da taxa de filtração glomerular (TFG) [59,60]. A EUA recentemente passou a ser classificada como EUA normal e EUA aumentada, sendo que os termos microalbuminúria e macroalbuminúria não são mais utilizados [60,61].

O rastreamento da DRD deve ser anual e deve basear-se na medida da EUA e na estimativa da TFG (eTFG). A medida da EUA preferencialmente deve ser feita através da amostra isolada de urina em função da acurácia diagnóstica e facilidade desse tipo de coleta. Além disso, foi demonstrado que a concentração de albumina em amostra casual é preditiva de eventos cardiovasculares, DRD e mortalidade em geral [61,63]. A eTFG deve ser realizada pela equação Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI), sendo a equação de escolha no momento atual, pois parece ter melhor acurácia do que as equações anteriores [64]. Indivíduos com EUA alterada devem confirmar com uma segunda amostra no período de 3 -6 meses [56,61, 65].

A classificação da DRD é realizada através dos diferentes estágios da DRC de acordo com a EUA e a eTFG. DRC 1: EUA elevada ($\geq 14\text{mg/L}$) com eTFG normal ou elevada ($\geq 90\text{mL/min}$); DRC 2: EUA elevada ($\geq 14\text{mg/L}$) com eTFG levemente reduzida ($60 - 89\text{mL/min}$); DRC 3A: moderada redução da eTFG ($45 - 59 \text{ mL/min}$); DRC 3B: redução marcada da eTFG ($30 - 44 \text{ mL/min}$); DRC 4 redução grave da eTFG ($15 - 29 \text{ mL/min}$) e DRC 5 insuficiência renal eTFG ($< 15 \text{ mL/min}$) [56, 66].

Uma característica importante da DRD é a excreção progressiva e assintomática de albumina urinária e redução da eTFG. Sendo assim, é recomendado o rastreamento da DRD no momento do diagnóstico de DM e análise periódica de EUA e eTFG, além de um monitoramento glicêmico adequado. Uma vez que o diagnóstico dos pacientes com DM pode ser discordante dependendo do teste utilizado para este fim (A1C e/ou testes baseados em glicemia) [11,67], ainda não está claro se estes testes concordam na identificação de pacientes com função renal normal ou alterada no momento do diagnóstico de DM.

Referências

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th Edition 2013.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus - Position Statement. *Diabetes Care* 2014; 37: S81-S90.
3. WHO. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization, 2011.
4. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984; 310: 341- 6.
5. DCCT - The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.
6. U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-51.
7. World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/ IDF Consultation. Geneva, World Health Organization, 2006.
8. International Expert Committee. The International Expert Committee report on the role of the HbA1c assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:1327-34.
9. Carson AP, Reynolds K, Fonseca VA, Muntner P. Comparison of A1C and fasting glucose criteria to diagnose diabetes among U.S. adults. *Diabetes Care*. 2010; 33 (1):95-7.
10. Kramer CK, Araneta MR, Barrett-Connor E. A1C and diabetes diagnosis: The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. 2010;33(1):101-3.
11. Cavagnoli G, Comerlato J, Comerlato CB, Renz PB, Gross JL, Camargo JL. HbA1c measurement for the diagnosis of diabetes: is it enough? *Diabetic Med*. 2011; 28(1):31-5.
12. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, Lernmark A, Metzger BE, Nathan DM. Executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011 Jun; 57(6):793-8.
13. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB, Goldstein D. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A five-year report progress. *Clin Chem* 2001; 47:1985-92.
14. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. *Clin Chim Acta*. 2013 Mar 15; 418:63-71.

15. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40:78-89.
16. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr J, Goodall I, et al. IFCC Reference System for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004; 50:166–74
17. American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and the International Diabetes Federation. Consensus Committee. Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1c Measurement. *Diabetes Care* 2007; 30: 2399-2400.
18. Little RR e Sacks DB. HbA1c: how do we measure it and what does it mean? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*2009; 16:113–118.
19. Little RR and Roberts W. A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3(3):446-451.
20. Camargo JL, Gross JL. Conditions associated with very low values of glycohaemoglobin measured by an HPLC method. *J Clin Pathol* 2004; 57:346–9.
21. Dagogo-Jack S. Pitfalls in the use of HbA1(c) as a diagnostic test: the ethnic conundrum. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6:589–593.
22. Ziemer DC, Kolm P, Weintraub WS, Vaccarino V, Rhee MK, Twombly JG et al. Glucose-independent, black–white differences in hemoglobin A1c levels: a cross-sectional analysis of 2 studies. *Ann Intern Med* 2010; 152: 770–777.
23. Selvin E, Steffes MW, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL. Racial differences in glycemic markers: a cross-sectional analysis of communitybased data. *Ann Intern Med* 2011; 154:303–309.
24. Kirk JK1, D'Agostino RB Jr, Bell RA, Passmore LV, Bonds DE, Karter AJ, Narayan KM. Disparities in HbA1c levels between African-American and non-Hispanic white adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2006 Sep; 29(9):2130-6.
25. Hare MJ1, Magliano DJ, Zimmet PZ, Söderberg S, Joonas N, Pauvaday V, Larhubarbe J, Tuomilehto J, Kowlessur S, Alberti KG, Shaw JE. Glucose-independent ethnic differences in HbA1c in people without known diabetes. *Diabetes Care.* 2013 Jun; 36(6):1534-40.
26. Kirk JK1, Passmore LV, Bell RA, Narayan KM, D'Agostino RB Jr, Arcury TA, Quandt SA. Disparities in A1C levels between Hispanic and non-Hispanic white adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2008 Feb; 31(2):240-6.

27. Mostafa SA1, Khunti K, Srinivasan BT, Webb D, Gray LJ, Davies MJ. The potential impact and optimal cut-points of using glycated haemoglobin, HbA1c, to detect people with impaired glucose regulation in a UK multi-ethnic cohort. *Diabetes Res Clin Pract.* 2010 Oct; 90(1):100-8.
28. Wolffenbuttel BH1, Herman WH, Gross JL, Dharmalingam M, Jiang HH, Hardin DS. Ethnic differences in glycemic markers in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013 Oct; 36(10):2931-6.
29. Koga M, Morita S, Saito H, Mukai M, Kasayama S. Association of erythrocyte indices with glycated haemoglobin in premenopausal women. *Diabet Med* 2007; 24:843–847.
30. Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol.* 2004; 112: 126–8.
31. El-Agouza I, Abu Shohla A, Sirdah M: The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol* 2002; 24:285–289.
32. Ford ES, Cowie CC, Li C, Handelsman Y, Bloomgarden ZT. Iron-deficiency anemia, non-iron-deficiency anemia and HbA1c among adults in the US. *J Diabetes* 2011; 3:67-73.
33. Kim C, Bullard KM, Herman WH, Beckles GL. Association between iron deficiency and A1C Levels among adults without diabetes in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Diabetes Care* 2010; 33:780-5.
34. Hardikar PS, Joshi SM, Bhat DS, et al. Spuriously high prevalence of prediabetes diagnosed by HbA1c in young Indians partly explained by hematological factors and iron deficiency anemia. *Diabetes Care* 2012; 35:797–80.
35. Gallager EJ, Le Roith D, Bloomgarden Z. Review of hemoglobin A1c in the management of diabetes. *J Diab.* 2009; 1: 9–17.
36. Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, Ospina M, Safar- Pour S, Roberts WL. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to measure glycohemoglobin in the presence of hemoglobin S and C traits. *Clin Chem* 2005; 51:264 –5.
37. Bry, L.; Chen, P. C.; Sacks, D. B. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assay for glycohemoglobin. *Clin Chem*, v. 47, p. 153-63, 2001.
38. Little RR, Rohlfing CR, Hanson S, Connolly S, Higgins T, Weykamp C, D'Costa M, Luzzi V, Owen WE, Roberts WL. Effects of hemoglobin E and D traits on glycated hemoglobin (HbA1c) measurements by twenty-three methods. *Clin Chem.* 2008; 54:1277-82.
39. Mongia SK, Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, Roberts RF, Owen WE, D'Costa MA, Reyes CA, Luzzi VI, Roberts WL. Effects of hemoglobin C and S traits on the results of 14 commercial glycated hemoglobin assays. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130(1):136-40.

40. Roberts WL, Safar-Pour S, De BK, Rohlfing CL, Weykamp CW, Little RR. Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem*. 2005; 51(4):776-8.
41. Little RR. Usefulness of glycated albumin assay for diabetes monitoring. *J Diabetes Sci Technol*. 2011 Nov 1; 5(6):1463-5.
42. Goujon R, Thivolet C. Glycation of hemoglobin C in the heterozygous state in diabetic patients. *Diabetes Care* 1994; 17(3):247.
43. Lee BS, Jayathilaka GD, Huang JS, Vida LN, Honig GR, Gupta S. Analyses of in vitro nonenzymatic glycation of normal and variant hemoglobins by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Biomol Tech*. 2011; 22(3):90-4.
44. Lamb E, Dawnay A. Glycated haemoglobin measurement in uraemic patients. *Ann Clin Biochem* 1992; 29:118–20.
45. Ansari A1, Thomas S, Goldsmith D. Assessing glycemic control in patients with diabetes and end-stage renal failure. *Am J Kidney Dis*. 2003 Mar; 41(3):523-31.
46. Szymezak J, Lavalard E, Martin M, Leroy N, Gillery P. Carbamylated hemoglobin remains a critical issue in HbA1c measurements. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47:612–3.
47. Chachou A, Randoux C, Millart H, Chanard J, Gillery P. Influence of in vivo hemoglobin carbamylation on HbA1c measurements by various methods. *Clin Chem Lab Med* (2000) 38:321–326.
48. Smith WG, Holden M, Benton M, Brown CB. Glycosylated and carbamylated haemoglobin in uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 1989; 4(2): 96-100.
49. Herman W.H., Ma Y., Uwaifo G., Haffner S., Kahn S.E., Horton E.S., Lachin J.M., Montez M.G., Brenneman T., Barrett-Connor E. Differences in A1C by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program, *Diabetes Care* 30 (2007)2453–2457.
50. Ziemer DC, Kolm P, Weintraub WS, Vaccarino V, Rhee MK, Twombly JG et al. Glucose-independent, black–white differences in hemoglobin A1c levels: a cross-sectional analysis of 2 studies. *Ann Intern Med* 2010; 152: 770–777.
51. Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, et al. Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1C criteria in the U.S. population in 1988-2006. *Diabetes Care* 2010; 33:562–568.
52. Likhari T1, Gama R. Ethnic differences in glycated haemoglobin between white subjects and those of South Asian origin with normal glucose tolerance. *J Clin Pathol*. 2010 Mar; 63(3):278-80.

53. Mostafa SA, Davies MJ, Webb DR, Srinivasan BT, Gray LJ, Khunti K. Independent Effect of Ethnicity on Glycemia in South Asians and White Europeans. *Diabetes Care*. 2012 Aug; 35(8):1746-8.
54. Venkataraman K1, Kao SL, Thai AC, Salim A, Lee JJ, Heng D, Tai ES, Khoo EY. Ethnicity modifies the relation between fasting plasma glucose and HbA1c in Indians, Malays and Chines. *Diabet Med*. 2012 Jul; 29(7):911-7.
55. Davidson MB1, Schriger DL. Effect of age and race/ethnicity on HbA1c levels in people without known diabetes mellitus: implications for the diagnosis of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Mar; 87 (3):415-21.
56. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes SBD 2013-2014.
57. Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. *J Diabetes Complications*. 2000; 14:266-71.
58. Lugon JR. End-stage renal disease and chronic kidney disease in Brazil. *Ethn Dis*. 2009; 19:S1-7-9.
59. Dwyer JP, Parving HH, Hunsicker LG, Ravid M, Remuzzi G, Lewis JB. Renal Dysfunction in the Presence of Normoalbuminuria in Type 2 Diabetes: Results from the DEMAND Study. *Cardiorenal Med*. 2012; 2:1-10.
60. de Boer IH, Rue TC, Hall YN, Heagerty PJ, Weiss NS, Himmelfarb J. Temporal trends in the prevalence of diabetic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2011; 305:2532-9.
61. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes- 2013. *Diabetes Care*. 2014; 36 Suppl 1:S14-80.
62. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Inter, Suppl*. 2013; 3:1–150.
63. Viana L, Gross, JL, Camargo JL, Zelmanovitz T, Rocha E, Azevedo MJ. Prediction of cardiovascular events, diabetic nephropathy, and mortality by albumin concentration in a spot urine sample in patients with type 2 diabetes. *J Diab Complications*. 2012; 26:407-12.
64. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009; 150 (9): 604–612.
65. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, Sandberg S, Aakre KM, McQueen MJ, Itoh Y, Lieske JC, Secombe DW, Jones G, Bunk DM, Curhan GC, Narva AS. Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin Chem*. 2009; 55:24-38.

66. KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Official Journal of the International Society of Nephrology. 2013; 3(1):1-150.
67. Borg R, Vistisen D, Witte DR, Borch-Johnsen K. Comparing risk profiles of individuals diagnosed with diabetes by OGTT and HbA1c. The Danish Inter99 study. Diabetic Medicine. 2010; 27(8):906–910.

JUSTIFICATIVA

Os interferentes alteram os valores da A1C, o que pode comprometer as decisões clínicas baseadas nos resultados deste teste em determinadas situações. Nestas situações específicas, a maneira de usar o teste A1C para o diagnóstico, na predição de risco de complicações e no controle glicêmico do DM talvez deva ser diferente, já que as concentrações de A1C não representam apenas a média das concentrações de glicose nos meses precedentes à análise. Há uma grande variedade de dados e controvérsias na literatura sobre este assunto.

Estudos mostram que os testes de A1C e testes baseados em glicemia identificam populações diferentes de indivíduos, com perfis de risco diferentes para as diversas complicações do DM. Apesar de estar bem definida a relação da retinopatia diabética com os níveis de A1C no momento do diagnóstico, ainda não está claro como é a relação da A1C com os níveis de albuminúria e prevalência de doença renal do diabetes no momento do diagnóstico de DM.

Para entender melhor estes aspectos em relação ao uso da A1C, nós sistematicamente revisamos e realizamos metanálises de estudos que avaliaram a influência de possíveis fatores que influenciam nos níveis de A1C em indivíduos adultos e não diabéticos e também avaliamos a associação dos níveis de A1C com os níveis de albuminúria e prevalência de DRD no momento do diagnóstico do DM tipo 2 em indivíduos sem história prévia da doença.

Capítulo I

Potential factors affecting A1C values: a systematic review and meta-analyses

Artigo a ser submetido ao periódico *Clinica Chimica Acta*

Potential factors affecting A1C values in individuals without diabetes: a systematic review and meta-analysis

Running title: Factors affecting A1C results

Submission category: Review

Gabriela Cavagnoli ¹

Ana Laura Pimentel ¹

Priscila Aparecida Correa Freitas ¹

Jorge Luiz Gross ^{1,2}

Joíza Lins Camargo ^{1,2*}

¹ Graduate Program in Endocrinology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

² Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre. Brazil

*Corresponding author: Joiza Lins Camargo

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350; Prédio 12, 4º andar, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil.

Fax: +55-51-33598127

E-mail address: jcamargo@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

OBJECTIVE — There are several situations that may affect glycated hemoglobin (A1C) results, related or not to assay methods, such as the presence of anemia, a variant hemoglobin, and uremia. The effects and the clinical significance of these potential interferences are not entirely clarified and may yield false A1C values. Thus, we carried out a systematic review and meta-analyses of studies that evaluated the possible factors affecting A1C levels in adult individuals without diabetes (DM).

RESEARCH DESIGN AND METHODS — The electronic databases Medline and Embase were searched. Studies that measured A1C values in groups with and without iron deficiency anemia (IDA) and/or iron deficiency (ID), variant hemoglobin and/or uremia by methods standardized by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) and/or International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) were included. Data extraction was performed by two reviewers independently. The difference between A1C levels in the groups with and without interferences were obtained by using random-effects meta-analysis and the effect size was presented as absolute difference of means (95% CI).

RESULTS — The analysis included 10 studies that fulfilled the inclusion criteria, providing data from 11,176 participants without DM. There were no differences in A1C in the presence of IDA/ID and HbS, uremia HPLC and uremia immunoassay 0.79% (95% IC -0.39; 1.97), -0.13% (95% IC -0.51; 0.26), 0.15% (95% CI -0.58; 0.88) and -0.19% (95% CI -0.78; 0.40) in A1C values measured, respectively. All differences were not statistically significant.

CONCLUSIONS — In conclusion, our results suggest that the effects of HbAS and uremia on A1C levels in non-diabetic individuals are within the expected individual variation and should not affect the interpretation of A1C results to diagnose DM. However, the effects of IDA and / or ID remain inconclusive since the available studies showed opposite results. Further studies are needed to clarify the glycation mechanisms in individuals with IDA and /or ID with and without diabetes.

Keywords: glycated hemoglobin, anemia, variant hemoglobin, uremia, meta-analysis

1. Introduction

Currently, glycated hemoglobin (A1C) is recommended both for glycemic control and for the diagnosis of diabetes mellitus (DM) [1,2] and it is a very well established predictor of long-term diabetic complications [3-6].

Presently, there are more than 30 methods available to measure A1C levels. They are mainly based on four principles: ion exchange high performance liquid chromatography (HPLC), affinity HPLC, immunoassays and enzymatic assays (<http://www.ngsp.org/docs/methods.pdf>; accessed in 27th August 2014). Data from 2012 showed that most A1C methods are standardized and the harmonization of the results between laboratories has been greatly improved [7].

Despite all international efforts to harmonize and to standardize A1C assays [8-11], there are still many situations that may affect A1C results, related or not to assay methods, such as the presence of a variant hemoglobin (Hb), anemia and uremia [11-13]. Recently, the role of race/ethnicity on A1C values has been raised [14-17].

Anemia may either increase or reduce the A1C values due to changes in the half-life of the red blood cells. The results presented in the literature are controversial. Studies showed that iron deficiency anemia (IDA) increases A1C levels in patients with and without DM, probably because it increases the half-life time of erythrocytes, exposing them to a higher glycation time than in patients without anemia [18-20]. In addition, iron deficiency (ID), independently of the presence of anemia, is associated with increased A1C values regardless glycemia levels [21,22]. On the other hand, hemolytic anemia and bleeding episodes may reduce A1C values due to shortening red blood cell lifespan [11].

Hemoglobinopathies may also affect A1C results. The commonest variant hemoglobins are HbS, HbC, HbD and HbE. The presence of any variant Hb alters the ionic charge of the Hb molecule. Several studies have found an overestimation in A1C results in the presence of Hb variants, mainly HbC and HbS traits. However, very few methods have showed that these interferences are clinically significant [23-27]. In addition to analytical pitfalls, differences in the *in vivo* glycation rate of variant Hb and HbA may contribute to discrepancies in A1C measurements. It has been assumed that the glycation rate for abnormal Hb and for HbA is similar. However, studies have shown that the kinetics of glycation may vary. Glycation may occur at additional sites of the molecule and modifications in the protein structure may limit the number of NH₂ groups available to react with glucose [28-29]. This issue has been less explored in the literature.

In patients with chronic renal disease, in addition to the chronic associated anemia, high concentrations of urea may generate carbamylated Hb (CHb), a chemically modified derivative [11,24,30]. This reaction is similar to the non-enzymatic glycation reaction to form A1C thus CHb can affect A1C test accuracy and overestimate its results in uremic patients, independently of glucose levels [31,32]. The intensity of this interference may vary from method to method [33]. Furthermore, urea and glucose compete for the same N-terminal valine in the Hb β – chain. The intensity of this competition can vary between individuals, depending on carbamylation and glycation rates, and may yield false A1C values [32].

These disparities suggest a need for adequacy in the use of A1C in some situations to ensure the correct interpretation of results, for both diagnosis and glycemic control of DM. Perhaps, in these situations, the interpretation of the A1C test should be different, since its concentration not only reflects the average of glucose concentration in the months preceding the A1C analysis. The effects of these situations on A1C values are not clearly defined and the clinical significance of these potential interferences are not entirely clarified. Therefore, we undertook a systematic review and meta-analyses of studies that analyzed the possible factors affecting A1C levels in adult individuals without DM, namely iron deficiency anemia and/or iron deficiency, variant hemoglobin and uremia.

2. Methods

This systematic review was carried out using a protocol constructed according to the Cochrane recommendation [34] and reported in accordance with the Meta-analysis of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) [35].

2.1. Search strategy

The databases used in the search were Medline from Pubmed and Embase for the period from January 1950 to November 2014. We also performed a manual search, using reference lists of all articles included and relevant reviews, to find other possibly relevant studies. The following terms were used: “glycated hemoglobin”, “anemia”, “variant hemoglobin”, “ethnicity” and “uremia”. All possible qualified studies were considered for review, regardless of the language. The complete search strategy for MEDLINE is given in Appendix A (Supplementary Data). This search strategy was linked to a large project to evaluate the factors affecting A1C results. In the present manuscript, only the results for the pathological interfering factors IDA and/or ID, variant hemoglobin and uremia are shown. The results for ethnicity effects, due to be physiological effects, will be described in a separate article.

2.2. Inclusion and exclusion criteria

Studies were considered eligible for inclusion if they fulfilled the following criteria:

- 1) conducted in adults aged ≥ 18 years without DM by ADA and/or WHO 2014 criteria [1,2];
- 2) compared groups with and without IDA and/or ID, variant hemoglobin and/or uremia;
- 3) A1C measurement was standardized by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) and/or International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) [9].

Cross-sectional, cohort, control-case and experimental in-vitro studies were included if they satisfied the inclusion criteria above. The search was limited to articles published after 1996, according to the beginning of NGSP activities [7]. In order to eliminate the intrinsic glycemia variation and to guarantee that A1C variability was only due to interfering factors in analysis, only individuals without DM were included, considering that in these individuals glycemic levels are constant and do not contribute significantly to the variability of the A1C. Studies carried out on patients with DM were also included if they presented at least a group without DM with and without the interfering factor under analysis for comparison.

We excluded studies on animals, reviews, case reports, letters to the editor, and other similar contributions. Moreover, abstracts without enough data for analysis and studies on pregnant women were also excluded. Articles that included only pre-DM subjects were also excluded.

2.3. Study selection and data extraction

Two independent investigators (GC e ALP) reviewed the list of titles and abstracts for relevance and selected articles for further review. The data were extracted independently by the same investigators using a standardized form and disagreements were decided by consensus and, if necessary, by a third investigator (JLC). The following data were extracted: study design; diagnostic criteria for DM; the total number of participants; the number of participants in the groups with and without the interfering factor; percentage of men; mean and/or range of ages; mean and standard deviation (SD) or standard error (SE) of glycemia and A1C levels and details of the A1C method used.

The primary outcome required was mean and SD of A1C values in the groups with and without the interfering factor. The numerical data showed in the articles were used. For studies

that did not report these data, we emailed to the authors so they could provide us the specific missing information. When data was stratified by sex, weighted mean and standard deviation were calculated. If the data in the manuscripts were enough to calculate SD, the formula $SE = SD \times \sqrt{n}$ was used and those studies with insufficient data for this calculation were excluded. A1C values expressed in mmol/mol were converted to % (<http://www.ngsp.org/convert1.asp>).

2.4. Quality Assessment

Quality assessment was independently performed by two reviewers (GC and ALP) through a questionnaire developed by the authors. The questionnaire was adapted based on the Newcastle - Ottawa scale (NOS) and the Laboratory Medicine Best Practices Initiative Guide to Rating Study Quality [36,37] and included questions related to the population studied (age, sex, clinical origin), selection of participants (diabetes diagnostic tests), study design, interfering factor and statistical analysis. The overall quality of each individual study was arbitrarily rated as follows: 8 –10 stars = good; 5–7 stars = moderate and less than 5 stars = poor (Appendix B - Supplementary Data).

2.5. Data analysis and synthesis

To summarize the effect of the interfering factors on A1C levels we calculated the differences between A1C levels in the groups with and without the interferences. The difference estimates were obtained with meta-analysis and the effect size was presented as absolute percentage of difference of weighted means (95% CI).

We evaluated the magnitude of the heterogeneity among studies by the I^2 test, where values of 0%, 25%, 50% and 75% indicate absent, low, moderate and high heterogeneity among studies, respectively [34], if $I^2 > 25\%$ among studies was identified in preliminary models, random effects meta-analysis was performed. We explored heterogeneity between studies by re-running the meta-analysis removing studies one at a time to determine whether a particular study accounted for the heterogeneity.

Meta-analyses were performed using Review Manager 5.2 version software (Revman - Cochrane Collaboration). Funnel plots were constructed in Stata (version 10.1; Stata, College Station, TX) and asymmetry was evaluated by Egger's test for investigation of publication bias [38]. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant in all analyses, except for publication bias (Egger's test), where a *P* value of <0.1 was considered as statistically significant.

3. Results

3.1. Study selection and characteristics

The initial search strategy yielded 4,566 studies and 4 studies were identified through manual search. After analyzing titles and abstracts, 108 articles were selected for reading the full text. Of these, 19 studies fulfilled our inclusion criteria. Ten studies, including data about IDA and/or ID (N=4); variant hemoglobin (N=2) and uremia (N=4), were selected for this meta-analysis providing data from 11,176 participants [19,22,39-46].

All selected studies were published between 2000 and 2013. The Figure 1 shows the flowchart of the included studies and Table 1 summarizes the characteristics of these studies.

3.2 Studies Quality

The quality assessment of the studies is described in Table 2. The four studies related to IDA and /or ID [19,22,39,46] were classified as having good quality. The studies related to hemoglobin variant [40,41] were classified as moderate quality. This can be explained by the fact that both studies had not sufficient data to complete the data extraction and it was necessary to contact the authors to acquire these data. All four studies related to uremia [42-45] were classified as moderate quality; we believe that this occurred because all studies were designed as analytical studies from those it was difficult to extract all necessary data.

3.3. Meta-analysis

3.3.1 Iron deficiency Anemia and/or Iron deficiency

This analysis included 4 studies totalizing 10,773 individuals without DM. IDA and/or ID were the factors in studying in all manuscripts. Two studies showed cross-sectional designs [22,39] and two were control-case studies [19,46]. One study used an immunoassay (Tina-Quant A1C, Modular P Roche, Roche Diagnostic) [19] and the other three studies used ion-exchange HPLC methods to measure A1C levels (A1C 2.2 Tosoh and A1C G8 Tosoh, Tosoh Corporation and D-10 HbA1c, BioRad Laboratories) [22,39,46].

The pooled analysis of the 4 studies included showed a positive but no significant difference in A1C values between individuals with and without IDA and/or ID [% mean absolute difference = 0.79% (95% CI -0.39, 1.97); P =0.19] (Figure 2). However, a significant heterogeneity among the studies was observed ($I^2 = 99\%$, $P <0.001$). After re-run the meta-analysis removing one paper at a time, no paper explained the heterogeneity and there was no

significant difference in A1C values. There was no evidence of heterogeneity among studies ($I^2=0\%$, $P =0.62$) when the studies by Coban et al [19] and Christy et al [46] were removed together and no difference in A1C values between individuals with and without IDA and /or ID [0.04% (95% CI -0.00, 0.08); $P =0.08$]. On the other hand, when the studies by Kim et al [22] and Son et al were removed, a significant heterogeneity was observed ($I^2 = 96\%$, $P <0.001$) but a significant positive absolute difference in A1C values between individuals with and without IDA and /or ID was observed [1.60% (95%CI 0.039, 2.80); $P =0.009$].

Publication bias was assessed by visually examining a funnel plot. No significant asymmetry, assessed by the Egger's regression test, was demonstrated for IDA and/or ID studies ($P = 0.365$).

3.3.2 Hemoglobin variants

A total of 147 individuals without DM from 2 studies were included in this analysis [40,41]. Both studies analyzed the effect of the sickle cell trait (HbAS) on A1C results by using immunoassay Synchron LX20 (Beckman Coulter) and HPLC BioRad Variant II (BioRad Laboratories) methods. The methods used were not affected by this variant hemoglobin thus only the effect of *in vivo* glycation was assumed [7]. The meta-analysis showed that there was no significant difference in A1C values between individuals with and without the presence of HbS variant in the heterozygote form [-0.13% (95% CI -0.51; 0.26); $P =0.52$; $I^2=51\%$] (Figure 3). Although the heterogeneity was considered moderate it was not possible to carry out analysis of sensibility for these results due to the number of studies included.

3.3.3 Uremia

In this meta-analysis we included 4 studies totalizing 209 patients [42-45]. All studies presented A1C values by at least two different methodologies (Table1). Since CHb may affect A1C levels in different ways depending on the method used, subgroup meta-analyses were carried out based on the methodology applied in each study. Two subgroups were analyzed: HPLC and immunoassay studies.

The subgroup for HPLC was composed by 3 studies; all used ion exchange HPLC to analyze A1C in 146 patients: A1C 2.2 Tosoh, Tosoh Corporation [44]; BioRad Variant II, BioRad Laboratories [45]; and A1C G7 Tosoh, Tosoh Corporation [43]. There was no significant difference in A1C values between individuals with and without uremia [0.15% (95% CI -0.58, 0.88); $p = 0.69$; $I^2 =91\%$; $p <0.001$] (Figure 3). The heterogeneity in this analysis could be partly explained by the study of Lee et al [45]. After removing this study from the meta-analysis, the heterogeneity was reduced ($I^2=79\%$; $p =0.03$) and a negative difference in A1C values between

individuals with and without uremia was observed [-0.25% (95% CI -0.74, 0.24); $P = 0.31$] although not statistically significant. However, we could not find a reason to exclude it from the analysis, so the primary meta-analysis was maintained as the main result for this subgroup. Publication bias was evaluated by a funnel plot, which showed no significant asymmetry, assessed by the Egger's regression test, ($P = 0.249$).

In the subgroup for immunoassay only two studies were included totalizing 110 subjects. The methods used were Tina Quant A1C Cobas Integra 800 [43] and Cobas c311 [42], both from Roche Diagnostic. There was no significant difference in the A1C values between individuals with and without uremia [-0.19% (95% CI -0.78, 0.40); $P = 0.53$; $I^2 = 75\%$; $p = 0.05$] (Figure 4) and a high heterogeneity was observed. No analysis of sensibility was carried out due to the small number of studies included.

4. Discussion

In this systematic review with meta-analyses of studies carried out in individuals without DM, we did not observe significant effects of IDA and/or ID, sickle cell trait and uremia on A1C values.

There were absolute differences in A1C of 0.79% and -0.13% in the presence of IDA/ID and HbAS, respectively. In the presence of uremia, the mean absolute differences were of 0.15% and -0.19% in A1C values measured by HPLC and immunoassay, respectively. These differences were not statistically significant and would represent relative variations of 15.8%, -2.6%, 3.0% and -3.8% in relation to A1C mean levels of 5.0% in the general population without DM [47], in the presence of IDA and/or ID, HbAS and uremia (HPLC and immunoassay), respectively. Considering that the presented data can only be applied in individuals without DM we cannot affirm that the effects of these clinical conditions are not clinically relevant in diabetic patients with higher A1C levels. This issue should be further addressed in patients with DM.

Recently, the A1C cut-off point of $\geq 6.5\%$ has been considered to diagnose diabetes [1,2]. However, the changes in A1C results are also due to inherent sources of variation such as pre-analytical, analytical and biological variation. In normoglycemic subjects, the expected A1C within-individual variation is 0.43%, which means that a change in A1C levels of $\geq 0.5\%$ is likely to be due to factors other than method and individual variations [48]. Except for the IDA and/or ID effect, these disparities are well within the analytical maximum permissible relative variation of $\pm 7\%$ for the A1C test recommended by NGSP [7]. Although not significant, IDA and/or ID had a positive effect on A1C levels with a large confidence interval, which is in accordance with the high heterogeneity among the studies. Considering only the studies by Kim et al [22] and Son et

al [39] the difference is approximately zero but not significant. However, when considering only the studies by Coban et al [19] and Christy et al [46] we observed a significant positive difference, which turns this analysis inconclusive for the IDA and/or ID effect on A1C levels in non-DM individuals.

The differences for the effect of HbS trait and uremia described in this study were not relevant. These data suggest that A1C may be used as a diagnostic test of DM regardless the presence of these clinical situations.

Hemoglobin variants are very well known analytical interferences which can change A1C values independently of glycemia levels [11, 24]. Analytical studies showed that HbS and HbC interfere in some, but not all, methodologies. However, the majority of these studies are based on diabetic individuals in whom glucose levels influence A1C values. It is assumed that glycation is not affected by these variants in the heterozygous form since there is no hemolytic anemia [7]. As far as we know, there are no studies showing that glycation is different for HbA and HbS. However, different glycation rates were observed for various Hb, such as HbC, HbE and HbF and the normal HbA showed the slowest rate [29]. Our data show no significant difference in the values of A1C among non-diabetic individuals with and without HbAS, suggesting that HbA and HbS present similar glycation rates. The use of different methodologies to measure A1C in the studies included in our meta-analysis could not be considered an interfering factor, since according to the literature, they are not affected by this variant Hb [7-10]. Thus, we can assume that in the absence of analytical interference, the results of A1C are not affected by the presence of sickle cell trait and provide a true measure of glycemic status.

The chemically modified compound produced by uremia has an isoelectric point similar to that of A1C and can affect its results [24]. Some studies reported that there may be an apparent increase in A1C when it is measured by methods based on charge separation, such as ion exchange HPLC, compared to other methodologies [30-32]. Our results showed that A1C measured by ion exchange HPLC in the presence or absence of uremia did not differ in individuals without DM. Moreover, uremia did not affect A1C results measured by the immunoassay method.

These data about uremia and A1C in non-diabetic individuals are in agreement with reports that also studied diabetic patients. A recent study that evaluated the A1C using ion exchange HPLC and immunoassay methodologies in patients with chronic renal failure and diabetes, showed a small difference between some methods, however, it was not clinically significant [49]. Most recently, another study also investigated the interference of CHb in A1C results in patients with chronic kidney disease with or without diabetes by HPLCs methods and found no statistically significant differences [50].

5. Strengths and limitations of this review

Our study has several strengths such as an extensive and systematic literature search without language restrictions; the overall quality of original studies was checked and most studies presented from a moderate to good quality; to guarantee that A1C variability was only due to an interfering factor in analysis, only individuals without DM were included and we used the meta-analysis approach to quantify the differences between A1C levels in the groups with and without the interferences.

This review also presents some limitations. First, the diagnostic criteria for DM were very heterogeneous among studies, so it was not possible to truly identify how much the glucose levels contributed to the variability of A1C. Secondly, although we have only considered studies that evaluated A1C with standardized methods, the individual performance of each laboratory was not available. Finally, since most studies that evaluated factors affecting A1C values were carried out on diabetic subjects, the number of studies included in this review was greatly restricted, and consequently the total number of subjects included in the meta-analyses was small.

6. Conclusions

In conclusion, our results suggest that the effects of HbAS and uremia on A1C levels in non-diabetic individuals are within the expected individual variation and should not affect the interpretation of A1C results to diagnose DM. However, the effects of IDA and / or ID remain inconclusive since the available studies showed opposite results. Further studies are needed to clarify the glycation mechanisms in individuals with IDA and /or ID with and without diabetes.

Financial Disclosure: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: This study was supported by the Research Incentive Fund (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and by a grant (PQG/1015019) from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). GC, ALP and PACF received scholarships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Coordination for the Enhancement of Higher Level Personnel (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (PIBIC CNPq/HCPA), respectively.

Contribution Statement: All authors read and approved the final manuscript. JLC was responsible for study conception and, together with GC, was in charge of the study design. GC, ALP and PACF were involved in data acquisition. GC performed data analysis and drafted the manuscript. JLC and JLG interpreted data and **critically** revised the manuscript for important intellectual content. All authors were involved in the critical review of the manuscript. JLC had full access to all the data and was responsible for manuscript submission for publication.

7. References

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus - Position Statement. *Diabetes Care* 2014; 37: S81-S90.
2. WHO. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization, 2011.
3. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Engl J Med* 1984; 310: 341- 6.
4. DCCT - The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
5. U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-51.
6. World Health Organization. Definition and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Intermediate Hyperglycemia: Report of a WHO/ IDF Consultation. Geneva, World Health Organization, 2006.
7. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. *Clin Chim Acta* 2013; 418: 63-71.
8. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr J, Goodall I, et al. IFCC Reference System for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the National Standardization Schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004; 50: 166-74
9. American Diabetes Association, European Association for the Study of Diabetes, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and the International Diabetes Federation. Consensus Committee. Consensus Statement on the Worldwide Standardization of the Hemoglobin A1c Measurement. *Diabetes Care* 2007; 30: 2399-2400.

10. Little RR, Sacks DB. HbA1c: how do we measure it and what does it mean? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009; 16: 113–18.
11. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al. Executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011; 57(6): 793-8.
12. Little RR, Roberts W. A Review of Variant Hemoglobins Interfering with Hemoglobin A1c Measurement. *J Diabetes Sci Technol* 2009; 3(3): 446-51.
13. Camargo JL, Gross JL. Conditions associated with very low values of glycohaemoglobin measured by an HPLC method. *J Clin Pathol* 2004; 57: 346–9.
14. Dagogo-Jack S. Pitfalls in the use of HbA1(c) as a diagnostic test: the ethnic conundrum. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6: 589–93.
15. Ziemer DC, Kolm P, Weintraub WS, Vaccarino V, Rhee MK, Twombly JG et al. Glucose-independent, black–white differences in hemoglobin A1c levels: a cross-sectional analysis of 2 studies. *Ann Intern Med* 2010; 152: 770-77.
16. Selvin E, Steffes MW, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL. Racial differences in glycemic markers: a cross-sectional analysis of community based data. *Ann Intern Med* 2011; 154: 303–09.
17. Kirk JK, D'Agostino RB, Bell RA, Passmore LV, Bonds DE, Karter AJ, et al. Disparities in HbA1c levels between African-American and non-Hispanic white adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2006; 29(9): 2130-36.
18. Koga M, Morita S, Saito H, Mukai M, Kasayama S. Association of erythrocyte indices with glycated haemoglobin in premenopausal women. *Diabet Med* 2007; 24: 843–47.
19. Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta Haematol* 2004; 112: 126–28.
20. El-Agouza I, Abu Shohla A, Sirdah M. The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol* 2002; 24: 285-89.
21. Ford ES, Cowie CC, Li C, Handelsman Y, Bloomgarden ZT. Iron-deficiency anemia, non-iron-deficiency anemia and HbA1c among adults in the US. *J Diabetes* 2011; 3: 67-73.
22. Kim C, Bullard KM, Herman WH, Beckles GL. Association between iron deficiency and A1C Levels among adults without diabetes in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006. *Diabetes Care* 2010; 33: 780-85.
23. Little RR, Vesper H, Rohlfing CL, Ospina M, Safar- Pour S, Roberts WL. Validation by a mass spectrometric reference method of use of boronate affinity chromatography to

- measure glycohemoglobi in the presence of hemoglobin S and C traits. *Clin Chem* 2005; 51: 264-65.
24. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivates on assay for glycohemoglobin. *Clin Chem* 2001; 47: 153-63.
 25. Little RR, Rohlfing CR, Hanson S, Connolly S, Higgins T, Weykamp C, et al. Effects of hemoglobin E and D traits on glycated hemoglobin (HbA1c) measurements by twenty-three methods. *Clin Chem* 2008; 54: 1277-82.
 26. Mongia SK, Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, Roberts RF, Owen WE, et al. Effects of hemoglobin C and S traits on the results of 14 commercial glycated hemoglobin assays. *Am J Clin Pathol* 2008; 130(1): 136-40.
 27. Roberts WL, Safar-Pour S, De BK, Rohlfing CL, Weykamp CW, Little RR. Effects of hemoglobin C and S traits on glycohemoglobin measurements by eleven methods. *Clin Chem* 2005; 51(4): 776-78.
 28. Goujon R, Thivolet C. Glycation of hemoglobin C in the heterozygous state in diabetic patients. *Diabetes Care* 1994; 17(3): 247.
 29. Lee BS, Jayathilaka GD, Huang JS, Vida LN, Honig GR, Gupta S. Analyses of in vitro nonenzymatic glycation of normal and variant hemoglobins by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Biomol Tech* 2011; 22(3): 90-4.
 30. Lamb E, Dawnay A. Glycated haemoglobin measurement in uraemic patients. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 118–20.
 31. Ansari A, Thomas S, Goldsmith D. Assessing glycemic control in patients with diabetes and end-stage renal failure. *Am J Kidney Dis* 2003; 41(3): 523-31.
 32. Szymezak J, Lavalard E, Martin M, Leroy N, Gillery P. Carbamylated hemoglobin remains a critical issue in HbA1c measurements. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 612–3.
 33. Chachou A, Randoux C, Millart H, Chanard J, Gillery P. Influence of in vivo hemoglobin carbamylation on HbA1c measurements by various methods. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 321–26.
 34. Higgins JPT, Green S. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available at: <http://www.cochrane-handbook.org>; accessed 12 August 2014.
 35. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA* 2000; 283: 2008–12.
 36. Wells GA, Shea B, O'Connell D, Peterson J, Welch V, Losos M, et al. The Newcastle-Ottawa scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in metaanalysis.

Available at: http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp; accessed 12 August 2014.

37. Christenson RH, Snyder SR, Shaw CS, Derzon JH, Black RS, Mass D, et al. Laboratory medicine best practices: systematic evidence review and evaluation methods for quality improvement. *Clin Chem* 2011; 57(6): 816-25.
38. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315(7109): 629-34.
39. Son II, Rhee SY, Woo JT, Hwang JK, Chin SO, Chon S, et al. Hemoglobin a1c may be an inadequate diagnostic tool for diabetes mellitus in anemic subjects. *Diabetes Metab J* 2013; 37(5): 343-48.
40. Al-Fadhli SM1, Ahmad AA, Al-Jafar HA. Effect of sickle cell trait and B-Thalassemia minor on determinations of HbA1c by an immunoassay method. *Saudi Med J* 2001; 22(8): 686-89.
41. Rotimi AN, Yu SS, Ricks M, Dagogo-Jack S, Sacks D, Lozier J, et al. Sickle cell trait leads to under diagnosis of glucose intolerance by A1c. *Diabetes* 2012; 61 (Suppl 1): A214.
42. Boukhrissi FE, Balouch H, Bamou Y. Evaluation of hemoglobin A1c measurement on the analyzer Cobas® c311. *Immuno-analyse et biologie spécialisée* 2012; 27: 28-32.
43. Haliassos A, Drakopoulos I, Katritsis D, Chiotinis N, Korovesis S, Makris K. Measurement of glycated hemoglobin (HbA1c) with an automated POCT instrument in comparison with HPLC and automated immunochemistry method: evaluation of the influence of hemoglobin variants. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 223-27.
44. Renacco E, Saunier V, Gras C, Portugal H. Comparaison de cinq automates pour le dosage de l'h moglobine glyquée. *Immunoal Biol Spéc* 2000; 15: 366-72.
45. Lee KF, Szeto YT, Benzie IF. Glycohaemoglobin measurement: methodological differences in relation to interference by urea. *Acta Diabetol* 2002; 39(1): 35-9.
46. Christy AL, Manjrekar P, Babu RP, M S R, Hegde A. Elevation of HbA1C in Non-diabetic Hypothyroid Individuals: Is Anaemia the Connecting Link? -A Preliminary Study. *J Clin Diagn Res.* 2013; 7(11):2442-4.
47. Weykamp C. HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. *Ann Lab Med.* 2013; 33(6):393-400.
48. Little RR, Rohlfing CL. Analytical goals for HbA1c: are HbA1c results good enough for optimal use? *J Diabetes* 2011; 3(1):3-6.
49. Little RR, Rohlfing CL, Tennill AL, Hanson SE, Connolly S, Higgins T, et al. Measurement of Hba(1C) in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2013; 418: 73-6.

50. Li Q, Ju Y, Jin T, Pang B, Deng J, Du T, et al. Haemoglobin A1c measurement in patients with chronic kidney disease. *Clin Biochem* 2014; 47(6): 481-52.

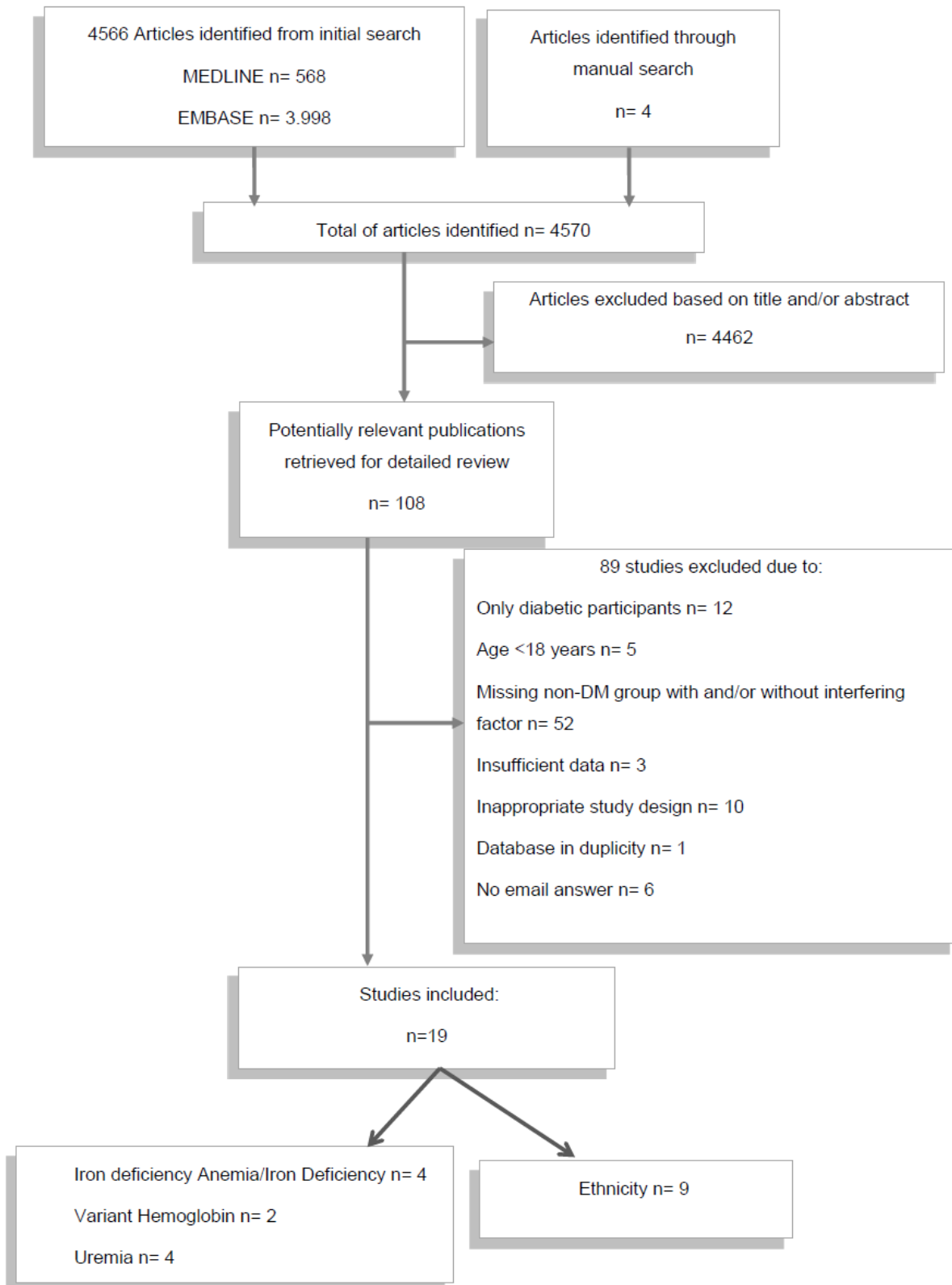


Figure 1: Flow chart of article selection process.

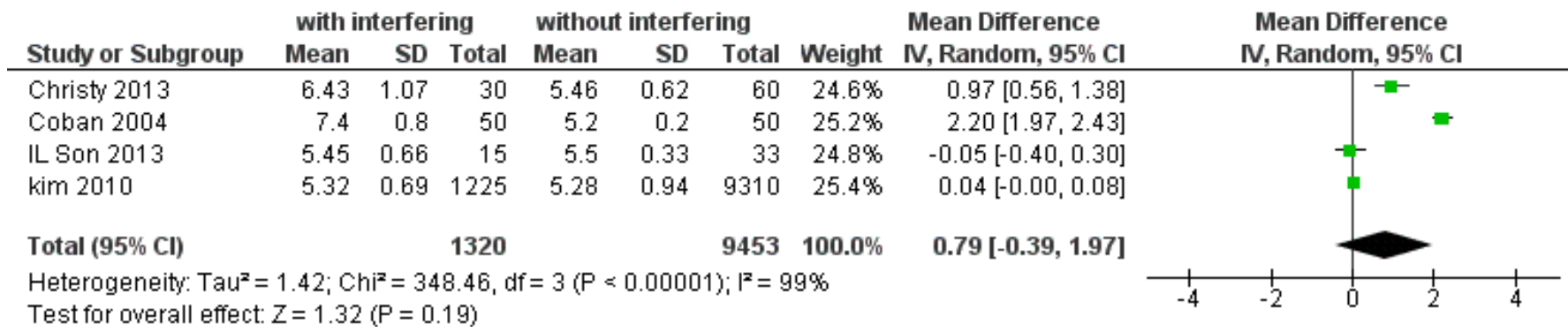


Figure 2: Forest plot diagram of the effect of iron deficiency anemia/iron deficiency on HbA1c levels; CI= confidence interval; SD= standard deviation.

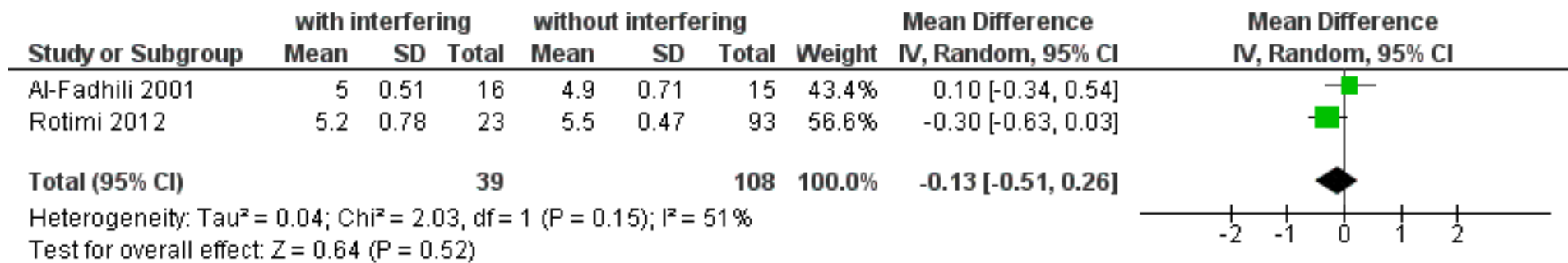


Figure 3: Forest plot diagram of the effect of sickle cell trait on HbA1c levels. CI= confidence interval; SD= standard deviation.

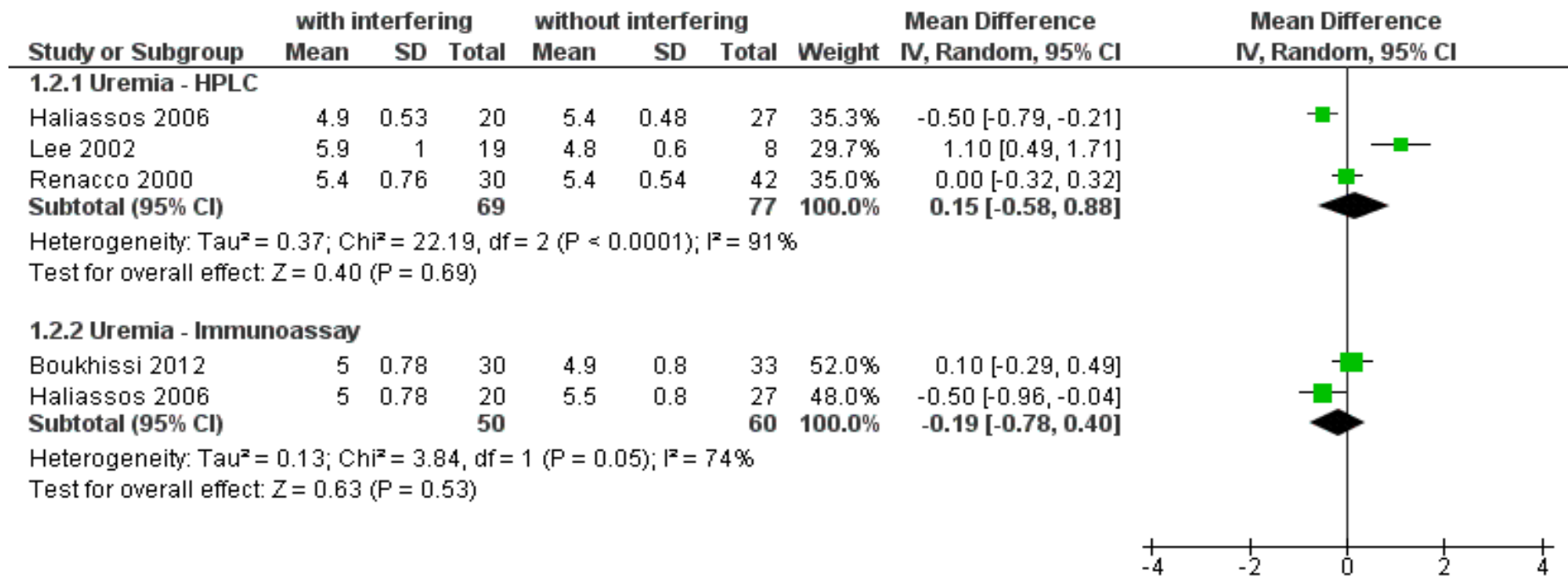


Figure 4: Forest plot diagram of the effect of uremia on HbA1c levels. CI= confidence interval; SD= standard deviation

Table 1: Characteristics of the studies included in this review

Study, year	Study Design	Number of Patients; % Male; Mean Age (years)	Methodology for A1C	Main Findings in Patients without Diabetes
ANEMIA				
Coban, 2004	Control-Case	100; 30%; 35.7	Immunoassay - Tina- Quant A1c, Modular P Roche, Roche Diagnostic	Before iron treatment patients with iron deficiency anemia showed higher A1C levels than healthy controls (p <0.001).
Kim, 2010	Cross-sectional	10535; 63%; NI	Ion Exchange HPLC - A1c 2.2 Tosoh, Tosoh Corporation	Iron deficiency in women, independently of anemia, is associated with shifts in A1C distribution from <5.5 to ≥5.5%.
Il Son, 2013	Cross-sectional	48; NI; NI;	Ion Exchange HPLC - A1c G8 Tosoh, Tosoh Corporation	There was no significant difference in A1C levels between individuals with and without anemia (p =0. 58).
Christy, 2013	Control-Case	90; NI; NI;	Ion Exchange HPLC – D-10 HbA1c, BioRad Laboratories	A1C levels were higher in patients with microcytic hypochromic anemia than in non-anemic individuals.
HEMOGLOBIN VARIANTS				
Al-Fadhili, 2001	Analytical	31; NI; NI	Immunoassay - Synchron LX20, Beckman Coulter	Sickle-cell trait (HbAS). There was no significant difference in A1C levels between individuals with and without variant hemoglobin.
Rotimi, 2012	Cross-sectional	116; NI; 35	Ion Exchange HPLC - Variant II, BioRad Laboratories	Sickle-cell trait (HbAS). Presence of variant hemoglobin was associated with lower A1C values (p =0.03)
UREMIA				
Renacco, 2000	Analytical	72; NI; NI	Ion Exchange HPLC 1 - Clin Rep, Beckman Counter Ion Exchange HPLC 2 - A1c 2.2 Tosoh, Tosoh Corporation	There was no significant difference in A1C levels between individuals with and without uremia measured by HPLC 1 and HPLC 2 (p =0.891 and p =0.490; respectively).
Lee, 2002	Analytical	27; NI; NI	Ion Exchange HPLC - Variant II, BioRad Laboratories Boronate Affinity - IMx analyser, Abbott Laboratories	Patients with uremia presented A1C values higher than patients without uremia when measured by ion exchange HPLC (p <0.05). However, there was no difference in A1C values between patients with and without uremia measured by boronate affinity assay.
Haliassos, 2006	Analytical	47; NI; NI	Ion Exchange HPLC - A1c G7 Tosoh, Tosoh Corporation Immunoassay 1 - Tina Quant A1c Cobas Integra 800, Roche Diagnostic Immunoassay 2 – DCA 2000, Bayer Diagnostic	There was no significant difference in A1C levels between individuals with and without uremia measured by any of three methods studied (p >0.05).
Boukhissi, 2012	Analytical	63; NI; NI	Immunoassay - Cobas c311, Roche Diagnostic	There was no significant difference in A1C levels between individuals with and without uremia measured by the immunoassay studied (p =0.424).

Table 2: Adapted Newcastle-Ottawa quality assessment scale for the studies included in the meta-analysis:

Author (Ref #)	Year	Population Studied	Selection	Study design	Interfering factor	Statistical Analysis	Total Score ^a
ANEMIA							
Coban	2004	*	**	**	**	**	9
Kim	2010	**	*	**	*	**	8
IL Son	2013	*	**	**	**	**	9
Christy	2013	*	**	*	**	**	8
HB VARIANTES							
Al-Fadhili	2001	*	*	**	**	*	7
Rotimi	2012	*	**	**	**	*	8
UREMIA							
Renaco	2000	*	*	**	**	*	7
Lee	2002	*	**	**	**	**	9
Haliassos	2006	*	*	**	*	**	7
Boukhrissi	2012	*	*	**	*	**	7

^a The total score ranges from zero to 10 stars, the highest quality studies are awarded a maximum of 10 stars.

Appendix B (Supplementary Data): Adapted Newcastle-Ottawa quality assessment scale to evaluate study quality of the studies included in the meta-analysis.

TOTAL SCORE: 10 stars

1) Population Studied: Total of Stars = 2

- a. Full description of the population studied: age, sex, clinical origin? If Yes, **two stars**
- b. Description without one or more items missing. If Yes, **one star**

2) Selection of Participants: Total of Stars = 2

- a. Participants are identified without DM by FG and/or OGTT? If Yes, **two stars**
- b. Exclusion of DM was done by interview, previous clinical history and/or familiar history? If Yes, **one star**

3) Study Design: Total of Stars = 2

- a. The study design was in accordance with the purpose of research question under study. If Yes, **two star**
- b. The study was designed for another purpose, but provided sufficient data for our analysis. If yes, **one star**

4) Interfering factor: Total of Stars = 2

- a. The factor under investigation was well described (for example: levels of uremia; levels of total Hb or Hb variant type or other diagnostic criteria). If Yes, **two stars**
- b. The factor under investigation was partially described by interview, previous clinical history and/or familiar history. If Yes, **one star**

5) Statistical Analysis: Total of Stars = 2

- a. Patients without DM had their A1C results clearly described (mean, SD and/or SEM). If Yes, **two stars**
- b. Results for A1C for patients without DM were obtained after contact with the authors. If Yes, **one star**

Capítulo II

Efeito da etnia nos níveis de A1C em indivíduos sem diabetes mellitus: uma revisão sistemática e metanálise

Artigo a ser submetido ao periódico *Diabetes Care*

Efeito da etnia nos níveis de A1C em indivíduos sem diabetes mellitus: uma revisão sistemática e metanálise

Gabriela Cavagnoli ¹

Ana Laura Pimentel ¹

Priscila Aparecida Correa Freitas ¹

Jorge Luiz Gross ^{1,2}

Joíza Lins Camargo ^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em ciências Médicas: Endocrinologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

² Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre. Brasil

*Autor para Correspondência:

Joiza Lins Camargo

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350; Prédio 12, 4º andar, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil.

Fax: +55-51-33598127

E-mail address: jcamargo@hcpa.ufrgs.br

RESUMO

OBJETIVO – As diferenças nos níveis de A1C entre as etnias parecem não estar associadas com alterações glicêmicas ou hematológicas, e têm sido atribuídas a diferenças no acesso e na qualidade do atendimento médico das diferentes etnias e populações; à diferença interindividual a glicação da hemoglobina, ou ainda às diferenças na passagem da glicose para o interior do eritrócito. A maioria dos estudos existentes foi realizada em indivíduos com diabetes (DM), no entanto, a análise dos níveis de A1C na ausência de DM, em indivíduos de diferentes etnias, pode ser mais informativa e elucidativa destas diferenças. Desta forma, realizamos uma revisão sistemática e meta-análises de estudos que avaliaram as diferentes etnias e os níveis de A1C em indivíduos adultos sem DM.

MATERIAIS E MÉTODOS – Os bancos de dados utilizados na busca foram o Medline, através do Pubmed, e o Embase. Estudos em etnia negra, asiática e latina foram comparados com a branca. A1C determinada por métodos padronizados/certificados pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e/ou *International Federation for Clinical Chemistry* (IFCC) foram incluídos. A extração de dados foi realizada por dois revisores de forma independente. Os cálculos das metanálises foram realizados utilizando o modelo de efeito randômico e o tamanho de efeito apresentado como diferença de médias ponderadas (IC 95%). Para a análise dos dados, o grupo da etnia branca foi considerado como grupo controle.

RESULTADOS – A análise incluiu nove estudos que preencheram os critérios de inclusão, fornecendo dados de 26.649 participantes sem DM. Houve diferença significativa entre os valores de A1C em brancos quando comparados com negros [0,23%; (IC 95% 0,19 a 0,28) $p < 0,001$; $I^2 = 45\%$; $p = 0,11$], asiáticos [0,28%; (IC 95% 0,21 a 0,35); $p < 0,001$; $I = 59\%$; $p = 0,06$] e latinos [0,10%; (IC 95% 0,06 a 0,14); $p < 0,001$; $I = 0\%$].

CONCLUSÕES - Há diferenças significativas nos níveis da A1C entre negros, asiáticos, latinos e brancos na ausência de DM. Estas diferenças são relevantes quando se considera o uso da A1C como critério diagnóstico utilizando apenas um ponto de corte para todas as populações, sem considerar a origem étnica.

Palavras chave: hemoglobina glicada, etnias, intervalo de referência, metanálise

Introdução

A hemoglobina glicada (A1C) é considerado o padrão de referência para a avaliação do controle da glicemia em indivíduos com diabetes mellitus (DM) há mais de três décadas [1-3]. Os níveis de A1C são importantes para os ajustes terapêuticos e para predizer o risco de desenvolvimento de complicações crônicas decorrentes do DM [1]. O aumento médio de 1% no valor de A1C está associado com a elevação de 15 a 20% no risco cardiovascular [4] e reduções absolutas de 1 a 2% estão relacionadas a uma diminuição significativa no risco para complicações microvasculares como retinopatia, albuminúria e neuropatia [2,3]. Em 2010, a A1C passou a ser utilizada também como critério diagnóstico de primeira escolha e A1C $\geq 6,5\%$ confirma o diagnóstico de DM [1,5]. Este ponto de corte apresenta alta especificidade e baixa sensibilidade, e seu uso isolado para o diagnóstico de DM tem sido questionado [6,7].

Embora a A1C apresente vantagens em relação aos testes tradicionalmente utilizados para o diagnóstico de DM, glicemia de jejum (GJ) e teste oral de tolerância à glicose e (TOTG), e apesar de todos os esforços internacionais para harmonizar e padronizar os métodos laboratoriais, ainda há muitas situações que podem afetar os resultados de A1C. Situações fisiopatológicas e metodológicas podem prejudicar a interpretação dos resultados, e em casos específicos são limitações para o seu uso [8,9].

Recentemente, estudos demonstraram que existe diferença nos níveis de A1C entre as etnias, a qual parece não estar associada com alterações glicêmicas ou hematológicas [10]. Estas diferenças étnicas nos níveis de A1C têm sido reconhecidas há muitos anos, mas têm geralmente sido atribuídas a diferenças no acesso aos cuidados médicos ou a qualidade deste atendimento para as diferentes etnias e populações [11]. No entanto, uma outra hipótese para essa variabilidade étnica é a diferença interindividual na glicação da hemoglobina [12].

Outra explicação pode ser devido a diferenças na passagem da glicose para o interior do eritrócito, a qual é mediada pelo transportador GLUT1. Diferenças interindividuais/étnicas neste processo de transporte causam o “gap” de glicação. O termo “gap de glicação” é usado para denominar a diferença entre a A1C medida, a qual representa a glicação da hemoglobina intracelular e a A1C estimada a partir da medida da concentração de uma proteína glicada extracelular (frutosamina ou albumina glicada), que representa a glicação extracelular, e está relacionado com os níveis glicêmicos plasmáticos [13]. Esta diferença permanece constante entre

indivíduos, mas não entre populações [14]. Deste modo, um mesmo valor de glicemia pode resultar em distintos valores de A1C entre diferentes indivíduos [15]. Entretanto, esta teoria ainda continua pouco fundamentada [8], e há relatos da participação de componentes genéticos nesta variação [16].

A maioria dos estudos que avaliaram diferenças nos níveis de A1C entre grupos étnicos foi realizada em populações com DM, existindo poucos dados em populações sem DM [17,18]. Duas revisões sistemáticas com metanálise que incluíram estudos em indivíduos com DM sugerem que os fatores socioeconômicos, o acesso e a qualidade dos cuidados em saúde podem resultar em diferenças nos níveis de A1C entre diferentes populações étnicas [10,19].

Dentre os estudos disponíveis, parece existir um consenso de que a A1C se apresenta em menores níveis nos indivíduos brancos [20], principalmente nos não-hispânicos, e em maiores níveis nos indivíduos negros [21,22]. Relatos na literatura mostram que essa diferença pode variar de 0,23% a 0,40%, valores absolutos de A1C, entre brancos e negros, mesmo após ajuste para possíveis interferentes [23,24]. Os asiáticos também parecem apresentar níveis de A1C mais elevados quando comparados com indivíduos brancos com níveis glicêmicos semelhantes [25,26]. Há relato que os valores médios de A1C em latinos se apresentam maiores do que em brancos, e iguais a negros, com diferenças relativas de 8,1%, 7,2% e 8,1%, respectivamente, mesmo depois de ajustes para fatores sócios demográficos [27].

Para níveis semelhantes de glicemia, diversos grupos étnicos apresentam diferentes valores médios de A1C quando comparados à média de A1C de indivíduos brancos, independente da faixa etária, tanto em indivíduos sem DM, quanto em indivíduos com pré-diabetes (pré-DM) e pacientes com DM [24,28-30].

O entendimento e reconhecimento destas diferenças pode ajudar na otimização do uso da A1C no diagnóstico e no controle do DM, através do estabelecimento de metas diferenciadas para controle glicêmico e pontos de corte diferentes para o diagnóstico, de acordo com a origem étnica da população atendida.

Entretanto, a análise dos níveis de A1C na ausência de DM, em indivíduos de diferentes etnias, pode ser mais informativa e elucidativa destas diferenças. Nesta condição, os níveis de glicose são constantes e minimizam a variabilidade da A1C. Desta forma, com o objetivo de avaliar essas diferenças, nós realizamos uma revisão sistemática com meta-análise de estudos que compararam os níveis de A1C em indivíduos sem DM de diferentes etnias.

2. Metodos

2.1. Pesquisa Bibliográfica

A pesquisa foi realizada para selecionar estudos que avaliaram os níveis de A1C em diferentes etnias na ausência de DM. A revisão sistemática foi desenvolvida de acordo com o *Handbook* da Cochrane [31] e seguindo as recomendações para metanálise de estudos observacionais em epidemiologia (MOOSE) [32]. Os bancos de dados utilizados na busca foram o Medline, através do Pubmed, e o Embase, no período de 1951 até novembro de 2014. Para seleção dos artigos foram utilizados os termos *Medical Subject Headings* (MESH). Foram incluídas as seguintes palavras-chave: “hemoglobina glicada”, “anemia”, “hemoglobinas variantes”, “etnia” e “uremia”. Este artigo faz parte de um projeto maior e, por esta razão, a busca na literatura foi feita juntamente com a busca de outros possíveis interferentes da A1C, cujos resultados serão descritos em outro artigo (dados não publicados). Neste manuscrito mostramos apenas os resultados do efeito da etnia nos níveis de A1C.

A estratégia de pesquisa descrita acima foi usada para identificar estudos no Pubmed (Anexo A). Termos similares foram pesquisados no Embase. Não houve restrição da língua utilizada nas publicações. As referências dos artigos incluídos nesta revisão foram consultadas para identificação de outros potenciais estudos elegíveis.

2.2. Critérios de elegibilidade

Os estudos foram considerados elegíveis para inclusão se realizados em adultos, maiores de 18 anos, e sem DM [1,5], para excluir a variabilidade da A1C devido à glicemia. Artigos que incluíram apenas indivíduos pré-DM foram excluídos. Sendo assim, consideramos que a variabilidade da A1C apresentada foi somente devido às diferentes etnias. Obrigatoriamente, os artigos selecionados deveriam ter um grupo com indivíduos de etnia branca e outro grupo com outro tipo de etnia. Artigos em pacientes com DM foram incluídos desde que tivessem pelo menos um grupo sem DM, com as etnias necessárias para realizar a comparação nos níveis de A1C. Os métodos para a determinação de A1C deveriam ser padronizados/certificados pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e/ou *International Federation for Clinical Chemistry* (IFCC) (<http://www.ngsp.org>). Quando esta informação estava incompleta ou indisponível no artigo, os autores foram contatados para a confirmação dos métodos usados. Foram considerados elegíveis, somente os artigos publicados a partir de 1996, pois foi quando se iniciou o programa americano de padronização da A1C pelo NGSP [33]. Artigos com os delineamentos transversais, coorte, caso-controle, antes e depois e experimental *in vitro*,

desde que satisfizessem os critérios anteriores, foram incluídos. Foram excluídos estudos em animais, artigos de revisão, relato/estudo de casos, cartas, resumos sem dados suficientes para as análises e estudos realizados em gestantes.

2.3. Extração dos dados e Qualidade dos estudos

Os títulos e resumos de todos os artigos identificados na estratégia de busca foram avaliados por dois investigadores independentes (GC e ALP). Os estudos que satisfizeram os critérios de elegibilidade foram selecionados para avaliação do texto completo. Na segunda etapa, os mesmos colaboradores realizaram a extração dos dados de forma independente. As discordâncias foram resolvidas por um consenso e, quando necessário, resolvidas por um terceiro revisor (JLC). Foi utilizado um formulário padronizado que incluiu os seguintes itens: desenho do estudo, critérios diagnósticos para DM, o número total de participantes, o número de participantes nos grupos de etnia branca e nos grupos de outras etnias, percentual de homens, média de idade, média de glicemia, média e desvio padrão (DP) ou erro padrão (EP) dos níveis de A1C e o tipo de metodologia utilizada para medida da A1C.

Entramos em contato via e-mail com alguns autores para obtenção dos valores da média e DP da A1C quando estes não estavam disponíveis nos artigos. Quando o estudo tinha dados suficientes para o cálculo destas variáveis, as mesmas foram calculadas pela fórmula: $EP=DP\sqrt{n}$. Os artigos cujos autores não responderam e que tinham dados insuficientes para o cálculo foram excluídos. Valores da A1C que estavam expressos em mmol/mol foram convertidos para % (<http://www.ngsp.org/convert1.asp>).

A qualidade metodológica de cada estudo incluído nesta metanálise foi avaliada de forma independente por dois revisores (GC e ALP) a partir de um questionário desenvolvido pelos autores. O questionário foi adaptado com base na escala Newcastle - Ottawa (NOS) e no Guia para Avaliação da Qualidade de Estudos em Medicina Laboratorial [34] e incluiu questões relacionadas à população estudada (idade, sexo e origem clínica), seleção de participantes (testes de diagnóstico de diabetes), delineamento do estudo, classificação das etnias e análise estatística. A qualidade de cada estudo foi classificada como: 8 - 10 estrelas = boa; 5-7 estrelas = moderada e menos de 5 estrelas = ruim (Anexo B).

2.4. Análise dos dados

Os cálculos das metanálises foram realizados utilizando o modelo de efeito randômico e o tamanho de efeito apresentado como diferença de médias ponderadas (IC 95%). Para a análise dos dados o grupo da etnia branca foi considerado como grupo

controle. A opção por esta etnia foi devido à maioria dos estudos existentes na literatura utilizarem esta etnia para fins comparativos.

A heterogeneidade entre os estudos foi avaliada pelo teste de inconsistência (I^2), sendo que valores próximos a 0% indicam não heterogeneidade entre os estudos, enquanto 25%, 50% e 75% indicam baixa, moderada e elevada heterogeneidade, respectivamente [35]. Nós exploramos a heterogeneidade entre os estudos re-executando a metanálise com a remoção de um estudo de cada vez para determinar a contribuição de cada estudo para a heterogeneidade.

As metanálises foram realizadas utilizando o programa Review Manager versão 5.2 (Revman - Cochrane Collaboration). Os gráficos de funil foram construídos no programa Stata versão 10.1 (Stata, College Station, TX) e para a investigação de viés de publicação, a assimetria foi avaliada pelo teste de Egger [36]. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo em todas as análises, exceto para o viés de publicação (teste de Egger), onde um valor de $P < 0,1$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.Resultados

3.1. Seleção e características dos estudos

A partir da estratégia inicial, identificamos 4.570 estudos (**Figura 1**). Após a análise dos títulos e resumos, 108 estudos foram selecionados para análise do texto completo. Após a leitura dos textos completos, 19 estudos preencheram os critérios de inclusão. Destes, 9 estudos preencheram os critérios de inclusão relacionados à etnia, todos apresentaram dados suficientes para análise quantitativa, totalizando 26.649 indivíduos, 3 estudos eram estudos de coorte e 6 apresentaram delineamento transversal [20,22,23,26,37-41]. Dos estudos selecionados, todos foram publicados entre 1996 e 2013. As características dos estudos e seus principais resultados estão apresentados na **Tabela1**.

3.2. Metanálise

Os estudos incluídos apresentaram valores de A1C em indivíduos brancos que foram comparados com os valores de A1C em indivíduos negros, asiáticos ou latinos. Foi realizada análise de subgrupo baseada em cada tipo de etnia comparada com o grupo controle (etnia branca). Alguns estudos foram incluídos em mais de um subgrupo, pois apresentaram mais de um tipo de etnia além da branca (**Figura 1**).

Seis estudos foram incluídos na metanálise do subgrupo negros *versus* brancos [20,22,23,37-39], totalizando 15.330 indivíduos. Foi observada uma diferença significativa e moderada heterogeneidade entre os estudos [0,23%; (IC 95% 0,19 a 0,28) $p < 0,001$; $I^2 = 45\%$; $p = 0,11$]. Após a análise de sensibilidade, excluindo o estudo de Selvin et al [20], a diferença significativa foi semelhante e não houve evidência de heterogeneidade entre os estudos [0,22%; (IC 95% 0,19 a 0,25); $p < 0,001$; $I = 0\%$; $p = 0,64$]. O viés de publicação foi avaliado através da análise visual do gráfico de funil. Não houve assimetria significativa, avaliada pelo teste de Egger's ($P = 0,828$).

No subgrupo que comparou asiáticos e brancos foram incluídos 4 estudos [26,39-41], totalizando 7.364 indivíduos e também foi observada diferença significativa entre os níveis de A1C e heterogeneidade moderada entre os estudos [0,28%; (IC 95% 0,21 a 0,35); $p < 0,001$; $I = 59\%$; $p = 0,06$]. Após a análise de sensibilidade, removendo o estudo de Burden et al [40] a diferença significativa foi semelhante e não houve evidência de heterogeneidade entre os estudos [0,24%; (IC 95% 0,21 a 0,28); $p < 0,001$; $I^2 = 0\%$; $p = 0,86$]. O gráfico de funil não apresentou assimetria significativa, avaliada pelo teste de Egger's ($P = 0,553$).

No subgrupo que comparou os valores de A1C entre latinos e brancos foram incluídos 2 estudos [22,37], totalizando 12.722 indivíduos, houve uma diferença significativa entre os valores de A1C com ausência de heterogeneidade entre os estudos [0,10%; (IC 95% 0,06 a 0,14); $p < 0,001$; $I = 0\%$].

3.3. Qualidade dos estudos

A avaliação da qualidade dos estudos está descrita na **Tabela 2**. Dos 9 estudos incluídos, 7 estudos [20,22,23,26,37,40,41] foram classificados com boa qualidade e 2 estudos com qualidade moderada [38,39]. Dois estudos satisfizeram todos os critérios previamente estabelecidos para avaliação da qualidade [23,41]. Os 2 estudos com qualidade moderada apresentaram dados insuficientes nos critérios de avaliação da seleção, delineamento do estudo e análise estatística [38,39]. Nestes 2 estudos, os autores não descreveram os valores de média e DP dos valores de A1C. Foi necessário entrar em contato com os autores para obter estas informações. Além disso, um dos estudos tratava-se de um resumo de tema livre, com dados insuficientes no resumo.

4. Discussão

Nesta revisão sistemática com metanálise, avaliamos o efeito das etnias sobre os valores de A1C em indivíduos sem DM. Essa é a primeira revisão sistemática com metanálise que compara os níveis de A1C entre as diferentes etnias em indivíduos sem DM, nos quais os níveis de glicose podem ser considerados constantes e a variabilidade da A1C pode ser minimizada. De acordo com os resultados das buscas, foi possível comparar a etnia branca com três etnias: negros, asiáticos e latinos.

Encontramos pequenas diferenças significativas nas análises dos três grupos, mostrando que, na ausência de DM, os valores de A1C em negros, asiáticos e latinos são maiores do que os valores de A1C em brancos. Houve diferenças médias (valor absoluto de A1C) de 0,23%, 0,28% e 0,10% em negros, asiáticos e latinos, respectivamente, quando comparados com brancos.

Na análise do subgrupo negros *versus* brancos, quatro estudos apresentaram boa qualidade e dois estudos apresentaram qualidade moderada. Estes dois estudos divergiram em relação aos outros, pois apresentaram dados insuficientes nos critérios de avaliação da seleção, delineamento do estudo e análise estatística, além de um deles, por ser um resumo e não um artigo completo, não esclareceu exatamente como classificou os indivíduos sem DM [39]. O aumento observado nos níveis de A1C neste grupo parece ser independente da glicemia, já que todos os indivíduos incluídos apresentaram níveis de glicemia abaixo do ponto de corte para diabetes. A teoria mais conhecida para esta diferença é de que os negros possuem uma taxa de glicação da A1C, assim como de outras proteínas, maior em relação aos brancos [27]. Um estudo mostrou que indivíduos negros possuem níveis mais elevados de A1C do que os brancos para valores iguais de glicemia em todas as categorias: tolerância normal à glicose, pré-DM e DM [28]. Uma metanálise que avaliou as diferenças do controle glicêmico entre pacientes brancos não-hispânicos e afro-americanos com DM mostrou que os níveis de A1C são 0.65% mais altos nos afro-americanos quando comparados com brancos não-hispânicos (valores absolutos de A1C). Eles concluíram que as variações nos níveis de A1C ocorreram devido às diferenças no controle glicêmico [10]. Nossa metanálise encontrou uma diferença absoluta de 0,23% nos níveis de A1C entre negros e brancos, sendo que os brancos apresentaram valores mais baixos. No presente estudo incluímos apenas indivíduos sem DM, portanto ao contrário do estudo de Kirk *et al* [10], é provável que essa diferença não esteja relacionada com o controle glicêmico, com o acesso ou aderência à medicação ou ao acesso aos sistemas de saúde, já que os indivíduos incluídos eram aparentemente saudáveis, com níveis glicêmicos constantes. Um estudo americano que incluiu indivíduos negros e

brancos com DM e níveis similares de A1C mostrou que a associação da A1C com desfechos microvasculares foi independente da etnia, no entanto, negros têm uma maior prevalência de retinopatia do que os brancos [42], o que também foi observado em outro estudo com indivíduos sem DM [22]. Outro estudo comparou a associação entre A1C e GJ em pacientes negros e brancos com os desfechos clínicos, os autores concluíram que apesar dos níveis de A1C serem maiores em negros do que em brancos, os resultados sugerem que A1C é preditor de complicações em ambos os grupos, independente da etnia e de outros fatores associados [43].

Nossos achados mostram que os asiáticos apresentam níveis de A1C 0,28% maiores do que os brancos. Os 4 estudos incluídos nesta metanálise [26,39-41] foram estudos realizados na Inglaterra, que avaliaram principalmente a população sul-asiática, oriunda principalmente da Índia e do Paquistão. Um ponto forte dos estudos incluídos neste subgrupo foi que três deles preencheram quase todos os critérios necessários para avaliação da qualidade [26,40,41]. No entanto, um dos estudos apresentou qualidade moderada [39], o que pode ser explicado pela falta de informação devido a este ser um resumo e não um artigo completo. A heterogeneidade moderada encontrada pode ser explicada pelo fato de que o estudo de Burden *et al* [40] classificou os participantes sem DM apenas pelo auto relato, e não pelos testes de glicemia. Um estudo no Reino Unido também demonstrou que os asiáticos apresentam níveis de A1C mais elevados quando comparados a caucasoides com níveis glicêmicos semelhantes [25]. Outro estudo, realizado com indivíduos DM tipo 2, mostrou que pacientes asiáticos tiveram níveis de A1C e glicose pós-prandial significativamente maiores do que os caucasianos. As diferenças nos níveis de A1C entre os grupos étnicos deste estudo foram clinicamente relevantes na faixa de A1C de 7,0 a 9,0%. Nesta faixa, o nível de A1C é de 0,2 a 0,5% maior nos indivíduos asiáticos, hispânicos e africanos em comparação com caucasianos [16]. A OMS tem recomendado o uso de pontos de corte específicos para pacientes sul-asiáticos em relação ao IMC, circunferência da cintura e síndrome metabólica, devido às altas taxas de DM nesse grupo [44]. No entanto, as altas taxas de DM neste grupo podem ser devido aos valores mais altos de A1C. Os resultados de Likhari *et al* [41], baseados em uma determinada população do sul da Ásia (Punjabi Sikh), mostraram que os níveis de A1C nesta população são maiores que em brancos, no entanto, talvez estes valores não possam ser aplicados a todos os grupos da Ásia. Desta forma, mais estudos são necessários para avaliar os níveis de A1C nas diferentes populações asiáticas.

No subgrupo que comparou latinos *versus* brancos, apenas dois estudos foram incluídos e não houve heterogeneidade entre eles [22,37]. Este foi um ponto forte desta metanálise, a homogeneidade destes dois estudos pode ser devido à base populacional

utilizada do NHANES. Outro ponto forte é que estes estudos tiveram uma boa qualidade. No entanto, os dois estudos foram delineados para objetivos diferentes: um avaliou a relação da A1C com mortalidade em mexicanos americanos e o outro avaliou a associação da A1C com retinopatia em americanos hispânicos. Mesmo assim, em ambos os estudos houve pequena diferença significativa dos níveis de A1C nestes dois grupos quando comparados com brancos. A A1C apresentou valor 0,10% maior nos latinos do que nos brancos. Estudos feitos em indivíduos com DM também compararam os níveis de A1C em brancos não hispânicos e mexicanos americanos e relataram níveis de A1C maiores em mexicanos americanos [19, 30].

Em adição, o estudo ACCORD, que avaliou indivíduos de diferentes origens étnicas após tratamento intensivo para DM, usando o mesmo valor de A1C como alvo de tratamento, observou que houve um maior risco de hipoglicemia nos diferentes grupos étnicos em relação aos brancos. Estes resultados parecem justificar a relação entre origem étnica e risco de hipoglicemia [45].

As variações nos níveis da A1C entre os indivíduos com níveis semelhantes de glicemia podem ser explicadas pelo “gap” de glicação e outros fatores biológicos associados à variação interindividual da A1C [13, 15,46]. Além disso, estas variações podem estar associadas também a fatores genéticos. Um estudo realizado em gêmeos mostrou que existe um componente hereditário que influencia nas concentrações de A1C e que está relacionado ao “gap” de glicação. De acordo com esse estudo, a intensidade do “gap” de glicação é 69% hereditária e 31% associado a fatores ambientais em indivíduos sem DM. [16]. Estes fatores genéticos que podem influenciar nos valores de A1C não estão relacionados com genes que regulam os níveis de glicose em jejum [47].

Comparação com outros estudos

Kirk *et al* [10] publicaram uma metanálise com o objetivo de avaliar as diferenças nos níveis de A1C entre brancos não-hispânicos e afro-americanos com DM. Este artigo incluiu 11 estudos (3 prospectivos e 8 transversais), publicados entre 1996 a 2005 totalizando 60.620 indivíduos analisados. Os autores concluíram que as diferenças entre os níveis de A1C entre Africanos Americanos e brancos não hispânicos ocorreram devido às diferenças no controle glicêmico e às diferenças socioeconômicas da população. Posteriormente, Kirk *et al* [19] publicaram outra metanálise com artigos publicados de 1993 a 2007 com o objetivo de avaliar as diferenças nos níveis de A1C entre indivíduos brancos hispânicos e brancos não-hispânicos com DM e concluíram que a A1C é maior em brancos hispânicos do que não-hispânicos, com uma diferença média absoluta de A1C de 0,5%. Os

autores também atribuíram esta diferença às diferenças socioeconômicas, à qualidade do cuidado com a saúde da população e ao melhor acesso destes ao sistema de saúde.

Embora os estudos acima apresentem uma questão de pesquisa semelhante à do nosso estudo, diferem na população estudada. Quando comparamos as diferenças encontradas, observamos que no estudo de Kirk et al [10], brancos e negros tiveram uma diferença absoluta de A1C de 0,32% em relação a um valor médio absoluto de A1C de aproximadamente 8,0%, representando uma diferença relativa de 4%. Nossa metanálise mostrou, para estes mesmos grupos étnicos, uma diferença absoluta de 0,23% em relação a valores absolutos médios de A1C de aproximadamente 5,6%, o que representa uma diferença relativa de 4,1%. Isso nos permite concluir que as diferenças nos níveis de A1C não estão totalmente relacionadas com os níveis glicêmicos e que estas diferenças existem tanto em indivíduos com DM assim como em indivíduos sem DM, independentes da glicemia. Sendo assim, as diferenças encontradas em indivíduos com DM são similares as encontradas em indivíduos sem DM, indicando que indivíduos negros apresentam níveis basais de A1C mais elevados que brancos, os quais não são influenciados pelo controle glicêmico, diferenças socioeconômicas da população e diferente acesso aos sistemas de saúde.

Pontos fortes e limitações da revisão

Nossa revisão teve como pontos fortes a inclusão apenas de estudos que determinaram a A1C por métodos padronizados, a avaliação/análise de 3 populações diferentes, diferentes delineamentos de estudo e a ausência de restrição de linguagem. Outro ponto importante desta revisão é que empregamos metanálise para expressar quantitativamente os resultados obtidos. Além disso, na maioria dos estudos incluídos, a qualidade foi boa. No entanto, tivemos algumas limitações. Alguns estudos classificaram os indivíduos sem DM por auto-relato e não pelos critérios diagnósticos baseados na glicemia, sendo assim não foi possível identificar o quanto os níveis de glicemia contribuíram para a variabilidade da A1C. Outra limitação é a possível presença de indivíduos com pré-DM dentre as populações classificadas sem DM nos estudos avaliados.

Conclusão

Há diferenças significativas nos níveis da A1C entre negros, asiáticos, latinos e brancos na ausência de DM. Estas diferenças são relevantes quando se considera o uso da A1C como critério diagnóstico utilizando apenas um ponto de corte para todas as populações, sem considerar a origem étnica. Em adição, o uso do mesmo valor alvo de

A1C para o controle glicêmico nestas diferentes populações pode acarretar em um risco aumentado a hipoglicemia.

Para estabelecer melhor os critérios diagnósticos e de controle glicêmico baseado nos níveis de A1C, há necessidade de se compreender melhor os mecanismos da glicação da hemoglobina e os fatores responsáveis pela variabilidade da A1C entre as etnias. Estudos prospectivos de longo prazo são indispensáveis para estabelecer quais os níveis de A1C são preditivos de complicações nestes diferentes grupos étnicos e se as diferenças na glicação da hemoglobina realmente refletem uma maior predisposição às complicações diabéticas em indivíduos de diferentes etnias.

Referências

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus - Position Statement. *Diabetes Care* 2014; 37: S81-S90.
2. DCCT - The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-86.
3. U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-51.
4. Riddle MC, Ambrosius WT, Brillon DJ, Byington RP, Cohen RM, Goff DC Jr, Malozowski S, Margolis KL, Probstfield JL, Schnall A, Seaquist ER; for the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Investigators. Epidemiologic relationships between A1C and all-cause mortality during a median 3.4-year follow-up of glycemic treatment in the ACCORD trial. *Diabetes Care* 2010; 33:983-90.
5. World Health Organization (WHO). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Available at: http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf. Accessed 20/01/2014.
6. Kramer CK, Araneta MR, Barrett-Connor E. A1C and diabetes diagnosis: The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. 2010; 33(1):101-3.
7. Cavagnoli G, Comerlato J, Comerlato CB, Renz PB, Gross JL, Camargo JL. HbA1c measurement for the diagnosis of diabetes: is it enough? *Diabetic Med*. 2011; 28(1):31-5.
8. Hare MJ, Shaw JE, Zimmet PZ. Current controversies in the use of haemoglobin. *J Intern Med* 2012; 271(3):227-36.
9. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, Maclaren NK, McDonald JM, Parrott M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2002; 48:436-72.
10. Kirk JK, D'Agostino RBJr, Bell RA, et al. Disparities in HbA1c levels between African-American and non-Hispanic white adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 2006; 29:2130-6.

11. Herman WH¹, Cohen RM. Racial and ethnic differences in the relationship between HbA1c and blood glucose: implications for the diagnosis of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Apr;97(4):1067-72
12. Cohen RM, Haggerty S, Herman WH. HbA1c for the Diagnosis of Diabetes and Pre diabetes: Is It Time for a Mid-Course Correction? *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95(12):5203-6.
13. Cohen RM, Holmes YR, Chenier TC, Joiner CH 2003 Discordance between HbA1c and fructosamine: evidence for a glycosylation gap and its relation to diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 2003 Jan; 26(1):163-7.
14. Hinzmann R, Schlaeger C, Tran CT. What Do We Need beyond Hemoglobin A1c to Get the Complete Picture of Glycemia in People with Diabetes? *Int J Med Sci*2012;9(8):665-81.
15. Khera P, Joiner C, Carruthers A, Lindsell CJ, Smith EP, Franco RS, Holmes YR, Cohen RM. Evidence for interindividual heterogeneity in the glucose gradient across the human red blood cell membrane and its relationship to hemoglobin glycation. *Diabetes* 2008; 57(9):2445-52.
16. Cohen RM, Snieder H, Lindsell CJ, Beyan H, HawaMI, Blinko S, Edwards R, Spector TD, Leslie RD. Evidence for independent heritability of the glycation gap (glycosylation gap) fraction of HbA1c in non-diabetic twins. *Diabetes Care* 2006; 29:1739–43.
17. Christensen DL¹, Witte DR, Kaduka L, Jørgensen ME, Borch-Johnsen K, Mohan V, Shaw JE, Tabák AG, Vistisen D. Moving to an A1C-based diagnosis of diabetes has a different impact on prevalence in different ethnic groups. *Diabetes Care.* 2010 Mar;33(3):580-2.
18. Wolffenbuttel BH¹, Herman WH, Gross JL, Dharmalingam M, Jiang HH, Hardin DS. Ethnic differences in glycemic markers in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2013 Oct; 36(10):2931-6.
19. Kirk JK¹, Passmore LV, Bell RA, Narayan KM, D'Agostino RB Jr, Arcury TA, Quandt SA. Disparities in A1C levels between Hispanic and non-Hispanic white adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2008 Feb; 31(2):240.
20. Selvin E, Steffes MW, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL. Racial Differences in Glycemic Markers: A Cross-sectional Analysis of Community-Based Data. *Ann Intern Med* 2011; 154(5):303-W93.
21. Higgins T. HbA1c — An analyte of increasing importance. *ClinBioch*2012; 45:1038–45.

22. Bower JK, Brancati FL, Selvin E. No ethnic differences in the association of glycosylated hemoglobin with retinopathy: the national health and nutrition examination survey 2005-2008. *Diabetes Care* 2013; 36(3):569-73.
23. Chapp-Jumbo E, Edeoga C, Wan J, Dagogo-Jack S, for the Pathobiology of Pre diabetes in a Biracial Cohort (POP-ABC) Research Group. Ethnic disparity in hemoglobin A1c levels among normoglycemic offspring of parents with type 2 diabetes mellitus. *Endocr Pract* 2012; 18(3):356-62
24. Herman WH, Dungan KM, Wolffenbuttel BH, Buse JB, Fahrback JL, Jiang H, Martin S. Racial and ethnic differences in mean plasma glucose, hemoglobin A1c, and 1,5-anhydroglucitol over 2000 patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:1689-94.
25. John WG; UK Department of Health Advisory Committee on Diabetes. Use of HbA1c in the diagnosis of diabetes mellitus in the UK. The implementation of World Health Organization guidance 2011. *Diabet Med.* 2012 Nov; 29(11):1350-7.
26. Mostafa SA, Davies MJ, Webb DR, Srinivasan BT, Gray LJ, Khunti K. Independent effect of ethnicity on glycemia in South Asians and white Europeans. *Diabetes Care* 2012; 35(8):1746-8.
27. Heisler M, Faul JD, Hayward RA, Langa KM, Blaum C, Weir D 2007 Mechanisms for racial and ethnic disparities in glycemic control in middle-aged and older Americans in the Health and Retirement Study. *Arch Intern Med* 167:1853–1860.
28. Ziemer, D. c. et al. Glucose-independent, black-white differences in hemoglobin A1 levels. *Ann. Intern. Med.* 2010 152, 770–777 .
29. Saaddine, J. B. et al. Distribution of HbA1c levels for children and young adults in the U. S. Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes Care* 2002 25, 1326–1330 .
30. Herman, W. H. et al. Differences in A1c by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes prevention program. *Diabetes Care* 2007 30, 2453–2457.
31. Higgins JPT, Green S (eds). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available at: <http://www.cochrane-handbook.org>. Accessed 12 October 2013.
32. Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, et al. Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group. *JAMA* 2000; 283:2008–12.

33. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB, Goldstein D. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A five-year report progress. *Clin Chem* 2001; 47:1985-92.
34. Christenson RH¹, Snyder SR, Shaw CS, Derzon JH, Black RS, Mass D, Epner P, Favoretto AM, Liebow EB. Laboratory medicine best practices: systematic evidence review and evaluation methods for quality improvement. *Clin Chem*. 2011 Jun;57(6):816-25.
35. Higgins, J.P., Thompson, S.G., Deeks, J.J., Altman, D.G., 2003. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 327, 557–560.
36. Egger M, Smith GD, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997; 315(7109): 629-34.
37. Kehl KG¹, Findeisen HM, Fardo DW, Bruemmer D, Mannino DM, Sanderson WT. Race-ethnicity as an effect modifier of the association between HbA1c and mortality in U.S. adults without diagnosed diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2011 Aug; 165(2):275-81.
38. de Miranda VA¹, Cruz Filho RA, de Oliveira TS, Moscovitch SD, Kang HC, Miranda Chagas SV, Costa DM, Vianna Araújo D, Garcia Rosa ML. Racial differences in HbA1c: a cross-sectional analysis of a Brazilian public primary care population. *Prim Care Diabetes*. 2013 Jul; 7(2):135-41.
39. Tillin, T., A. D. Hughes, et al. (2013). "Do risk factors measured 20 years previously predict and explain ethnic differences in HbA1c among nondiabetic British South Asians, African Caribbeans and Europeans?" *Diabetic Medicine* 30: 76. Poseter.
40. Burden ML, Basi M, Burden AC. HbA1c local reference ranges: effects of age, sex and ethnicity. *Practical Diabetes Int* 1999; 16(6): 211-214.
41. Likhari T, Gama R. Ethnic differences in glycosylated haemoglobin between white subjects and those of South Asian origin with normal glucose tolerance. *J Clin Pathol* 2010; 63(3):278-80.
42. Tsugawa Y, Mukamal KJ, Davis RB et al. Should the hemoglobin A(1c) diagnostic cutoff differ between blacks and whites? a cross-sectional study. *Ann Intern Med*. 2012 Aug; 7; 157(3):153-9.
43. Selvin E, Rawlings AM, Bergenstal RM, Coresh J, Brancati FL. No racial differences in the association of glycosylated hemoglobin with kidney disease and cardiovascular outcomes. *Diabetes Care*. 2013 Oct; 36(10):2995-3001
44. WHO Expert Consultation. Appropriate body-mass index for Asian populations and its implications for policy and intervention strategies. *Lancet* 2004; 363:157–163.

45. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, et al.; ACCORD trial group. Effect of intensivetreatment of hyperglycaemia onmicrovascular outcomes in type 2 diabetes:an analysis of the ACCORD randomized trial. *Lancet* 2010; 376:419–430.
46. Gould BJ, Davie SJ, Yudkin JS. Investigation of the mechanism underlying the variability of glycated haemoglobin in non-diabetic subjects not related to glycaemia. *Clin Chim Acta* 1997; 260:49–64.
47. Snieder H, Sawtell PA, Ross L, Walker J, Spector TD, Leslie RD 2001 HbA(1c) levels are genetically determined even in type 1 diabetes: evidence from healthy and diabetic twins. *Diabetes* 50:2858–2863.

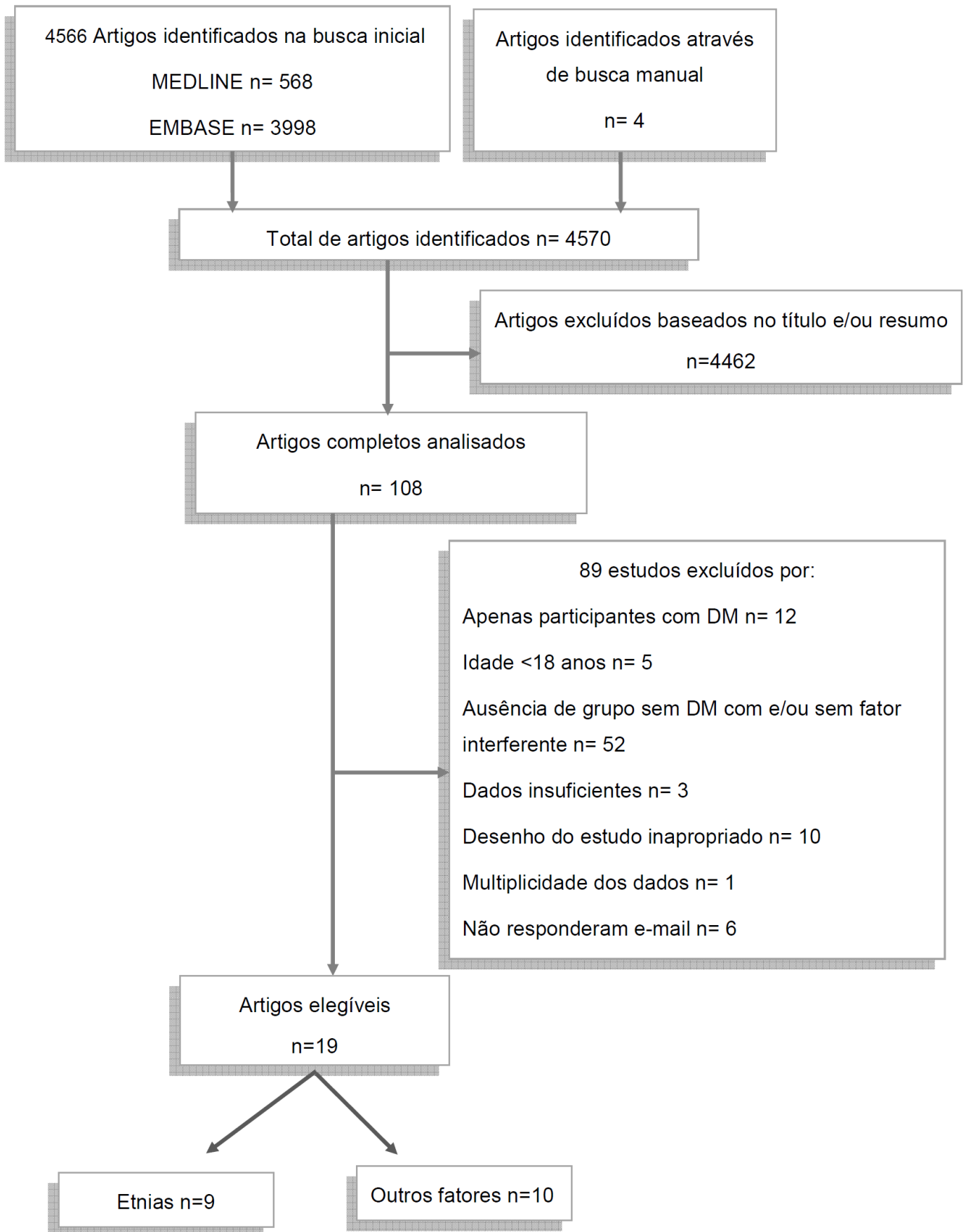


Figura 1: Fluxograma dos estudos incluídos.

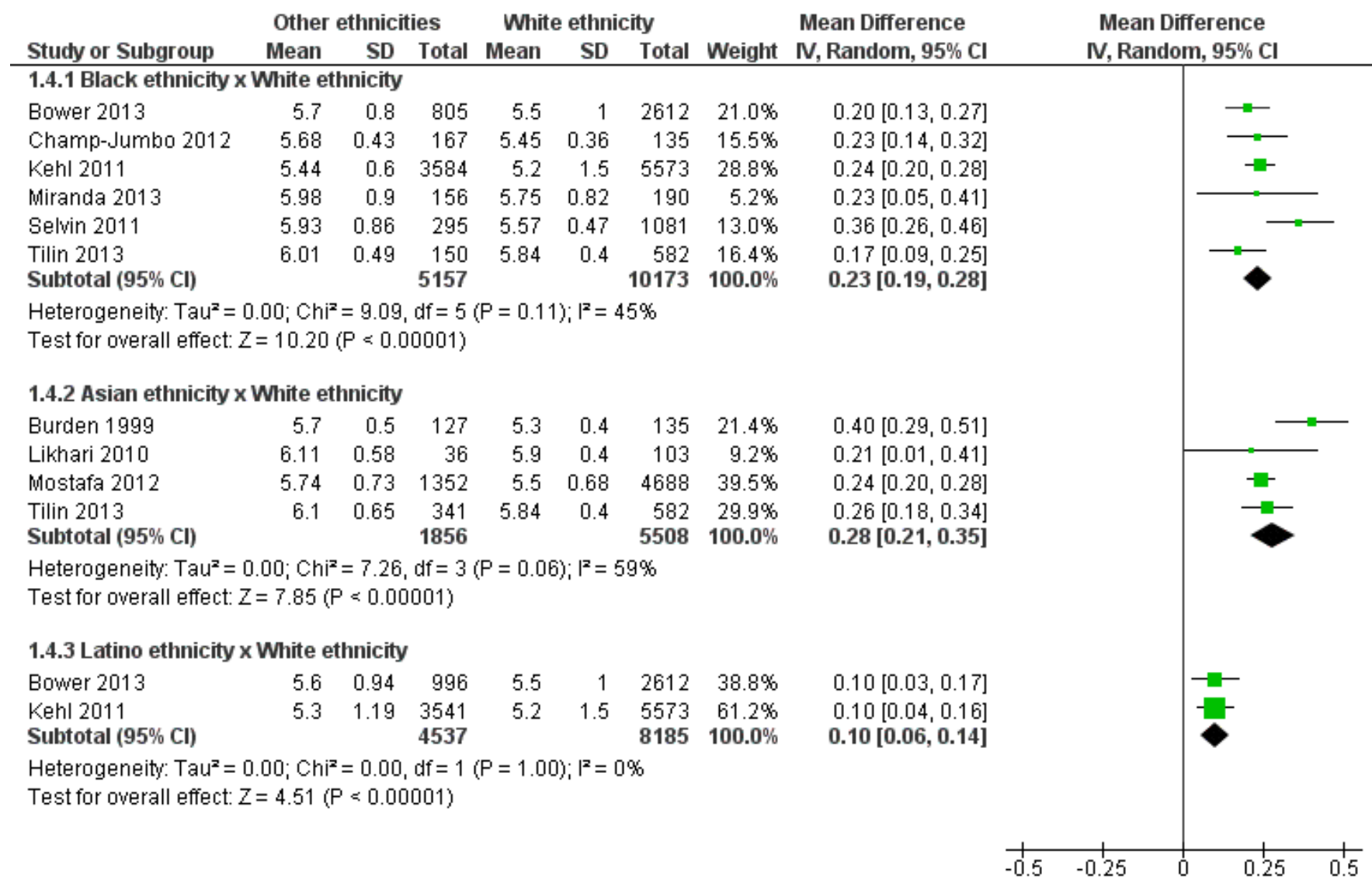


Figura 2: Metanálise do efeito das diferentes etnias nos níveis de A1C.

Tabela 1: Características dos 9 artigos incluídos

Estudo, Ano, N° Ref	N; % homens; Idade (anos)	Tipo de estudo	População estudada	Metodologia para análise da A1C	Principais Achados
Burden, 1999 [40] Branco	135 45,1% NI	Transversal	Indivíduos dos arredores da cidade de Leicester, Inglaterra. Informações sobre idade, sexo, grupo étnico e presença de DM foram obtidas através de questionário.	Imunoensaio DCA 2000 Bayer Diagnostica	Indo-Asiáticos apresentaram valores de A1C maior que brancos (5,7% e 5,3%, respectivamente). Os níveis de glicose foram mais elevados no grupo de indo-Asiáticos do que nos pacientes brancos.
Indo-Asiáticos	127 48% NI				
Kehl ,2011 [37] Branco não-Hispânicos	5.573 48,6% 45,9	Coorte	Banco de dados do NHANES 1988 – 1994. Indivíduos Americanos com idade >20 anos. Classificação da etnia e DM foi por auto relato.	HPLC Troca Iônica Diamat Analyzer System Bio-Rad Laboratories	Os níveis de A1C foram maiores em negros não-Hispânicos do que nos Mexicanos-Americanos e brancos (5,4%; 5,3% e 5,2%; respectivamente). Na análise ajustada para sexo e idade, apenas nos brancos não-Hispânicos os níveis mais altos de A1c estavam associados com a mortalidade em geral e por doença cardiovascular.
Negros não-Hispânicos	3.584 45,2% 40,0				
Mexicanos-Americanos	3.541 54,5% 36,3				
Likhari ,2010 [41] Branco	103 52,4% 63,2	Transversal	Indivíduos encaminhados da atenção primária para realizar TOTG no New Cross Hospital, Wolverhampton, Inglaterra. Foram incluídos apenas indivíduos normoglicêmicos (GJ <110 mg/dL e 2hG <160 mg/dL). Classificação da etnia foi por auto relato.	HPLC Troca iônica A1C Tosoh Tosoh Corporation	Indivíduos sul-Asiáticos (Punjabi Sikh) apresentaram valores mais elevados de A1C do que indivíduos brancos (6,1% e 5,9%; p =0,02, respectivamente) para valores semelhantes de GJ e 2hG.
Sul-Asiáticos	36 44,4% 51,6				
Selvin, 2011 [20] Branco	1081 NI NI	Transversal	Participantes do estudo ARIC, sub-estudo CARMRI 2004-2005. História de DM foi determinada por auto-relato do uso de medicamentos hipoglicemiantes ou diagnóstico médico.	Imunoensaio Tina Quant II Hitachi 911 Analyzer Roche Diagnostic	Negros apresentaram valores de A1C maiores do que brancos, mesmo após o ajuste para todas as covariáveis estudadas (5,9% e 5,6%, respectivamente).
Negros	295 NI NI				
Chapp-Jumbo, 2012 [23] Branco não-Hispânicos	135 31,1% 47,2	Coorte	Moradores da região de Memphis, normoglicêmicos (GJ <100mg/dL e 2hG <140mg/dL) participaram do estudo. Etnia foi classificada por	HPLC Troca Iônica Bio-Rad Bio-Rad	A1C foi maior nos negros em comparação com os brancos (5,7% e 5,5%, respectivamente) mesmo após ajuste para vários fatores. Os negros eram mais jovens e apresentaram níveis de GJ, 2hG e hemoglobina total

Negros não-Hispânicos	167 26,9% 43,8		auto relato.	Laboratories	menores que os brancos.
Mostafa, 2012 [26] Brancos Europeus	4688 NI NI	Transversal	Participantes do estudo ADDITION – Leicester com TOTG normal conforme OMS 1999.	HPLC Troca Iônica Variant II Bio-Rad Laboratories	Os níveis de A1c, GJ e 2hG foram independentemente maiores em sul-Asiáticos do que em brancos. Os autores atribuíram a diferença parcialmente aos fatores relacionados com a glicemia. Os resultados ajustados pela análise de regressão múltipla do Modelo 2 foram utilizados na presente metanálise.
Sul-Asiáticos	1352 NI NI				
Bower, 2013 [22] Brancos não-Hispânicos	2612 47,8% 56,7	Transversal	Americanos participantes do estudo NHANES 2005 – 2008. História de DM foi definida por auto-relato ou pelo uso de insulina	HPLC Troca iônica Tosoh A1C G8 Tosoh Corporation	Nos indivíduos sem DM, tanto os negros americanos quanto os negros não-Hispânicos tinham níveis significativamente maiores de A1C comparado com os brancos não-Hispânicos (5,7%; 5,6% e 5,5%, respectivamente). Não houve diferença significativa em relação à retinopatia entre aos grupos.
Negros não-Hispânicos	805 45,3% 53,5				
Americanos Hispânicos	996 49,2% 51,9				
Miranda, 2013 [38] Brancos	190 NI NI	Transversal	Parte dos participantes do estudo CAMELIA 2006-2007. Classificação de DM pelo auto relato de diagnóstico prévio, uso medicação hipoglicemiante e/ou GJ $\geq 126\text{mg/dL}$.	Imunoensaio LabMax 240 Labtest Diagnostica	Adultos afro-brasileiros apresentaram maiores níveis de A1C em comparação com os brancos, mesmo após ajustes para possíveis variáveis de confusão (6,0% e 5,8%, respectivamente). Os negros tinham níveis mais baixos de renda e educação e maior frequência de DM e hipertensão. Os valores de A1C dos 2 grupos incluídos no nosso estudo foram disponibilizados pelo autor.
Negros	156 NI NI				
Tillin, 2013 [39] Brancos Europeus	582 76,9% NI	Coorte	Base populacional tri-étnica do noroeste de Londres. Conforme contato com autor, as análises apresentadas no <i>follow-up</i> foram baseadas em pessoas sem DM diagnosticada.	HPLC Troca iônica Tosoh A1C G8 Tosoh Corporation	Os níveis de A1C foram estatisticamente mais altos nos sul-Asiáticos e Afro-Caribenhos comparados com europeus (6,1%; 6,0% e 5,8%; respectivamente). Após análise multivariada, as diferenças étnicas entre os valores de A1C permaneceram inalteradas.
Afro-Caribenhos	150 51,33% NI				
Sul-Asiáticos	341 82,9% NI				

Tabela 2: Escala de Newcastle-Ottawa adaptada para a avaliação da qualidade dos estudos incluídos nesta metanálise.

Autor (Nº Referência)	Ano	População	Seleção	Delineamento	Classificação da Etnia	Análise Estatística	Pontuação Total ^a
Burden	1999	**	*	**	**	**	9
Likhari	2010	**	**	**	**	**	10
Kehl	2010	**	*	*	**	**	8
Selvin	2011	**	*	**	**	**	9
Champ-Jumbo	2012	**	**	**	**	**	10
Mostafa	2012	*	**	**	**	**	9
Bower	2013	**	*	*	**	**	8
Miranda	2013	**	*	*	**	*	7
Tilin	2013	*	*	*	*	*	5

^a A pontuação total varia de zero a 10 estrelas, estudos com a melhor qualidade pontuam no máximo 10 estrelas.

Apêndice B (Dados Suplementares): Escala de avaliação de qualidade adaptada da escala Newcastle-Ottawa para avaliar a qualidade dos estudos incluídos na meta-análise.

PONTUAÇÃO TOTAL: 10 ESTRELAS

1) População Estudada: Total de estrelas = 2

- a. Descrição completa da população estudada: idade, sexo, origem clínica. Se sim, **duas estrelas**.
- b. Descrição sem um ou mais itens. Se Sim, **uma estrela**.

2) Seleção dos participantes: Total de estrelas = 2

- a. Os participantes foram identificados sem DM por FG e / ou OGTT? Se sim, **duas estrelas**.
- b. Exclusão de DM foi feito por meio de entrevista, a história clínica anterior e / ou história familiar? Se Sim, **uma estrela**.

3) Delineamento do estudo: Total de estrelas = 2

- a. O estudo foi delineado de acordo com objetivo da questão de pesquisa em estudo. Se sim, **duas estrelas**.
- b. O estudo foi delineado para outro objetivo, mas apresentou dados suficientes para nossa análise. Se Sim, **uma estrela**.

4) Classificação da etnia: Total de estrelas = 2

- a. Ofator sob investigação foi bem descrito (Região de estudo e forma de categorização). Se sim, **duas estrelas**.
- b. O fator sob investigação foi parcialmente descrito. Se Sim, **uma estrela**.

5) Análise Estatística: Total de estrelas = 2

- a. Pacientes sem DM tiveram seus resultados de A1C claramente descritas (média, SD e / ou SEM). Em caso afirmativo, **duas estrelas**.
- b. Resultados de A1C para pacientes sem DM foram obtidos após o contato com os autores. Se Sim, **uma estrela**.

Capítulo III

A1C E PREVALÊNCIA DE DOENÇA RENAL DO DIABETES NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Capítulo III

A1C E PREVALÊNCIA DE DOENÇA RENAL DO DIABETES NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

Gabriela Cavagnoli ¹

Ana Laura Pimentel ¹

Priscila Aparecida Correa Freitas ¹

Jorge Luiz Gross ^{1,2}

Joíza Lins Camargo ^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em ciências Médicas: Endocrinologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

² Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre. Brasil

*Autor para Correspondência:

Joiza Lins Camargo

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcellos, 2350; Prédio 12, 4º andar, Porto Alegre, RS, 90035-903, Brazil.

Fax: +55-51-33598127

E-mail address: jcamargo@hcpa.ufrgs.br

Resumo

INTRODUÇÃO- A hiperglicemia é um fator de risco para o comprometimento renal. É recomendado que o rastreamento para a doença renal do diabetes (DRD) seja realizado já no momento do diagnóstico do diabetes (DM) tipo 2 através da avaliação dos níveis de albuminúria.

OBJETIVOS- Avaliar a prevalência de DRD, através da excreção urinária de albumina (EUA) e da estimativa da taxa de filtração glomerular (eTFG) em indivíduos com diagnóstico recente de DM tipo 2 identificados pela hemoglobina glicada (A1C) e avaliar a relação da A1C e dos testes baseados em glicemia com a prevalência de DRD no momento do diagnóstico de DM.

MATERIAL E METODOS: Foram avaliados indivíduos que realizaram o teste oral de tolerância a glicose no HCPA. Glicemia de jejum (GJ), glicemia 2h após ingestão de 75g de glicose (G2h) e EUA foram analisados por colorimetria e imunoturbidimetria, respectivamente (Advia 1800, Siemens Diagnostica). A1C foi determinada por HPLC (2.2 Tosoh Plus A1C, Tosoh Corporation). Os indivíduos foram agrupados de acordo com os níveis de A1C. A análise estatística foi realizada pelo SPSS versão 20.0, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

RESULTADOS - Os níveis e a prevalência de EUA elevada foram maiores nos indivíduos com A1C $\geq 6,5\%$ quando comparados aos indivíduos com A1C $< 5,7\%$, mesmo após ajustes para idade e presença de hipertensão ($p = 0,003$ e $p = 0,01$, respectivamente). Os indivíduos com A1C $\geq 6,5\%$ apresentaram fator de risco para EUA elevada em relação aos indivíduos com A1C $< 5,7\%$ [razão de prevalência = 1,87 (IC 1,24 – 2,81); $p = 0,003$], assim como os indivíduos com A1C 5,7 – 6,4% [razão de prevalência = 1,45 (IC 1,03 – 2,03); $p = 0,031$]. Os testes A1C, GJ e G2h não são eficientes em discriminar indivíduos com EUA elevada, e apresentam desempenho similar [AUC = 0,593 ($p = 0,002$); AUC = 0.601 ($p = 0,01$) e AUC 0.536 ($p = 0,241$), respectivamente].

CONCLUSÃO - Em conclusão, nossos dados indicam que indivíduos com maiores níveis de A1C têm um perfil renal desfavorável já no momento do diagnóstico de DM tipo 2, o que pode ter implicações clínicas no manejo destes pacientes.

INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica que afeta aproximadamente 382 milhões de pessoas no mundo todo e estima-se que em 2035 este número aumente para 592 milhões de indivíduos [1]. A principal característica do DM é a hiperglicemia, que atualmente é diagnosticada através dos testes de hemoglobina glicada (A1C) $\geq 6,5\%$, glicemia de jejum (GJ) ≥ 126 mg/dL e/ou glicemia 2h após a ingestão de 75g de glicose (G2h) ≥ 200 mg/dL, no teste oral de tolerância a glicose (TOTG) [2, 3].

Uma das complicações crônicas mais frequentes do DM é a doença renal do diabetes (DRD), que acomete aproximadamente 35% dos pacientes e é a principal causa de doença renal crônica (DRC) e doença renal em estágio final [4-6]. O rastreamento da DRD é realizado pela avaliação do dano renal, caracterizado pela excreção urinária de albumina (EUA) e estimativa da taxa de filtração glomerular (eTFG) [3]. No entanto, em alguns casos, pacientes com DM podem apresentar DRD com aumento da EUA e eTFG dentro dos níveis de normalidade [7,8]. Em outros casos, observam-se níveis diminuídos de eTFG com níveis normais da EUA. [9].

A detecção precoce de alterações na função renal de pacientes com DM pode proporcionar a realização de medidas interventivas, com o objetivo de evitar ou retardar o aparecimento de complicações associadas [10,11]. Em pacientes com DM tipo 2, é recomendado que os níveis de albuminúria sejam avaliados assim que o diagnóstico de DM seja estabelecido, já que muitos indivíduos podem permanecer sem diagnóstico da doença por longo período [2].

As recomendações para o diagnóstico da DRD incluem a medida da EUA e a eTFG para a classificação da DRD em diferentes estágios de DRC [2, 7]. O rastreamento deve iniciar, preferencialmente, pela determinação da albumina em uma amostra aleatória de urina em função da acurácia diagnóstica, facilidade de coleta e menor custo [12- 14]. Recentemente, os níveis basais elevados de albuminúria, medidos em uma amostra aleatória de urina, foram associados com maior risco de perda de função renal, eventos cardiovasculares e morte em pacientes com DM tipo 2 a longo prazo [15].

Os testes diagnósticos disponíveis para o DM (A1C e/ou testes baseados em glicemia) identificam grupos diferentes de pacientes, com perfis clínicos e bioquímicos distintos, apresentando baixa concordância diagnóstica [16,17]. No entanto, parece que A1C apresenta igual, ou melhor, desempenho que a GJ em identificar indivíduos em risco para desfechos microvasculares, como a DRD e retinopatia [18]. Em adição, há relato que pacientes diagnosticados pela A1C apresentam um perfil de risco favorável à complicações quando comparados àqueles diagnosticados pelos testes baseados na glicemia [19]. Recentemente, um estudo mostrou que os perfis de risco para doença cardiovascular são diferentes entre pacientes

com DM recentemente diagnosticada pelos diferentes critérios de diagnóstico [20]. Entretanto, ainda não está bem definido se estes testes apresentam mesmo desempenho na identificação de pacientes com diferentes graus de DRD, no momento do diagnóstico de DM.

Este estudo tem como objetivo avaliar a prevalência de DRD, através da EUA e da eTFG estimada pela creatinina sérica, em indivíduos com diagnóstico recente de DM tipo 2 identificados pela A1C e avaliar a relação da A1C e dos testes baseados em glicemia com a prevalência de DRD no momento do diagnóstico de DM.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este é um estudo transversal para avaliar a DRD no momento do diagnóstico de DM tipo 2 e sua associação com A1C.

Pacientes

O estudo incluiu indivíduos com mais de 18 anos, sem diagnóstico prévio de DM tipo 2, que foram atendidos no Ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e que se submeteram ao TOTG no período entre setembro de 2008 e maio de 2009. Foram excluídos do estudo: gestantes, pacientes com uremia (ureia >100 mg/dL), anemia [hemoglobina <12 g/dL (se homem) ou <11 g/dL (se mulher)] [21] ou hemoglobinas variantes no cromatograma da A1C [22,23].

Os pacientes elegíveis responderam a um questionário padronizado com informações sobre idade, hábito de fumar, medicamentos em uso, histórico familiar de DM, de doenças cardiovasculares, de doença renal e de hipertensão. Os indivíduos foram classificados como hipertensos quando relatado o uso de anti-hipertensivos ou na presença de alteração na pressão arterial aferida (pressão sistólica ≥ 140 mmHg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mmHg) [24]. Além disso, foram medidos o peso, a altura e a circunferência da cintura (CC) e quadril. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado dividindo o peso pela altura ao quadrado (kg/m^2).

Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participar. O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o número GPPG 10-268.

Classificação dos grupos:

Os indivíduos foram classificados em grupos de acordo com os níveis de A1C no momento do diagnóstico de DM tipo 2: Sem DM – A1C <5,7%; Pré-DM – A1C entre 5,7% e 6,4% e Com DM – A1C ≥6,5%, conforme as recomendações vigentes [2,4]. Os testes baseados na glicemia (GJ ≥126 mg/dL e/ou G2h ≥200 mg/dL) também foram utilizados para o diagnóstico de DM e para determinar a prevalência de DM, detectada por estes critérios, em cada categoria de A1C. A função renal dos participantes foi avaliada de acordo com a EUA e a eTFG [4,7]. Os indivíduos foram classificados como EUA normal (AlbU <14 mg/L) ou EUA elevada (AlbU ≥14 mg/L) [15]. A DRD também foi classificada em diferentes estágios da DRC, de acordo com a EUA e a eTFG: sem DRC - EUA normal (AlbU <14 mg/L) com eTFG ≥60 mL/min; DRC 1 - EUA elevada (AlbU ≥14mg/L) com eTFG normal ou elevada (eTFG ≥90mL/min); DRC 2: EUA elevada (AlbU ≥14mg/L) com eTFG levemente reduzida (eTFG 60 – 89mL/min) e DRC 3: eTFG <60mL/min com EUA normal ou elevada [4,7].

Análises Laboratoriais

Após jejum noturno, as amostras de sangue foram coletadas para determinação de A1C, hemograma, perfil lipídico, creatinina e glicose. Foi administrado 75-g de glicose oral, e a glicose plasmática foi medida após 120 min (G2h). O hemograma foi determinado no ABX Pentra DX 120. Glicemia, colesterol total, HDL e triglicérides (TG) foram determinados por métodos enzimáticos e a creatinina pela reação de Jaffé (Advia 1800, Siemens Diagnostica). Colesterol LDL foi calculado pela equação de Friedewald, se TG <400 mg/dL. A A1C foi determinada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), método calibrado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) e alinhado aos resultados do DCCT (Tosoh 2.2 A1c Plus, Tosoh Corporation, Tóquio, Japão) (<http://www.ngsp.org/docs/methods.pdf>). A eTFG foi estimada pela equação CKD-EPI [25]. Amostra de urina casual foi coletada para determinação da EUA por método imunoturbidimétrico (Advia 1800, Siemens Diagnostica). Níveis de EUA elevados foram confirmados em uma segunda amostra, analisada dentro de um período de três a seis meses [4, 24].

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados estão expressos como média e desvio padrão (DP) quando normalmente distribuídos, e como mediana (intervalo) para variáveis não - paramétricas. Os testes de análise de variância (ANOVA), Kruskal-Wallis e Qui-quadrado foram utilizados quando apropriados. A

EUA foi normalizada por conversão logarítmica para posterior análise de covariância (ANCOVA), onde se controlou o possível efeito da idade e hipertensão sobre os níveis de EUA e eTFG entre os grupos. A regressão de Poisson foi utilizada para controlar o efeito da hipertensão sobre a prevalência de EUA elevada entre os grupos. A associação entre os níveis de albuminúria e níveis de A1C, GJ e G2h foi avaliada pela correlação de Spearman. A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) foi utilizada para avaliar a capacidade da A1C, GJ e G2h para distinguir entre indivíduos com e sem DRD, considerando a EUA (AlbU ≥ 14 mg/L) como critério diagnóstico de referência. A prevalência de DRD e diferentes estágios de DRC foram calculadas para diferentes categorias de A1C (A1C $< 5,5\%$; A1C $\geq 5,5\%$ a $< 6,1\%$; A1C $\geq 6,1\%$ a $< 6,5\%$; A1C $\geq 6,5\%$), GJ (GJ < 100 mg/dL; GJ ≥ 100 mg/dL a < 110 mg/dL; GJ ≥ 110 mg/dL a < 126 mg/dL; GJ ≥ 126 mg/dL) e G2h (G2h < 140 mg/dL; G2h ≥ 140 mg/dL a < 170 mg/dL; G2h ≥ 170 mg/dL a < 200 mg/dL; G2h ≥ 200 mg/dL). A análise por Equações de Estimativas Generalizadas (GEE) foi utilizada para comparar a prevalência de EUA elevada e presença de DRC entre as diferentes categorias de A1C, GJ e G2h. As análises foram realizadas no SPSS versão 20.0. Foi adotada uma significância de 5%.

RESULTADOS

Dos 413 indivíduos incluídos no estudo, 118 (28,6%) foram diagnosticados com DM (Figura 1): 48 foram diagnosticados pela A1C, destes 22 também foram diagnosticados pelos testes de glicemia e 70 foram diagnosticados apenas pelos testes de glicemia (GJ e/ou G2h). A prevalência de EUA elevada e de DRC em qualquer estágio no grupo todo foi de 32,0% e 37,9%, respectivamente.

As características clínicas e laboratoriais dos participantes, de acordo com os níveis de A1C, estão descritas nas tabelas 1 e 2. Os indivíduos com A1C $< 5,7\%$ apresentaram menor idade, IMC, CC e prevalência de diagnóstico de DM pelos testes de glicemia, quando comparados aos indivíduos com A1C $\geq 5,7\%$. A prevalência de hipertensão diferiu entre todos os grupos, sendo maior no grupo com A1C $\geq 6,5\%$.

Os níveis de GJ, G2h e triglicerídios foram significativamente mais elevados conforme o aumento dos níveis de A1C. Não houve diferenças significativas nos níveis de colesterol total, HDL e LDL colesterol e creatinina entre os grupos.

Os níveis e a prevalência de EUA elevada foram maiores nos indivíduos com A1C $\geq 6,5\%$ quando comparados aos indivíduos com A1C $< 5,7\%$. O grupo com A1C $\geq 6,5\%$ apresentou níveis de eTFG semelhantes aos dos indivíduos no grupo com A1C 5,7 – 6,4%, assim como a prevalência de DRC nos estágios 1 e 2, diferindo dos indivíduos com A1C $< 5,7\%$. Contudo, a

prevalência de DRC em estágio 3 foi maior no grupo com A1C $\geq 6,5\%$ quando comparados aos indivíduos com A1C $< 5,7\%$.

Após ajustes para idade e hipertensão, através de ANCOVA, a diferença na eTFG entre os grupos com A1C $\geq 6,5\%$ e A1C $< 5,7\%$ não apresentou mais significância, porém os níveis de EUA permaneceram significativamente diferentes entre estes grupos ($p=0,003$). Após ajuste para a presença de hipertensão, pela regressão de Poisson, a prevalência de EUA elevada entre os grupos com A1C $\geq 6,5\%$ e A1C $< 5,7\%$ continuou significativa ($p= 0,01$). Os indivíduos com A1C $\geq 6,5\%$ apresentaram fator de risco para EUA elevada em relação aos indivíduos com A1C $< 5,7\%$ [razão de prevalência =1,87 (IC 1,24 – 2,81); $p=0,003$], assim como os indivíduos com A1C 5,7 – 6,4% [razão de prevalência =1,45 (IC 1,03 – 2,03); $p =0,031$].

Quando avaliamos a capacidade da A1C, GJ ou G2h para distinguir entre indivíduos com e sem DRD através da análise das curvas ROC, observamos que os testes A1C, GJ e G2h não são eficientes em discriminar indivíduos com EUA elevada, e apresentam desempenho similar [AUC = 0,593 ($p = 0,002$); AUC = 0.601 ($p= 0,01$) e AUC 0.536 ($p = 0,241$), respectivamente] (Figura 2).

Os níveis de albuminúria apresentaram fraca correlação positiva significativa com os níveis de A1C e GJ ($r =0.164$ e $r =0,144$; $p <0.01$, respectivamente) e não houve correlação significativa com os níveis de G2h ($r =0,057$; $p =0.246$).

A prevalência de DRD (EUA $\geq 14\text{mg/dL}$) não foi diferente entre as diferentes categorias de A1C, GJ e G2h (p valor da interação= 0,068; Figura 3), bem como a prevalência de DRC (p valor da interação =0,108).

DISCUSSÃO

Os principais achados do nosso estudo são: (1) níveis de albuminúria e a prevalência de EUA são maiores em pacientes com A1C $\geq 6,5\%$ no momento diagnóstico em relação aos indivíduos com A1C $< 5,7\%$, mesmo após ajustes para idade e presença de hipertensão; (2) indivíduos com A1C $\geq 6,5\%$ apresentam risco elevado para EUA aumentada em comparação aos indivíduos com A1C $< 6,5\%$; (3) a DRC é menos prevalente em indivíduos com A1C $< 5,7\%$; (4) existe um percentual significativo de indivíduos com diagnóstico de DM pelos testes de glicemia entre os grupos classificados pela A1C, sendo menor nos indivíduos com A1C $< 5,7\%$ e (5) A1C, GJ e G2h apresentam baixo desempenho em detectar DRD.

A A1C foi introduzida como teste diagnóstico em 2010 [2,3] e conforme o comitê internacional de especialistas [25] que recomendou seu uso, o ponto de corte A1C $\geq 6,5\%$ é sensível e específico para identificar indivíduos com risco para retinopatia diabética. Estudos

prévios mostram que A1C tem maior associação com retinopatia, mas esta associação é contínua em todo espectro glicêmico, não existindo um limiar [3,18]. Outros estudos realizados para avaliar perfil de risco para doença cardiovascular mostraram que indivíduos identificados com DM pela A1C têm um perfil de risco macrovascular desfavorável [19,20]. Entretanto, poucos estudos avaliaram a associação da A1C com as complicações renais do diabetes. Em uma avaliação prospectiva da associação da A1C com a incidência de DRC foi demonstrado que os valores basais de A1C elevados estão associados a um maior risco de DRC mesmo na ausência de DM [18]. Recentemente, foi relatado que pacientes identificados com DM pela A1C possuem uma tendência a níveis mais elevados de albuminúria [19]. Nosso estudo é o primeiro a avaliar a prevalência de DRD no momento do diagnóstico de DM utilizando a A1C. Nossos resultados indicam que há um aumento de risco significativo para EUA alterada nos indivíduos com A1C $\geq 6,5\%$, reforçando a ideia de que A1C elevada está relacionada com as complicações do DM já no momento do diagnóstico, dados que complementam nossos achados anteriores em relação a A1C identificar populações diferentes [17]. Quando comparamos o desempenho da A1C com a GJ e G2h para identificar indivíduos com EUA alterada observamos que os 3 testes não são eficientes para discriminar estes indivíduos, o que é corroborado pela fraca ou inexistente correlação destes testes com os níveis de albuminúria. Além disso, a prevalência de DRD em qualquer estágio não foi diferente entre as diferentes categorias dos testes A1C, GJ, G2h. Estes dados estão em acordo com relatos anteriores [26], reforçando que a A1C é tão boa quanto os testes baseados na glicemia para definir os níveis de hiperglicemia em que a prevalência da DRD aumenta. Em adição, a A1C apresenta a vantagem de ser um teste com questões pré-analíticas e de variação biológica mais favoráveis.

Uma importante força do nosso estudo é que procuramos eliminar possíveis fatores que poderiam interferir nos resultados da A1C, como anemia, hemoglobinopatia e uremia. No entanto, este estudo apresenta algumas limitações. Por ser um estudo transversal, a causalidade entre níveis de A1C e a presença de DRD não pode ser analisada. Os indivíduos incluídos no estudo são provenientes de um grupo em investigação para a presença de DM, desta forma a chance de apresentarem perfil de risco para desenvolvimento de DM e suas complicações associadas é maior no que na população em geral.

Em conclusão, nossos dados indicam que indivíduos com maiores níveis de A1C têm um perfil renal desfavorável já no momento do diagnóstico de DM tipo 2, o que pode ter implicações clínicas no manejo destes pacientes. Estudos prospectivos, para avaliar os padrões de risco associados aos diferentes critérios diagnósticos, são necessários para ampliar o conhecimento sobre este tema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 6th Edition 2013.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care, 2014.
3. WHO. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization, 2011.
4. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes SBD 2013-2014.
5. Bruno RM, Gross JL. Prognostic factors in Brazilian diabetic patients starting dialysis: a 3.6-year follow-up study. J Diabetes Complications. 2000; 14:266-71.
6. Lugon JR. End-stage renal disease and chronic kidney disease in Brazil. Ethn Dis. 2009; 19:S1-7-9.
7. KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes). KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Official Journal of the International Society of Nephrology. 2013; 3(1):1-150.
8. National Kidney Foundation. KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update. Am J Kidney Dis 2012; 60:850–886.
9. Kramer CK1, Leitão CB, Pinto LC, Silveiro SP, Gross JL, Canani LH. Clinical and laboratory profile of patients with type 2 diabetes with low glomerular filtration rate and normoalbuminuria. Diabetes Care. 2007 Aug; 30(8):1998-2000.
10. DCCT - The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med 1993; 329:977-86.
11. U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). Lancet 1998; 352:837-51.
12. Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira JR, Paggi A, TatschM, Azevedo MJ. The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy. Diabetes Care. 1997; 20(4):516-519.

13. Incerti J, Zelmanovitz T, Camargo JL, Gross JL, de Azevedo MJ. Evaluation of tests for microalbuminuria screening in patients with diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(11):2402-2407.
14. Wu HY, Peng YS, Chiang CK, Huang JW, Hung KY, Wu KD, Tu YK, Chien KL. Diagnostic performance of random urine samples using albumin concentration vs ratio of albumin to creatinine for microalbuminuria screening in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2014 Jul; 174(7): 1108-15.
15. Viana L, Gross JL, Camargo JL, Zelmanovitz T, Rocha E, Azevedo MJ. Prediction of cardiovascular events, diabetic nephropathy, and mortality by albumin concentration in a spot urine sample in patients with type 2 diabetes. *J Diab Complications*. 2012; 26:407-12.
16. Kramer CK, Araneta MR, Barrett-Connor E. A1C and diabetes diagnosis: The Rancho Bernardo Study. *Diabetes Care*. 2010; 33(1): 101-3.
17. Cavagnoli G, Comerlato J, Comerlato C, Renz PB, Gross JL, Camargo JL. HbA1c measurement for the diagnosis of diabetes: is it enough? *Diabet. Med*. 2011;28; 31–35.
18. Selvin E, Ning Y, Steffes MW, Bash LD, Klein R, Wong TY, Astor BC, Sharrett AR, Brancati FL, Coresh J. Glycated hemoglobin and the risk of kidney disease and retinopathy in adults with and without diabetes. *Diabetes*. 2011 Jan; 60(1):298-305.
19. Borg R, Vistisen D, Witte DR, Borch-Johnsen K. Comparing risk profiles of individuals diagnosed with diabetes by OGTT and HbA1c. The Danish Inter99 study. *Diabetic Medicine*. 2010; 27(8):906–910.
20. Qie LY¹, Sun JP, Ning F, Pang ZC, Gao WG, Ren J, Nan HR, Zhang L, Qiao Q; Qingdao Diabetes Survey Group in 2006 and 2009. Cardiovascular risk profiles in relation to newly diagnosed Type 2 diabetes diagnosed by either glucose or HbA1c criteria in Chinese adults in Qingdao, China. *Diabet Med*. 2014 Aug;31(8):920-6.
21. Astor BC, Muntner P, Levin A. Association of kidney function with anemia: the Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). *Arch Intern Med* 2002; 162 (12) 1401-8.
22. Camargo JL, Gross JL. Conditions associated with very low values of glycohaemoglobin measured by an HPLC method. *J Clin Path*, 57(4):344-45, 2004.
23. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, Lernmark A, Metzger BE, Nathan DM; National Academy of Clinical Biochemistry; Evidence – Based

Laboratory Medicine Committee of the American Association for Clinical Chemistry .Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2011 Jun; 34(6): e61-99.

24. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes- 2014. Diabetes Care. 2014; 36 Suppl 1:S14-80. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. Ann Intern Med. 2009; 150 (9): 604–612.

25. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro AF, Feldman HI, Kusek JW, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. Ann Intern Med. 2009; 150 (9): 604–612.

26. International Expert Committee. The International Expert Committee report on the role of the HbA1c assay in the diagnosis of diabetes. Diabetes Care 2009; 32:1327-34.

Tabela 1. Características clínicas de acordo com os níveis de A1C.

	Sem DM A1C <5,7	Pré-DM A1C 5,7-6,4	DM A1C ≥6,5%	P
N	175	190	48	-
Mulheres (%)	99 (56,6)	130 (68,4)	30 (62,5)	0,65
Idade (anos)	52,6±12,4	59,4±11,6	62,73±12,15	<0,001 ¹
IMC (kg/m ²)	26,8±5,3	29,2±6,0	30,5±5,4	<0,001 ¹
CC (cm)	93,2±12,3	99,1±10,8	103,62±12,73	<0,001 ¹
Fumantes (%)	36 (20,8)	30 (15,8)	13 (27,1)	0,06
Hipertensos (%)	79 (45,7)	125 (66,1)	39 (81,2)	<0,001*
Usuários de aspirina (%)	28 (16,2)	39 (20,5)	10 (20,8)	0,528
Usuários de estatina (%)	36 (20,8)	51 (26,8)	12 (25)	0,401
Usuários de inibidores da ECA (%)	55 (31,8)	68 (35,8)	23 (47,9)	0,118
HF-DCV (%)	111 (64,2)	128 (67,4)	33 (68,8)	0,731
HF-DM (%)	82 (47,4)	106 (55,8)	24 (50)	0,562
HF-DR (%)	43 (24,9)	51 (26,8)	17 (35,4)	0,432
HF-H (%)	127 (73,4)	138 (72,6)	33 (68,8)	0,862
DM pela glicemia (%)	21 (12)	49 (25,8)	22 (45,8)	<0,001 ¹

Dados estão expressos como média ± DP ou N (%). **CC:** circunferência da cintura; **HF-DCV:** histórico familiar de doença cardiovascular; **HF-DM:** histórico familiar de diabetes mellitus; **HF-DR:** histórico familiar de doença renal; **HF-H:** histórico familiar de hipertensão ¹ diferença significativa entre os grupos sem DM e pré DM e com e sem DM. * diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2. Características laboratoriais de acordo com os níveis de A1C.

	Sem DM A1C <5,7	Pré-DM A1C 5,7-6,4	DM A1C ≥6,5%	P
N	175	190	48	-
GJ (mg/dL)	100,0 (93,0-107,2)	109,0 (100,5-116,5)	121,0 (108,0-137,0)	<0,001*
G2h (mg/dL)	121,0 (95,0-154,5)	138,0 (114,5-180,5)	187,0 (163,0-282,0)	<0,001*
Triglicérides (mg/dL)	128,0 (92,7-196,2)	148,0 (110,0-212,0)	169,0 (131,5 – 233,5)	0,009 ¹
Colesterol total (mg/dL)	190,4±44,9	201,6±41,6	209,05±65,41	0,06
HDL (mg/dL)	48,6±14,6	48,6±13,2	45,89±12,04	0,54
LDL (mg/dL)	121,6±43,3	129,1±40,6	138,48±58,23	0,10
Creatinina (mg/dL)	0,83±0,2	0,86±0,2	0,90±0,2	0,142
eTFG (ml/min/1.73m ²)	93,1±18,5	84,5±20,1	79,89±20,92	<0,001 ²
EUA (mg/L)	6,3 (3,2-13,5)	7,8 (4,0-26,5)	12,6 (3,7-60,4)	0,001 ¹
EUA elevada (%)	41 (23,4)	68 (35,8)	23 (47,9)	0,002 ¹
EUA elevada (mg/L)	36,6 (22,8-74,5)	31,7 (18,9-64,0)	52,1 (23,8-114,0)	0,258
DRC (%)				0,001 ³
DRC 1	15 (8,9)	28 (16,0)	7 (15,6)	
DRC 2	18 (10,6)	29 (16,6)	10 (22,2)	
DRC 3	11 (6,5)	20 (11,4)	9 (20,0)	

* diferença significativa entre os grupos. ¹diferença significativa entre os grupos com e sem DM. ²diferença significativa entre os grupos sem DM e pré DM e com e sem DM. ³ DRC: diferença significativa entre todos os grupos; DRC 1 e 2: diferença significativa entre grupos sem DM e pré DM e com e sem DM; DRC 3: diferença significativa entre grupos com e sem DM.

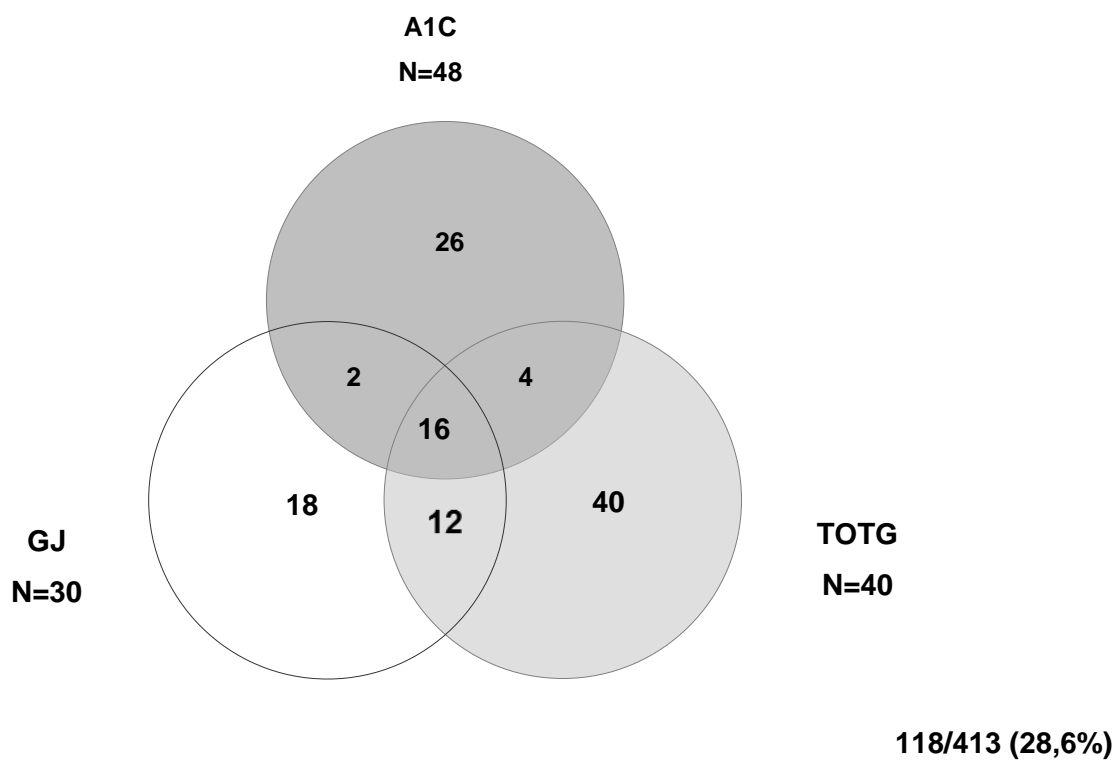


Figura 1. Prevalência de diabetes mellitus (DM) no grupo estudado conforme os diferentes critérios diagnósticos: glicemia de jejum (GJ), teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e hemoglobina glicada (A1C).

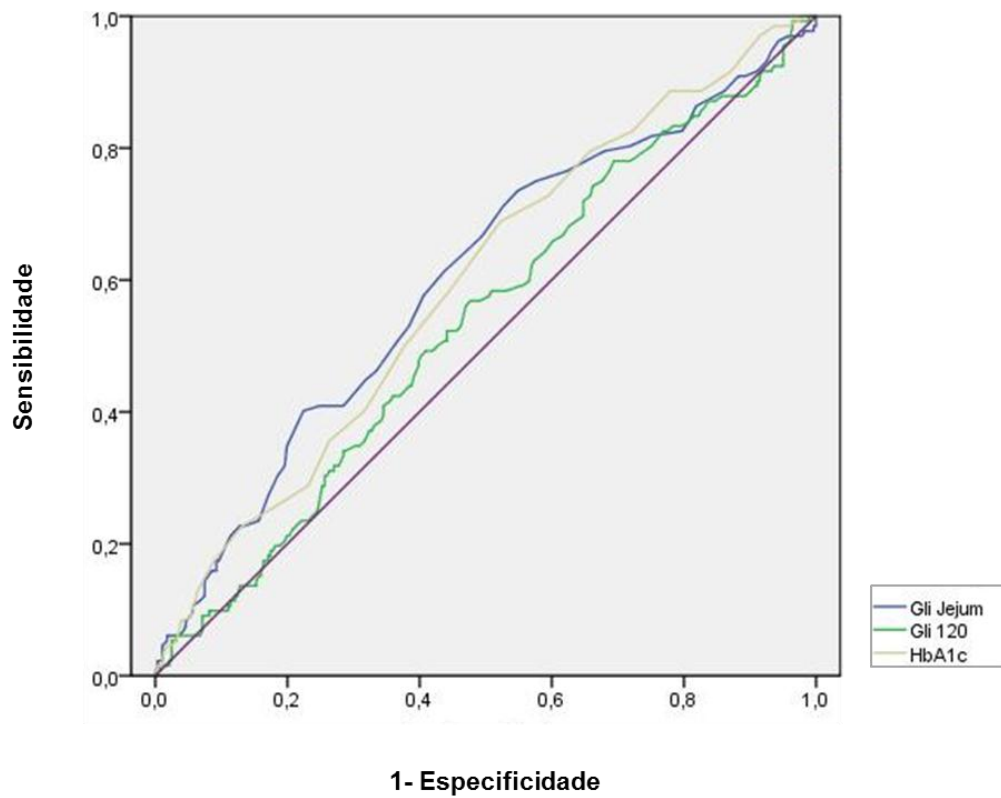


Figura 2. Curvas ROC para identificar indivíduos com excreção urinária de albumina elevada (EUA) (EUA \geq 14mg/dL).

[AUC = 0,593 ($p = 0,002$); AUC = 0.601 ($p= 0,01$) e AUC 0.536 ($p = 0,241$), para A1C, GJ e G2h, respectivamente].

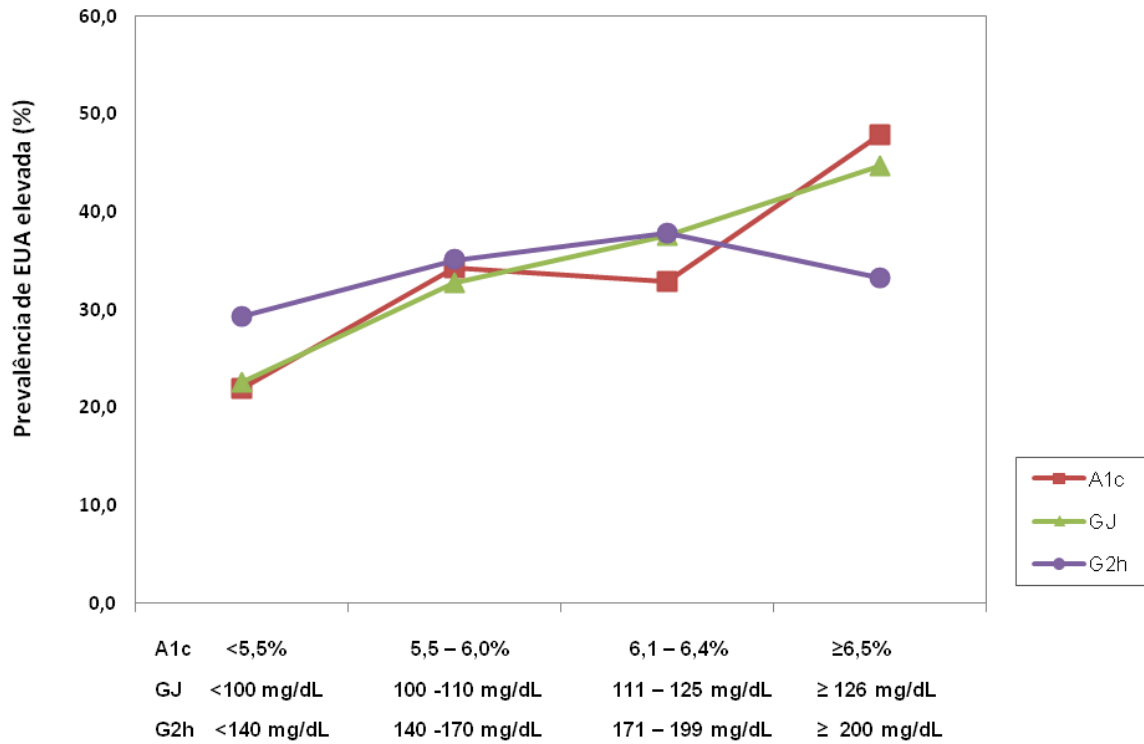


Figura 3. Prevalência de excreção urinária de albumina alterada (EUA ≥ 14 mg/L) conforme os níveis de A1C, glicemia de jejum (GJ) e glicemia 2h após teste oral de tolerância à glicose (G2h).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As principais contribuições do nosso trabalho são: (1) Os efeitos de HbAS e uremia em níveis de A1C em indivíduos sem DM estão dentro da variação individual esperado e não devem afetar a interpretação dos resultados de A1C para diagnosticar DM. No entanto, os efeitos da anemia por deficiência de ferro e/ou deficiência de ferro permanecem inconclusivos já que alguns estudos disponíveis mostram resultados opostos; (2) As diferenças encontradas nos níveis de A1C entre as diferentes etnias são relevantes quando se considera o uso da A1C como critério diagnóstico utilizando apenas um ponto de corte para todas as populações, sem considerar a origem étnica. Em adição, o uso do mesmo valor alvo de A1C para o controle glicêmico nestas diferentes populações pode acarretar em um risco aumentado a hipoglicemia; (3) indivíduos com maiores níveis de A1C tem um perfil renal desfavorável já no momento diagnóstico de DM tipo 2.

Como perspectivas futuras, novos estudos para avaliar o efeito dos fatores interferentes nos resultados da A1C em indivíduos com DM devem ser realizados. Estudos prospectivos para avaliar padrões de risco associados aos diferentes critérios diagnósticos são necessários para ampliar o conhecimento.