

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

**Avaliação do efeito da uremia em diferentes métodos de determinação da A1c em
pacientes com e sem Diabetes mellitus**

Dissertação de Mestrado

Alexandre Costa Guimarães

Porto Alegre, 27 de fevereiro de 2015.

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

**Avaliação do efeito da uremia em diferentes métodos de determinação da A1c em
pacientes com e sem diabetes mellitus**

Alexandre Costa Guimarães

Orientadora: Prof^a Dr^a Joíza Lins Camargo

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Endocrinologia.

Porto Alegre, 27 de fevereiro de 2015.

CIP - Catalogação na Publicação

Costa Guimarães, Alexandre

Avaliação do efeito da uremia em diferentes métodos de determinação da Alc em pacientes com e sem Diabetes mellitus / Alexandre Costa Guimarães. -- 2015.

40 f.

Orientadora: Joíza Lins Camargo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Diabetes Mellitus. 2. Hemoglobina glicada. 3. Uremia. 4. Hemoglobina Carbamilada. 5. Métodos Diagnósticos Laboratorial. I. Lins Camargo, Joíza, orient. II. Título.

O formato da dissertação segue o modelo recomendado pelo PPG em Ciências Médicas: Endocrinologia – UFRGS, sendo apresentada na forma de uma fundamentação teórica sobre o tema, seguido de um artigo original contendo os resultados finais.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO:.....	6
Capítulo I	8
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	8
OBJETIVO	17
Capítulo II	18
Avaliação do efeito da uremia em diferentes métodos de determinação da A1c em pacientes com e sem Diabetes mellitus.....	18
Conclusão.....	31

AGRADECIMENTOS

Dedico especial agradecimento à Prof.^a Doutora Joiza Lins Camargo, orientadora que com sabedoria soube dirigir-me os passos e os pensamentos para o alcance de meus objetivos. Agradeço pela sua disponibilidade e incentivo que foram fundamentais para realizar e prosseguir este estudo. Saliento o apoio incondicional prestado, a forma interessada, extraordinária e pertinente como acompanhou a realização deste trabalho. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões foram fundamentais ao longo de todo o percurso. Não posso esquecer a sua grande contribuição para o meu crescimento como profissional, desde os tempos da graduação. Eternamente grato por todo o apoio.

À minha esposa Juliana de Paoli, minha eterna companheira, obrigado pelo apoio incondicional e por compreender e aceitar os momentos que estive ausente nesses últimos dois anos. Ao meu filho Miguel que chegou trazendo e despertando alegrias, sorrisos, emoções que nunca antes tinha sentido.

Aos colegas do grupo de pós-graduação Ana Laura Pimentel, Priscila Aparecida Correa Freitas, Paula Renz, Ana Paula Aguiar e Gabriela Cavagnolli pelo apoio recebido na realização desse trabalho.

Aos colegas do Serviço de Patologia Clínica pelo incentivo e apoio.

Aos demais amigos e familiares que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO:

O diabetes mellitus (DM) é definido como um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia e está associada a complicações, disfunções e insuficiência de múltiplos órgãos, especialmente, rins, coração, cérebro, vasos sanguíneos e olhos. A doença renal do diabetes (DRD) é uma das mais relevantes complicações. Nas últimas décadas, a nefropatia diabética se tornou a principal causa da fase final da doença renal no mundo ocidental. Para auxiliar no monitoramento e controle glicêmico dos pacientes com DM existem técnicas laboratoriais que medem as proteínas glicadas, entre elas a hemoglobina glicada (A1c). Um aumento do nível de A1c tem sido relatado em pacientes sem DM com insuficiência renal, independente da glicemia, e apesar do menor tempo de vida dos eritrócitos nestes pacientes. Várias hipóteses foram formuladas para explicar esse fato e de acordo com alguns investigadores, o aumento na A1c em pacientes sem DM com doença renal foi atribuído principalmente à carbamilação de hemoglobina. O estado urêmico pode afetar a acurácia da determinação de A1c, através da modificação da hemoglobina, formando um composto carbamilado que eleva os resultados de A1c nos métodos com base em separação iônica ou HPLC. No entanto existem controvérsias na literatura sobre o efeito da uremia nos níveis de A1c determinados pelos diferentes métodos disponíveis. Apesar disso, A1c é utilizada para o monitoramento da glicemia em pacientes com DRD. Contudo, há necessidade de uma definição se a uremia interfere ou não nos diferentes métodos para dosagem de A1c, visando garantir a qualidade final e interpretação correta dos resultados de A1c em pacientes uremicos, sendo eles diabéticos ou não diabéticos. Neste trabalho avaliamos quatro métodos diferentes de determinação de A1c: equipamento Variant II Turbo – HPLC por troca iônica, Tosoh A1c 2.2 – HPLC por troca iônica, Advia 1800 – Imunoturbidimetria e Capillarys 2 Flex Piercing - Eletroforese capilar. Nossos resultados mostraram que em amostras de pacientes sem DM não há interferência da uremia ou hemoglobina carbamilada, porém em amostras de pacientes com DM, a uremia interfere nos resultados de A1c principalmente em amostras com níveis de A1c mais elevados. Portanto a utilização do teste de A1c no monitoramento da glicose nos pacientes com DM e com uremia deve ser realizada com cautela, pois os métodos avaliados podem superestimar os valores de A1c nesses pacientes.

Palavras Chaves: Métodos, hemoglobina glicada, uremia e hemoglobina carbamilada.

ABSTRACT:

Diabetes mellitus (DM) is defined as a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia and associated complications, affecting especially kidneys, heart, brain, blood vessels, and eyes. Diabetes renal disease (DRD) is one of the most important and common complication. In recent decades, it has become the leading cause of end-stage renal disease in the Western world. Laboratories techniques that measure glycosylated proteins, such as glycosylated hemoglobin (A1c), may assist in the monitoring and in the glycemic control of patients with DM. An increase in A1c level has been reported in patients without DM with renal impairment, regardless of blood glucose, and despite the shortened life of erythrocytes in these patients. Several hypotheses have been suggested to explain this fact and, according to some researchers, the increase in A1c in patients without DM with kidney disease was mainly attributed to hemoglobin carbamylation. The uremic state can affect the accuracy of A1c determination by modification of hemoglobin to form a compound that increases the carbamylated A1c results in methods based on charge separation. However there is controversy in the literature on the effect of uremia in A1c levels determined by different methods. Nevertheless, A1c is still used for monitoring blood glucose in patients with DRD. However, there is need to define if uremia affects the different methods for A1c measurement to ensure the final quality and correct interpretation of results in uremic patients. In this work we evaluated four different methods to measure A1c: Variant II Turbo HPLC ion exchange, Tosoh A1c 2.2 - HPLC ion exchange, Advia 1800 - immunoturbidimetry and Capillarys 2 Flex Piercing - Capillary electrophoresis. Our results showed that there is no interference of uremia or carbamylated hemoglobin in A1c results of patients without DM, however, in samples from patients with DM, uremia affects the results of A1c, mainly in samples with higher A1c levels. Therefore the use of the A1c test for glucose monitoring in patients with DM and uremia should be performed with caution, because A1c values can be overestimated in these patients.

Key words: methods, glycosylated hemoglobin, blood urea and carbamylated hemoglobin.

Capítulo I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Diabetes mellitus (DM) é um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos em que os níveis de glicose no sangue são elevados [1]. Esta doença crônica é responsável por significativa morbidade, mortalidade, e custo ao sistema de saúde [2]. Além disso, é o conjunto mais comum dos distúrbios do metabolismo de carboidratos, afetando aproximadamente 371 milhões de pessoas no mundo [3]. Nas Américas, a prevalência de DM é de 11% para ambos os sexos [4]. No Brasil, conforme dados do Ministério da Saúde de 2011, a prevalência de diabetes é de 5,2% em homens e 6,0% em mulheres [5]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o país tenha 11,3 milhões de indivíduos com diabetes melito no ano de 2030 e que as perdas na produção econômica do Brasil, por conta da DM entre outras doenças, serão na ordem de 4,18 bilhões de dólares até o final de 2015 [6,7]. Além disso, com relação às mortes por DM, em 2009 o Sistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde registrou 52.104 mortes por causa da doença. Em 2010, esse número subiu para 54.542 [5].

O DM está associado a várias complicações crônicas e é a principal causa de doença renal terminal, a causa mais comum de amputações não traumáticas, além de ser a principal causa de cegueira em adultos com idades entre 20 e 74 anos [1]. A neuropatia diabética ocorre em 60% - 70% das pessoas com DM. A maioria das mortes relacionadas com a doença, no entanto, está relacionada com o risco aumentado de desenvolvimento de doença aterosclerótica. Pessoas com DM têm, pelo menos, duas a quatro vezes mais chances ter doença cardíaca e doença cerebrovascular do que aqueles sem DM [2].

Nesse contexto, a doença renal do diabetes (DRD) e a retinopatia são as complicações mais relevantes do diabetes. Nas últimas décadas, a DRD se tornou a principal causa da fase final da doença renal no mundo ocidental, com estimativas indicando que o DM tipo 2 contribui com a maior proporção de pacientes em programas de terapia de hemodiálise e transplante renal [8].

Para auxiliar no monitoramento e controle glicêmico dos pacientes diabéticos, existem técnicas laboratoriais que medem as proteínas glicadas, entre elas a hemoglobina glicada (A1c), que foi inicialmente identificada em pacientes com DM há quase 50 anos atrás [9].

A A1c é o produto de uma reação não enzimática entre hemoglobina circulante e glicose. Normalmente o ciclo de vida dos eritrócitos é de 120 dias, logo os níveis de A1c refletem a exposição longitudinal das células vermelhas para a glicose. A taxa de glicação pode ser influenciada pela temperatura, pH, volume de glóbulos vermelhos, concentração de hemoglobina, concentração de glicose, e tempo de exposição à glicose [10].

Um aumento do nível de A1c tem sido relatado em pacientes não diabéticos com insuficiência renal, independente da glicemia e apesar do menor tempo de vida dos eritrócitos nestes pacientes. Várias hipóteses foram formuladas para explicar esse fato e de acordo com alguns investigadores, o aumento na A1c em pacientes não diabéticos com nefropatia foi atribuído principalmente à carbamilação de hemoglobina [11,12]. A uréia é um dos metabólitos que se acumulam no plasma de pacientes com doença renal [13]. Fisiologicamente, a uréia dissocia-se espontaneamente em cianato de amônia [14,15]. No entanto, a uréia reage com a molécula de hemoglobina no mesmo sítio onde a glicose reage, formando uma hemoglobina carbamilada (CHb), a qual possui ponto isoelétrico semelhante ao da A1c. Como consequência, a CHb poderia ser medida como A1c em métodos baseados na separação por carga, como os HPLCs (*High-performance liquid chromatography*) usando cromatografia de troca iônica e talvez resultando em maiores porcentagens de A1c e valores falsamente elevados em amostras de pacientes urêmicos [12].

Em 2011, a Associação Americana de Diabetes (ADA) publicou pela primeira vez a vez nas recomendações para o diagnóstico e monitoramento de DM, que o teste A1c, já amplamente utilizado na monitorização de rotina de longo prazo do estado da glicemia em pacientes com DM, é um dos critérios diagnóstico de escolha, considerando o valor de A1c $\geq 6,5\%$ o ponto de corte para DM [1].

Estudos clínicos já documentaram a relação positiva entre o controle glicêmico, através da quantificação longitudinal de A1c, e os riscos para o desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do diabetes [16,17]. De acordo com o *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) o risco de desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do DM tipo 1 está intimamente relacionado com o grau de controle metabólico da glicose, medido pela A1c [16]. Estes dados aplicam-se para os pacientes com DM tipo 2, conforme os resultados do *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) [17].

Como o teste A1c é o teste de escolha para o diagnóstico e monitoramento do DM e suas complicações, para utilizarmos este teste como controle dos níveis de glicemia nos pacientes com DM, é necessário um rígido controle das variáveis pré-analíticas e biológicas as quais, a espécime sanguínea pode estar sujeita [18]. Além da concentração glicêmica, o ensaio e valores de A1c são afetados por outros fatores, incluindo, uremia, alcoolismo, hiperbilirrubinemia, e tempo de vida das células vermelhas na corrente sanguínea [18,19].

Como mencionado anteriormente, o estado urêmico pode afetar a acurácia da determinação de A1c, através da modificação da hemoglobina, formando um composto carbamilado que eleva os resultados de A1c nos métodos com base em separação iônica ou HPLC [11,12]. Esta interferência pode ocorrer em outros métodos laboratoriais para a medida de A1c [20]. A carbamilação da hemoglobina depende tanto dos níveis de concentração da uréia no sangue do paciente, como também da duração da exposição do sangue a uréia [20].

Atualmente existem recomendações para que os laboratórios usem apenas métodos de ensaio para A1c que sejam certificados pelo Programa Nacional de Padronização da Hemoglobina Glicada (NGSP). Os fabricantes de ensaios para A1c podem solicitar a certificação de seus equipamentos e obter calibradores padrão com rastreabilidade dos reativos utilizados no exame ao método de referência recomendado pela Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) [18].

Os métodos comercialmente disponíveis para análise de A1c são: imunoenaios, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade com boronato, métodos enzimáticos e eletroforese [21]. Existem controvérsias na literatura sobre o efeito da uremia nos níveis de A1c nos diferentes métodos disponíveis (Tabela 1) [12, 20, 25-34]. Estudos importantes das décadas de 80 e 90 relatam que a uremia superestima valores de A1c em diferentes métodos, enquanto trabalhos mais atuais relatam não haver efeitos significativos nos resultados [12, 20, 25-34]. Adicionalmente, o uso da A1c como teste diagnóstico do DM em pacientes uremicos deve ser interpretado a luz dessa limitação. Também, há uma escassez de dados na literatura sobre qual o melhor teste para utilizar no controle glicêmico de pacientes com DRC devido às diversas variáveis que podem afetar os resultados de A1c [22]. É necessária uma melhor avaliação das variáveis biológicas, pré-analíticas e analíticas que possam vir a interferir na dosagem de A1c nessas diferentes metodologias.

Sendo assim, há necessidade de uma definição se a uremia interfere ou não nos diferentes métodos para dosagem de A1c, visando garantir a qualidade final e interpretação correta dos resultados de A1c em pacientes com uremia, estando eles com DM ou sem DM.

Tabela 1

Revisão da literatura sobre a possível interferência de uremia ou hemoglobina carbamilaada nos métodos usados para dosagem de A1c

Autor	Ano	País	Metodologia Avaliada	Tipo de Carbamilação	Estado dos pacientes/amostras	Interferência da Uremia no método
Bannon P et al.	1984	Canadá	HPLC	In vivo	Com e sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	SIM
Weykamp CW et al.	1993	Holanda	HPLC, Eletroforese, Enzima Imunoensaio, Cromatografia de Afinidade	In vitro e In vivo	Carbamilação in vitro Com e sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	SIM
Herruer MH et al.	1994	Holanda	HPLC, Eletroforese*, Cromatografia de Afinidade	In vivo	Com e sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	SIM, *NÃO
Hansen KW et al.	1997	Dinamarca	HPLC, Imunoensaio*	In vivo	Com e sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	SIM, *NÃO
Chevenne D et al.	1998	França	HPLC, Enzima Imunoensaio, Cromatografia de Afinidade	In vitro	Sem carbamilação e com carbamilação in vitro	NÃO
Weykamp CW et al.	1999	Holanda	HPLC, Enzima Imunoensaio*, Cromatografia de Afinidade*, Eletroforese Capilar*	In vitro	Duas amostras liofilizadas, uma de paciente com uremia, outra de paciente sem uremia	SIM, *NÃO
Chachou A et al.	2000	França	HPLC, Imunoensaio	In vivo	Sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	NÃO
Little RR et al.	2002	EUA	HPLC, Imunoensaio	In vivo	Com e sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	NÃO
Meijs MF et al.	2008	Holanda	Enzima Imunoensaio, Cromatografia de Afinidade	In vivo	Com e sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	NÃO
Szymezak J et al.	2009	França	HPLC, Enzima Imunoensaio, Cromatografia de Afinidade	In vivo	Com e sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	NÃO
Little RR et al.	2013	EUA	HPLC, Imunoensaio	In vivo	Sem Diabetes mellitus, Com e sem Uremia	NÃO
Li Q et al.	2014	China	HPLC, Enzima Imunoensaio, Cromatografia de Afinidade	In vivo	Com Diabetes mellitus, Com Uremia	NÃO

Pacientes com uremia podem ser considerados com ou sem doença renal crônica. * não houve interferência de uremia no método específico

REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; 35 (1): S64 – S71, 2012.
2. Huang ES, Basu A, O'Grady M, Capretta JC. Projecting the future diabetes population size and related costs for the U.S. *Diabetes Care*. 2009 Dec;32(12):2225-9.
3. World Health Organization - *NCD Country Profiles* , 2011. Disponível em: http://www.who.int/nmh/countries/bra_en.pdf acesso em 06/10/2014.
4. World Health Organization, Global status report on noncommunicable diseases 2010 - Description of the global burden of NCDs, their risk factors and determinants. Chapter 1 – Burden: mortality, morbidity and risk factors. Disponível em: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/; acesso em 05/10/2014.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.
6. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004 May;27(5):1047-53.
7. Abegunde DO, Mathers CD, Adam T, Ortegon M, Strong K. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2007 Dec 8;370(9603):1929-38.
8. Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis*. 1999 Nov;34(5):795-808.
9. Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM. Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1969 Aug 22;36(5):838-43

10. Ansari A, Thomas S, Goldsmith D. Assessing Glycemic Control in Patients With Diabetes and End-Stage Renal Failure American Journal of Kidney Diseases. 2003 March; 41(3): 523-531.
11. Smith WG, Holden M, Benton M, Brown CB. Glycosylated and carbamylated haemoglobin in uraemia. Nephrol Dial Transplant. 1989;4(2):96-100.
12. Weykamp CW, Miedema K, de Haan T, Doelman CJ. Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. Clin Chem. 1999 Mar;45(3):438-40.
13. Lee JA, Lee HA, Sadler PJ. Uraemia: is urea more important than we think? Lancet. 1991 Dec 7;338(8780):1438-40.
14. Holtham SB, Schutz F. The effect of cyanate on the stability of proteins. Biochem Biophys Acta 1949;3:65-81.
15. Shorter J. The conversion of ammonium cyanate into urea: a saga in reaction mechanism. Chem. Soc. Rev. 1979;7:1-14.
16. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. N Engl J Med. 1993 Sep 30;329(14):977-86.
17. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Lancet. 1998 Sep 12;352(9131):837-53. Erratum in: Lancet 1999 Aug 14;354(9178):602.
18. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, Lernmark A, Metzger BE, Nathan DM. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. Clin Chem. 2011 Jun;57(6):e1-e47.
19. NGSP harmonizing hemoglobin a1c testing. A better a1c test means better diabetes care. Factors that Interfere with HbA1c Test Results. <http://www.ngsp.org/factors.asp> Acesso em 11/10/2014.

20. 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 Apr;38(4):321-6.
21. Lee SC, Wang LH, Tsai SM, Fang HY, Tsai LY. Effects of the Hb E, Hb H and Hb G-Taichung variants on HbA1c values by the Bio-Rad variant II turbo analyzer. *Clin Biochem*. 2011 Nov;44(16):1338-42.
22. Selvaraj N, Bobby Z, Sridhar MG. Increased glycation of hemoglobin in chronic renal failure: [corrected] potential role of oxidative stress. *Arch Med Res*. 2008 Apr; 39(3):277-84. Review. Erratum in: *Arch Med Res*. 2008 May;39(4):466.
23. Flückiger R, Harmon W, Meier W, Loo S, Gabbay KH. Hemoglobin carbamylation in uremia. *N Engl J Med*. 1981 Apr 2;304(14):823-7
24. Smith WG, Holden M, Benton M, Brown CB. Glycosylated and carbamylated haemoglobin in uraemia. *Nephrol Dial Transplant*. 1989; 4(2): 96-100.
25. Bannon P, Lessard F, Lepage R, Joly JG, Dufresne L. Glycated hemoglobin in uremic patients as measured by affinity and ion-exchange chromatography. *Clin Chem*. 1984 Mar;30(3):485-6.
26. Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem*. 1993 Jan;39(1):138-42.
27. Herruer MH, van Kooten EA, Sluiter HE, Zuijderhoudt FM. Influence of uraemia on the determination of blood glycohaemoglobin by HPLC, electrophoresis and affinity chromatography in diabetic and non-diabetic patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994 May;32(5):361-4.
28. Hansen KW, Erlandsen E, Helleberg K, Danielsen H. Uremia and HbA1c. *Diabetes Care* 1997;20:1341-2.

29. Chevenne D, Fonfrède M, Ducrocq R, Chauffert M, Trivin F. Uremia and HbA1c measured by high-performance liquid chromatography. *Diabetes Care*. 1998 Mar;21(3):463-4.
30. Little RR, Tennill AL, Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Khanna R, Goel S, Agrawal A, Madsen R, Goldstein DE. Can glycohemoglobin be used to assess glycemic control in patients with chronic renal failure? *Clin Chem*. 2002 May;48(5):784-6.
31. Meijs MF, Dijkhorst-Oei LT, van Loo R, Bosma RJ, Weykamp CW, Wielders JP. Does carbamylated hemoglobin still affect the analysis of HbA(1c) in uremic and hyperglycemic patients? *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(12):1791-2.
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. 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.
34. 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.

OBJETIVO

Verificar o efeito da uremia nos níveis de A1c, determinada por diferentes metodologias, em amostras de pacientes com e sem Diabetes mellitus.

Capítulo II

Avaliação do efeito da uremia em diferentes métodos de determinação da A1c em pacientes com e sem Diabetes mellitus

Alexandre Costa Guimarães^{1,2}

Joara Predebom Flores Teixeira^{1,2}

Priscila Aparecida Correa Freitas^{1,2}

Jorge Luiz Gross^{1,3}

Joíza Lins Camargo^{1,3*}

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

² Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

³ Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

* Autor para Correspondência:

Joíza Lins Camargo

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Rua Ramiro Barcellos, 2350; Prédio 12 - CPE, 4º andar

Porto Alegre, RS 90035-903, Brasil.

Fone: 33598127 Fax: 51-33598777.

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

Artigo Original a ser submetido à Revista Clinical Chemistry

Lista de abreviações:

ADA – American Diabetes Association

ANOVA – Análise de variância

A1C – glycated hemoglobin

CHB – carbamylated hemoglobin

DCCT – Diabetes Control and Complications Trial Research Group

dL - Decilitros

DM – Diabetes mellitus

DP – Desvio padrão

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid

FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa

g - gramas

GC – Grupo controle

GCU – Grupo controle uremia

GDM – Grupo Diabetes mellitus

GDMU - Grupo Diabetes mellitus uremia

HB - Hemoglobina

HCPA – Hospital de Clinicas de Porto Alegre

HPLC – High-performance liquid chromatography

IFCC – International Federation of Clinical Chemistry

IC – Intervalo de confiança

mg - miligramas

NGSP – National Glycohemoglobin Standardization Program

RESUMO:

Introdução: A hemoglobina glicada é amplamente aceita como o marcador mais importante para o controle glicêmico e avaliação do risco de complicações crônicas de pacientes com diabetes mellitus. Os métodos mais comumente usados para quantificar A1c são cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia de afinidade de boronato, imunoenaios e eletroforese capilar. Existem possíveis interferentes na dosagem de A1c, entre eles a uremia e consequente formação de hemoglobina carbamilada que pode ser medida e acrescentada aos valores de A1c quando métodos baseados na separação por carga são utilizados. Neste estudo investigamos a influência da uremia nos resultados de A1c obtidos por HPLC, imunoturbidimetria e eletroforese capilar de pacientes com e sem diabetes mellitus (DM). **Materiais e métodos:** Avaliamos o efeito da uremia nas dosagens de A1c em amostras de sangue de pacientes com e sem DM e com e sem uremia em quatro diferentes equipamentos: Advia 1800, Capillarys 2, Tosoh 2.2 e Variant II. Usamos análise de correlação de Pearson, análise de variância e metodologia de Bland-Altman para determinar a relação dos resultados de A1c obtidos a partir de cada método teste com o método comparativo (Variant II), $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados: No total foram realizadas 776 análises de A1c nos diferentes equipamentos. Não houve diferença significativa entre os resultados de A1c em indivíduos sem DM com e sem uremia ($P > 0,05$). Em pacientes com DM, houve uma forte correlação entre os resultados de A1c obtidos pelo analisador Variant II e os analisadores Advia 1800 ($r = 0,9937$), Capillarys 2 ($r = 0,9939$) e Tosoh 2.2 ($r = 0,9680$) ($P < 0,0001$). As diferenças entre os métodos, considerando o analisador Variant II como referência, foram $-0,06$ [$-0,14; 0,03$] (média [IC 95%]); $0,47$ [$0,38; 0,55$] e $0,28$ [$0,18; 0,36$], para os métodos Advia 1800, Tosoh 2.2 e Capillarys, respectivamente. Na avaliação da concordância entre métodos de Bland-Altman, os resultados de A1c de pacientes com DM mostraram-se discordantes, com exceção dos resultados obtidos pelo analisador Advia 1800.

Conclusão: Em pacientes sem DM, a uremia não afeta os resultados de A1c nos métodos avaliados. No entanto, em doentes com uremia e níveis mais elevados de A1c, a CHb superestima os resultados de A1c em todos os métodos avaliados.

Palavras Chaves: Métodos, hemoglobina glicada, uremia e hemoglobina carbamilada.

ABSTRACT:

Introduction: Glycated hemoglobin is widely accepted as the most important marker for glycemic control and evaluation of the risk of chronic complications of diabetes mellitus (DM). The methods most used to quantify A1c are high performance liquid chromatography, boronate affinity chromatography, immunoassays, and capillary electrophoresis. Uremia and consequent formation of carbamylated hemoglobin can affect A1c determination and may be measured and, consequently, overestimate A1c levels when methods based on charge separation are used. We investigated the influence of uremia on A1c results obtained by HPLC, immunoturbidimetry and capillary electrophoresis in patients with and without DM. **Methods:** we analyzed A1c in blood samples from patients with and without DM and with and without uremia by four different methods: Advia 1800; Capillarys 2, Tosoh 2.2 and Variant II. Pearson correlation, ANOVA and Bland-Altman methodology were used to determine the relationship between A1c results obtained from each method to the adopted comparative method (Variant II), $P < 0.05$ was considered significant. **Results:** 776 analyzes were performed with A1c in different equipment. There was no significant difference between results of A1c in individuals without DM with and without uremia ($P > 0.05$). In patients with DM, there was a strong correlation between the results of A1c obtained by Variant II analyzer and Advia 1800 analyzers ($r = 0.9937$), Capillarys 2 ($r = 0.9939$) and Tosoh 2.2 ($r = 0.9680$) ($P < 0.0001$). The differences among methods, considering Variant II analyzer as a reference, were 0.47 [0.38, 0.55] (mean [95% CI]); 0.28 [0.18, 0.36] and -0.06 [-0.14, 0.03] for Tosoh 2.2 methods, Capillarys and Advia 1800 respectively. The agreement between methods, assessed by Bland-Altman method, showed that the A1c results in patients with DM are discordant. The exception was obtained by Advia analyzer 1800. **Conclusion:** In patients without DM, uremia does not affect the results of A1c measured by different methods. However, in patients with uremia and higher HbA1c levels, CHB A1c overestimates the results for all evaluated methods.

Key words: methods, glycated hemoglobin, blood urea and carbamylated hemoglobin.

Introdução

A hemoglobina glicada (A1c) é amplamente aceita como o marcador mais importante para o controle glicêmico e avaliação do risco de complicações crônicas de pacientes com diabetes mellitus (DM) [1,2,3]. A partir do momento que a Associação Americana de Diabetes (ADA) introduziu a dosagem de A1c como um dos parâmetros que podem ser utilizados para o diagnóstico de diabetes, esse analito ganhou grande importância como um marcador biológico [4]. Nos últimos anos, grandes esforços têm sido realizados para padronizar a determinação de A1c. Numa primeira fase, os valores de A1c estavam alinhados com o Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT) [2]. Atualmente, é recomendado que os métodos estejam padronizados também de acordo com a Federação Internacional de Química Clínica (IFCC) [5]. Em paralelo, houve a evolução em direção da estabilização da determinação de A1c, com critérios de precisão e acurácia se tornando mais rigorosos, pois envolvem o monitoramento do diabetes [6,7]. Tendo em vista a epidemia de diabetes no mundo, o número de determinações de A1c tende a aumentar.

Os métodos mais comumente usados para quantificar A1c são cromatografia líquida de alta eficiência por troca iônica (HPLC), cromatografia de afinidade de boronato, imunoenaios e ensaios enzimáticos [7]. Mais recentemente, o método de eletroforese capilar foi introduzido para a determinação de A1c [8,9]. Esses métodos, principalmente as técnicas cromatográficas, proporcionam boa especificidade, e a análise dos cromatogramas permite detectar a maioria das interferências analíticas. Existem diferentes interferências que habitualmente podem ser encontradas quando estamos medindo A1c, incluindo anemia, presença de hemoglobinas variantes e uremia [8,9]. Fisiologicamente a uréia dissocia-se espontaneamente em cianato de amônia formando o ácido isociânico. O ácido isociânico pode reagir fisiologicamente com a hemoglobina (Hb) gerando um produto final denominado hemoglobina carbamilada (CHb) [10, 11].

Essa reação ocorre muito semelhante à reação de glicação não enzimática da hemoglobina para formar A1c, pois o ácido isociânico liga-se na molécula de hemoglobina no mesmo sítio onde a glicose reage, formando a CHb que possui ponto isoelétrico semelhante ao da A1c [12,13]. Como consequência, a CHb pode ser medida e acrescentada aos valores de A1c quando métodos baseados na separação por carga são utilizados, como os HPLCs de troca iônica, podendo resultar em maiores porcentagens e valores falsamente elevados de A1c em amostras de pacientes com uremia [12,13].

Ainda não há uma definição sobre este assunto, há estudos importantes das décadas de 80 e 90 relatam a interferência da uremia em diferentes métodos, enquanto trabalhos mais atuais relatam não haver influência nos resultados [12-14, 18-23, 30-32]. Porém muitos desses estudos avaliaram métodos de ensaio mais antigos, os métodos atuais para mensuração de A1c passaram por inúmeras melhorias ao longo desses anos e podem mostrar melhor separação entre a fração de A1c de outros picos de hemoglobina [20, 21,23]. Neste estudo investigamos a influência da uremia nos resultados de A1c obtidos por HPLC, imunoturbidimetria e eletroforese capilar de pacientes com e sem DM.

Materiais e métodos

Pacientes e amostras de sangue

Para detectar uma diferença mínima relativa de 3,0% nos valores de A1c entre as diferentes metodologias, considerando uma correlação entre os métodos de 0,5; poder estatístico de 90% e nível de significância estatística de 0,05 são necessários 38 amostras sanguíneas para cada grupo. Por conveniência, selecionaremos 50 amostras para cada grupo.

As amostras de sangue para a dosagem de A1c foram obtidas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A seleção das amostras de sangue para o estudo iniciou com a formação de quatro grupos com 50 pacientes em cada um, com dados clínicos obtidos através de análise de prontuário. Amostras de pacientes sem DM formaram o grupo controle (GC) e o grupo controle com uremia (GCU). Amostras de pacientes com DM formaram o grupo com DM (GDM) e o grupo com DM com uremia (GDMU).

Devido a média de vida da hemácia de 120 dias, pacientes com resultados de uréia superior a 80 mg/ dL ou inferior a 40 mg/ dL por pelo menos 3 meses anteriores a captação da amostra foram considerados com uremia e sem uremia respectivamente. Pacientes com anemia (Hb <12 g/dL para homens e Hb <11g/dL para mulheres), presença de hemoglobina variante e triglicérides superior a 400 mg/dL foram excluídos deste estudo, bem como foram excluídos os pacientes em uso de eritropoietina e/ou em tratamento com ferro e pacientes em hemodiálise. Pacientes com A1c superior ou igual a 6,5% e glicose em jejum superior ou igual a 126 mg/ dL foram considerados com DM após confirmação do diagnóstico no prontuário.

Equipamentos e análises laboratoriais

As amostras de sangue coletadas em tubos com EDTA para dosagem de A1c foram reunidas no período de 12 meses e armazenadas em freezer -80°C, a Figura 1 apresenta um fluxograma de captação das amostras. Nesse período foi constituído o banco de amostras dos quatro grupos do estudo. Após a finalização da captação de 50 amostras de sangue com EDTA para cada grupo, conforme os critérios de inclusão e seleção descritos acima, iniciou-se as análises de A1c em quatro equipamentos diferentes. As amostras foram descongeladas e mantidas em refrigeração na temperatura de 2°C a 8°C por um período de três dias enquanto estavam sendo analisadas paralelamente nos quatro equipamentos, de acordo com as recomendações de cada um dos fabricantes:

- Equipamento/Método A: Variant II Turbo – HPLC por troca iônica, (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).
- Equipamento/Método B: Tosoh A1c 2.2 – HPLC por troca iônica, (Tosoh Bioscience, South San Francisco, CA).
- Equipamento/Método C: Advia 1800 – Imunoturbidimetria, (Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY).
- Equipamento/Método D: Capillarys 2 Flex Piercing - Eletroforese capilar, (SEBIA, Lisses, France).

Antes dos ensaios todos os equipamentos foram devidamente calibrados e amostras de controle de qualidade foram utilizadas. Os materiais de controle de qualidade utilizados ao longo da avaliação nos equipamentos A, B e C foram nível baixo e nível alto do controle comercial Lyphochek®, (Bio-Rad Laboratories, Irvine, CA) e no equipamento D, utilizou-se o controle comercial nível 1 e 2 (Sebia Lisses, France). Os quatro equipamentos são certificados e calibrados pelo Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) e possuem rastreabilidade dos reativos para o DCCT.

Este estudo foi submetido e aprovado no Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob número de registro 13-0186. Todos os resultados foram expressos em unidades NGSP (%). A relação entre as unidades IFCC e DCCT/NGSP é definida pelo resultado da seguinte equação mestra: $NGSP (\%) = (0,915 \times IFCC) + 2.15$ [6].

Análise estatística

Os resultados das variáveis foram sumarizados pela média \pm DP (desvio padrão) ou mediana (intervalo interquartil), conforme aplicável. Para a comparação das médias dos resultados de A1c pelos diferentes métodos entre os grupos de pacientes sem DM, utilizamos teste t não pareado e análise de variância (ANOVA), quando apropriado. Nesta análise, apenas o efeito da uremia foi considerado, e os resultados de A1c em uma mesma amostra nos diferentes métodos (ANOVA) e a média das A1c entre os métodos (teste T) foram comparadas.

Para a comparação dos resultados de A1c obtidos pelos diferentes métodos para uma mesma amostra nos pacientes com DM, utilizamos a ferramenta de avaliação de concordância para comparação de métodos de Bland-Altman, incluindo os limites de concordância, e seus intervalos de confiança (IC) e análise de correlação de Pearson [24]. Para esta análise o equipamento/método Variant II Turbo – HPLC por troca iônica, (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) foi o método comparativo adotado, por ser o método utilizado na rotina de nosso laboratório e por apresentar pico de separação da CHb. Esta estratégia de análise foi adotada para minimizar o efeito da glicação e os resultados de A1c em uma mesma amostra nos diferentes métodos comparados. Os resultados são apresentados como a média das diferenças entre os métodos e IC 95%.

Considerando que o erro total máximo permitido para a dosagem de A1c, utilizando métodos padronizados, deve ser 7,0% [20, 25,26], estipulou-se que uma diferença absoluta de $\pm 0,5\%$ entre as médias das diferenças (viés) entre os equipamentos seria considerada uma diferença clinicamente significativa (onde 7% de erro total no valor absoluto de 7% de A1c, alvo estipulado pela ADA, é $\sim 0,5\%$ A1c) [7]. Para as análises estatísticas e criação dos diagramas utilizou-se o Programa MedCalc statistical software Version 14.12.0.

Resultados

No total, analisamos 194 amostras, sendo 47 amostras no grupo controle (GC), 49 no grupo controle com uremia (GCU), 50 no grupo com DM (GDM) e 48 amostras no grupo com DM com uremia (GDMU), totalizando 776 análises de A1c entre os quatro diferentes equipamentos. Seis amostras foram excluídas do estudo por apresentarem hemoglobina variante. A tabela 1 resume as características bioquímicas dos grupos avaliados nesse estudo, sendo que houve diferença significativa nas médias de uréia

entre os grupos de pacientes sem DM (com e sem uremia) e com DM (com e sem uremia) ($P < 0,001$).

Na tabela 2 estão apresentadas as médias dos resultados de A1c dos pacientes sem DM obtidas nos diferentes equipamentos analisados. Não houve diferença significativa entre os resultados de A1c em indivíduos sem DM com e sem uremia ($P > 0,05$). Também não houve diferença significativa entre as médias de A1c, obtidas pelos 4 analisadores, neste grupo de pacientes (Grupo Controle).

Correlação e Concordância entre os Métodos

A comparação dos métodos na presença ou não da uremia em pacientes com DM está apresentada na Figura 2. Houve uma forte correlação entre os resultados de A1c obtidos pelo analisador Variant II e os analisadores Advia 1800 ($r = 0,9937$; Figura 2A), Capillarys 2 ($r = 0,9939$; Figura 2C) e Tosoh 2.2 ($r = 0,9680$; Figura 2E) ($P < 0,0001$).

Na avaliação da concordância entre métodos de Bland-Altman na presença ou não da uremia em pacientes com DM, os resultados de A1c entre os grupos (GDM e GDMU) foram discordantes. O menor viés foi entre as diferenças do analisador Variant II em comparação com o analisador Advia 1800 ($-0,06$ [$-0,14; 0,03$], Figura 2B). Já entre o analisador Variant II *versus* Capillarys 2 e analisador Variant II *versus* Tosoh 2.2 o viés foi $0,47$ [$0,38-0,55$] (Figura 2D) e $0,28$ [$0,18-0,36$] (Figura 2F), respectivamente.

Os diagramas de Bland-Altman, mostram que existem 20%, 40% e 22% de valores discordantes entre os métodos, quando comparamos o analisador Variant II com Advia 1800, Capillarys 2 e Tosoh 2.2, respectivamente (Figuras 2B, 2D e 2F) (considerando um limite clínico de $\pm 0,5\%$ entre as médias das diferenças e um erro total máximo de 7%).

A Figura 3 apresenta as diferenças entre os resultados de A1c obtidos pelo analisador Variant II e os analisadores Advia 1800, Capillarys 2 e Tosoh 2.2. Houve diferença significativa nas diferenças dos resultados de A1c em pacientes com DM e com uremia quando comparados com as diferenças de resultados de A1c em pacientes com DM e sem uremia (entre os dois grupos) em todos os métodos separadamente analisados ($P < 0,05$).

Discussão

A1c é considerado o melhor biomarcador para avaliar a eficácia do controle glicêmico em pacientes diabéticos e recentemente foi proposto como uma alternativa de diagnóstico do diabetes mellitus [27]. Diferentes tecnologias são atualmente utilizadas para quantificação de A1c [28].

Nosso estudo mostrou que a uremia não afeta os valores de A1c em pacientes sem DM, independente do método utilizado. As diferenças encontradas entre valores de A1c na presença e ausência de uremia nos diferentes métodos foram dentro da variação máxima permitida de 7% e foram 0,0%, -1,75%, 3,44% e 0,0% para Variant, Advia, Tosoh e Capillarys, respectivamente [7].

Na comparação dos resultados de A1c entre o grupo controle com e sem uremia determinados pelos diferentes analisadores observamos que não houve diferença significativa entre os resultados. Indicando que a uremia *in vivo* não influencia na determinação de A1c, independente do método e equipamento utilizado, em pacientes sem DM. Nestes grupos não houve diferença significativa entre as glicemias, mas houve uma diferença significativa na uremia, possibilitando a chance de o grupo com uremia ter maiores taxas de hemoglobina carbamilada nas amostras, possível fator interferente nas análises.

Para evitarmos algum tipo de viés causado pelas variações de glicemia e pelo metabolismo individual da glicose em pacientes com DM, nos grupos com DM com e sem uremia comparamos as diferenças entre os resultados de A1c nas diferentes metodologias utilizando uma ferramenta apropriada para avaliar concordância entre métodos, conhecida como metodologia de análise Bland-Altman, que deve ser utilizada de forma completa, incluindo os limites de concordância, e seus intervalos de confiança [24]. Analisando os diagramas de Bland-Altman podemos observar que existe discordância entre os métodos, principalmente nas amostras com DM e uremia. Essa discordância é evidente quando percebemos que a linha média (continua) está distante da linha da igualdade (zero). Todavia apesar dos diagramas de Bland-Altman destacarem diferenças sistemáticas entre quase todas as comparações nos menores e maiores valores de A1c, este fenômeno pode ser explicado pelo modo de integração dos picos de A1c com CHb e também por causa dos diferentes processos de calibração de cada analisador. Isso porque, apesar dos quatro analisadores serem certificados como técnicas confiáveis e rastreáveis ao método de referência IFCC, diferenças em termos de calibração podem levar a resultados ligeiramente diferentes [29].

Quando avaliamos os pontos das diferenças sistemáticas das médias que ultrapassam as linhas verdes do intervalo ($\pm 0,5\%$), nas amostras de pacientes com DM, verificamos que a diferença sistemática mostrada nos diagramas de Bland-Altman foi clinicamente significativa, pois as diferenças entre as médias encontram-se fora do intervalo previamente estipulado, sendo que definimos *a priori* que diferenças entre as médias de até $\pm 0,5\%$ não seriam clinicamente significativas.

Na avaliação das medianas no gráfico boxplot, verificamos que o efeito da carbamilação afeta todos os métodos, e que as diferenças dos resultados de A1c nos pacientes com DM e com uremia é maior que nos pacientes com DM e sem uremia nos analisadores Advia 1800, Capillarys 2 e Tosoh 2.2, quando comparados com o analisador Variant II.

Em um trabalho publicado na década de 80, investigadores sugerem que as concentrações de A1c estão elevadas tanto em pacientes com DM como em pacientes sem DM com insuficiência renal e uremia quando medido por cromatografia de troca iônica [30]. Em outro trabalho os autores estudaram a interferência da carbamilação da hemoglobina *in vitro* e uremia *in vivo* em amostras de pacientes com DM, sem DM e com uremia, concluíram que as dosagens de A1c sofreram interferência principalmente em técnicas baseadas em HPLC e eletroforese [31]. Um artigo publicado em 1994 analisou a interferência da uremia em métodos como cromatografia de afinidade, HPLC e eletroforese usando amostras de pacientes com DM e sem DM, não encontrou influência da uremia nas metodologias baseadas em HPLC, porém o método eletroforese mostrou-se sensível aos níveis de uremia [22]. Estudo realizado em 1997 avaliou o efeito da uremia nos equipamentos Variant (HPLC) e DCA 2000 (imunoensaio) usando amostras de sangue de pacientes com DM com uremia e pacientes sem DM sem uremia. Os autores concluíram que o método HPLC sofreu interferência significativa na dosagem das amostras uremicas e que o método imunoensaio não sofreu interferência [14].

Em outro estudo pesquisadores avaliaram amostras de sangue que sofreram carbamilação *in vitro* e concluíram que A1c nesses pacientes pode ser medido com precisão em equipamentos que utilizem métodos como HPLC, imunoensaio e cromatografia de afinidade [32]. Em 1999 um estudo avaliou duas amostras liofilizadas, uma amostra de paciente com uremia e a outra de paciente sem uremia, ambos sem DM. Esta amostra foi analisada por 24 laboratórios de 17 países que participavam de um programa de controle de qualidade, no total foram utilizados 14 métodos para comparar os resultados das duas amostras liofilizadas. Os autores concluíram que a hemoglobina

carbamilada interfere nos resultados de A1c em métodos de HPLC baseados em cromatografia de troca iônica, elevando falsamente os valores de A1c [12]. Em outro trabalho mais recente, Chachou e colaboradores compararam A1c em quatro equipamentos diferentes baseados na metodologia de HPLC e um método baseado em imunoensaio com amostras de pacientes com uremia sem DM, os resultados mostraram que a carbamilação da hemoglobina *in vivo* não influenciou os resultados de A1c quando comparado métodos baseados em HPLC e imunoensaio [20].

Em 2002 pesquisadores avaliaram a interferência da uremia e consequente carbamilação da hemoglobina em uma mesma linha de equipamentos; Variant A1c (HPLC) com o atualizado Variant II. Além desses analisadores também avaliaram outros métodos como imunoensaio e HPLC, incluindo o equipamento Tosoh. Eles utilizaram amostras de pacientes com e sem insuficiência renal crônica, com DM e sem DM. Os autores observaram que a uremia influenciou significativamente as dosagens de A1c no modelo Variant mais antigo. Concluíram que A1c dosada nas outras metodologias e no modelo Variant II não sofreram interferência de elevadas concentrações de uréia, podendo fornecer resultados válidos para a maioria pacientes com insuficiência renal crônica [23]. Em um trabalho publicado em 2008, Meijs e colaboradores compararam as dosagens de A1c de amostras de pacientes com DM em hemodiálise, pacientes com doença renal crônica e pacientes com DM sem alteração na função renal em diferentes analisadores cromatográficos e imunoquímicos, concluíram que a uremia não afetou a determinação de A1c nas metodologias mais atualizadas [21].

Estudo recente mostrou que CHb não interfere significativamente nas diferentes técnicas para a medição de A1c quando os níveis de CHb não são elevados, porem para valores mais elevados de uremia a interferência alterna dependendo do método usado [13]. Um estudo de 2013 que avaliou a A1c utilizando metodologias HPLC de troca e de imunoensaio em pacientes com insuficiência renal crônica com DM, mostrou uma pequena diferença entre alguns métodos, porem, não foi clinicamente significativo [18]. Em outro trabalho publicado em 2014 pesquisadores chineses avaliaram a interferência da uremia em diferentes métodos baseados em cromatografia de troca iônica e de afinidade. Nesse trabalho foram utilizadas amostras de sangue de pacientes com e sem doença renal crônica e de pacientes com e sem DM. Não se encontrou diferença significativa nos resultados de A1c nos diferentes analisadores [19]. Em uma metanálise realizada recentemente de nosso grupo de pesquisa, os autores concluíram que os efeitos da uremia sobre os níveis de A1c em indivíduos sem DM estão dentro da variação

individual esperada e não afetam a interpretação dos resultados de A1c para diagnosticar DM.

Conforme esperado encontramos diferença significativa entre os valores de ureia nos diferentes grupos ($P < 0,001$). Os níveis de uremia nos pacientes do grupo sem DM com uremia e do grupo DM com uremia são quase quatro vezes maiores que nos grupos controle e DM. Essa diferença foi importante para podermos realizar as comparações nas amostras dos diferentes grupos.

Um aspecto relevante deste estudo é seu diferencial em relação às características das amostras de sangue que formaram os quatro diferentes grupos de pacientes. É importante ressaltar que as amostras de sangue com níveis de uréia elevados são provenientes de pacientes sem insuficiência renal crônica (IRC), mas com uréia >80 mg/dL, sem anemia e que não fizeram uso de eritropoietina e nem foram submetidos a hemodiálise, além disso mantiveram os níveis de uremia elevado durante pelo menos três meses antes da captação da amostra de sangue para as dosagens de A1c. Esse cuidado foi importante para garantir que as amostras permanecessem expostas aos níveis altos de ureia *in vivo* pelo período médio de vida dos eritrócitos que é de três meses, pois a carbamilação da hemoglobina depende tanto dos níveis de concentração da uréia na circulação do paciente, como também da duração da exposição do eritrócito a uréia [10, 11,12].

Decidimos isso *a priori* por notar que na literatura sobre o assunto os trabalhos são realizados com captação de amostras de sangue de pacientes com IRC, ou em muitos casos a carbamilação da hemoglobina é realizada *in vitro*. O diferencial do nosso trabalho foi estudar amostras de sangue onde a carbamilação ocorreu *in vivo* e sem os interferentes que um processo de hemodiálise causa no sistema hematológico e bioquímico dos pacientes.

Conclusão

Enfim, nossos resultados mostram que em pacientes sem DM, a uremia não afeta os resultados de A1c nos métodos avaliados, porém em pacientes com DM e com níveis de A1c mais elevados, a uremia superestima os resultados de A1c em todos os métodos avaliados, já que as diferenças nos pacientes com DM e com uremia é maior que nos pacientes com DM e sem uremia. Esses resultados são relevantes quanto consideramos a utilização da A1c na prática clínica, sugerindo que a A1C pode ser utilizada na presença de uremia para o diagnóstico de DM (valores mais baixos de A1c) e com cautela no controle glicêmico de pacientes com DM e uremia. Estudos para esclarecer a relação da uremia e glicação in vivo são necessários.

Agradecimentos

Este projeto foi realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Patrocínio financeiro foi recebido do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE / HCPA) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse associado a este manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet*. 1998;12:854-865.
2. 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;30:977-986.
3. Gorus F, Mathieu C, Gerlo E. How should HbA1c measurements be reported? *Diabetologia*. 2006;49:7-10.
4. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2010. *Diabetes Care*. 2010;33(suppl):S11-S61.
5. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med*. 2002;40:78-89.
6. Little RR, Rohlfing CL, Sacks DB; National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) Steering Committee. Status of hemoglobin A1c measurement and goals for improvement: from chaos to order for improving diabetes care. *Clin Chem*. 2011;57:205-214.
7. Little RR, Rohlfing CL. The long and winding road to optimal HbA1c measurement. *Clin Chim Acta*. 2013 Mar 15;418:63-71.
8. Weykamp C, Waenink-Wiegers H, Kemna E, et al. HbA1c: performance of the Sebia CAPILLARYS 2 Flex Piercing. *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:e129-e131.
9. Chapelle JP, Teixeira J, Maisin D, et al. Multicentre evaluation of the Tosoh HbA1c G8 analyser. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:365-371.
10. Holtham SB, Schutz F. The effect of cyanate on the stability of proteins. *Biochem Biophys Acta* 1949;3:65-81.

11. Shorter J. The conversion of ammonium cyanate into urea: a saga in reaction mechanism. *Chem. Soc. Rev.* 1979;7:1-14.
12. Weykamp CW, Miedema K, de Haan T, Doelman CJ. Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. *Clin Chem.* 1999 Mar;45(3):438-40.
13. 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.
14. Hansen KW, Erlandsen E, Helleberg K, Danielsen H. Uremia and HbA1c. *Diabetes Care* 1997;20:1341–2.
15. Selvaraj N, Bobby Z, Sridhar MG. Increased glycation of hemoglobin in chronic renal failure: [corrected] potential role of oxidative stress. *Arch Med Res.* 2008 Apr; 39(3):277-84. Review. Erratum in: *Arch Med Res.* 2008 May;39(4):466.
16. Flückiger R, Harmon W, Meier W, Loo S, Gabbay KH. Hemoglobin carbamylation in uremia. *N Engl J Med.* 1981 Apr 2;304(14):823-7
17. Smith WG, Holden M, Benton M, Brown CB. Glycosylated and carbamylated haemoglobin in uraemia. *Nephrol Dial Transplant.* 1989; 4(2): 96-100.
18. 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.
19. 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.
20. 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;38:321–6.

21. Meijis MF, Dijkhorst-Oei LT, van Loo R, Bosma RJ, Weykamp CW, Wielders JP. Does carbamylated hemoglobin still affect the analysis of HbA(1c) in uremic and hyperglycemic patients? *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(12):1791-2.
22. Herruer MH, van Kooten EA, Sluiter HE, Zuijderhoudt FM. Influence of uraemia on the determination of blood glycohaemoglobin by HPLC, electrophoresis and affinity chromatography in diabetic and non-diabetic patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1994 May;32(5):361-4.
23. Little RR, Tennill AL, Rohlfing C, Wiedmeyer HM, Khanna R, Goel S, Agrawal A, Madsen R, Goldstein DE. Can glycohemoglobin be used to assess glycemic control in patients with chronic renal failure? *Clin Chem*. 2002 May;48(5):784-6.
24. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999 Jun;8(2):135-60.
25. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):837-53. Erratum in: *Lancet* 1999 Aug 14;354(9178):602.
26. Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, Lernmark A, Metzger BE, Nathan DM. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*. 2011 Jun;57(6):e1-e47.
27. The International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:1327 – 34.
28. 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.
29. Jaisson S, Guillard E, Leroy N, Gillery P. [Comparison of analytical interferences on HbA1c measurement by two high pressure liquid chromatography analyzers]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011 Jan-Feb;69(1):63-9.

30. Bannon P, Lessard F, Lepage R, Joly JG, Dufresne L. Glycated hemoglobin in uremic patients as measured by affinity and ion-exchange chromatography. *Clin Chem.* 1984 Mar;30(3):485-6.
31. Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. *Clin Chem.* 1993 Jan;39(1):138-42.
32. Chevenne D, Fonfrède M, Ducrocq R, Chauffert M, Trivin F. Uremia and HbA1c measured by high-performance liquid chromatography. *Diabetes Care.* 1998 Mar;21(3):463-4.

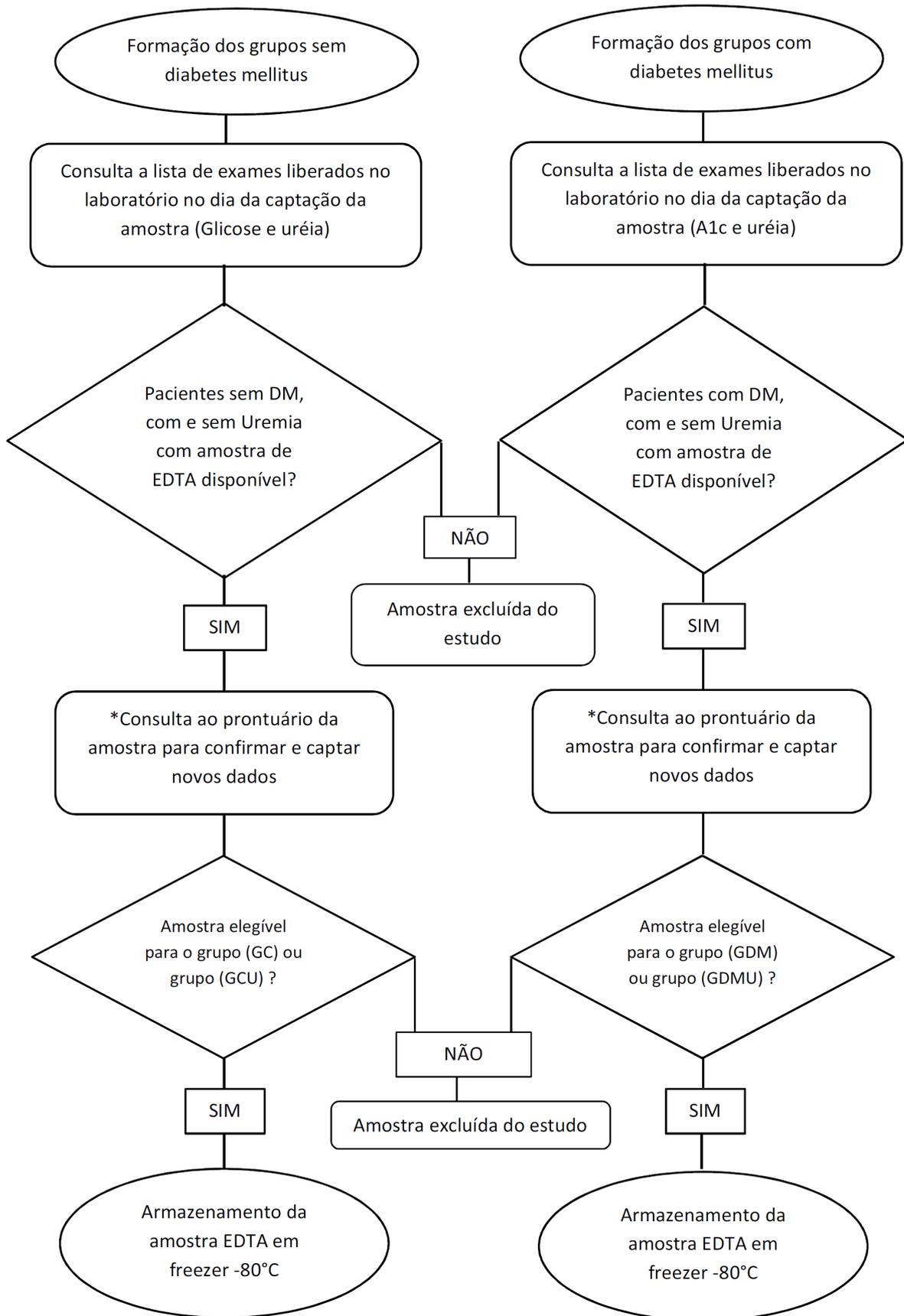


Figura 1. Fluxograma de captação das amostras com EDTA para formar os grupos. *Na consulta ao prontuário foi observada a existência de uremia (uréia > 80 mg/dL) por pelo menos 120 dias que antecederem a captação da amostra.

Tabela 1: Características bioquímicas das amostras participantes do estudo.

	Grupo Controle Sem DM	Grupo Uremia Sem DM	Grupo Diabetes Com DM	Grupo Diabetes Uremia Com DM
Nº de amostras	47	49	50	48
Gênero (% homens)	35	55	32	69
Idade (anos)	49.6 ±18.2	53.2 ±15.9	60.7 ±10.3	60.9 ±12.5
Glicose (mg/dL)	93.1 ±10.5	93.6 ±13.3	182.0 ±75.0	168.1 ±86.3
Ureia (mg/dL)	*29.5 ±6.3	*115.3 ±17.6	#32.8 ±6.5	#118.1±26.4
Hemoglobina (g/dL)	13.2 ±1.26	12.7 ±1.32	13.4 ±1.41	12.7 ±1.26

Média ± DP, * houve diferença significativa P<0,001 # houve diferença significativa P<0,001

Tabela 2: Resultados de A1c nos diferentes métodos em pacientes sem diabetes

Equipamento - Método	Amostras sem DM	
	Grupo Controle n 47	Grupo Uremia n 49
Advia 1800 - Imunoturbidimetria	5.8 ±0.45	5.7 ±0.96
Capillary-2 - Eletroforese capilar	5.1 ±0.40	5.1 ±0.52
Tosoh 2.2 - HPLC	5.6 ±0.41	5.8 ±0.62
Variant II - HPLC	5.2 ±0.43	5.2 ±0.60

A1c conforme unidades NGSP (%), média ± DP , P>0,05 para todos os grupos.

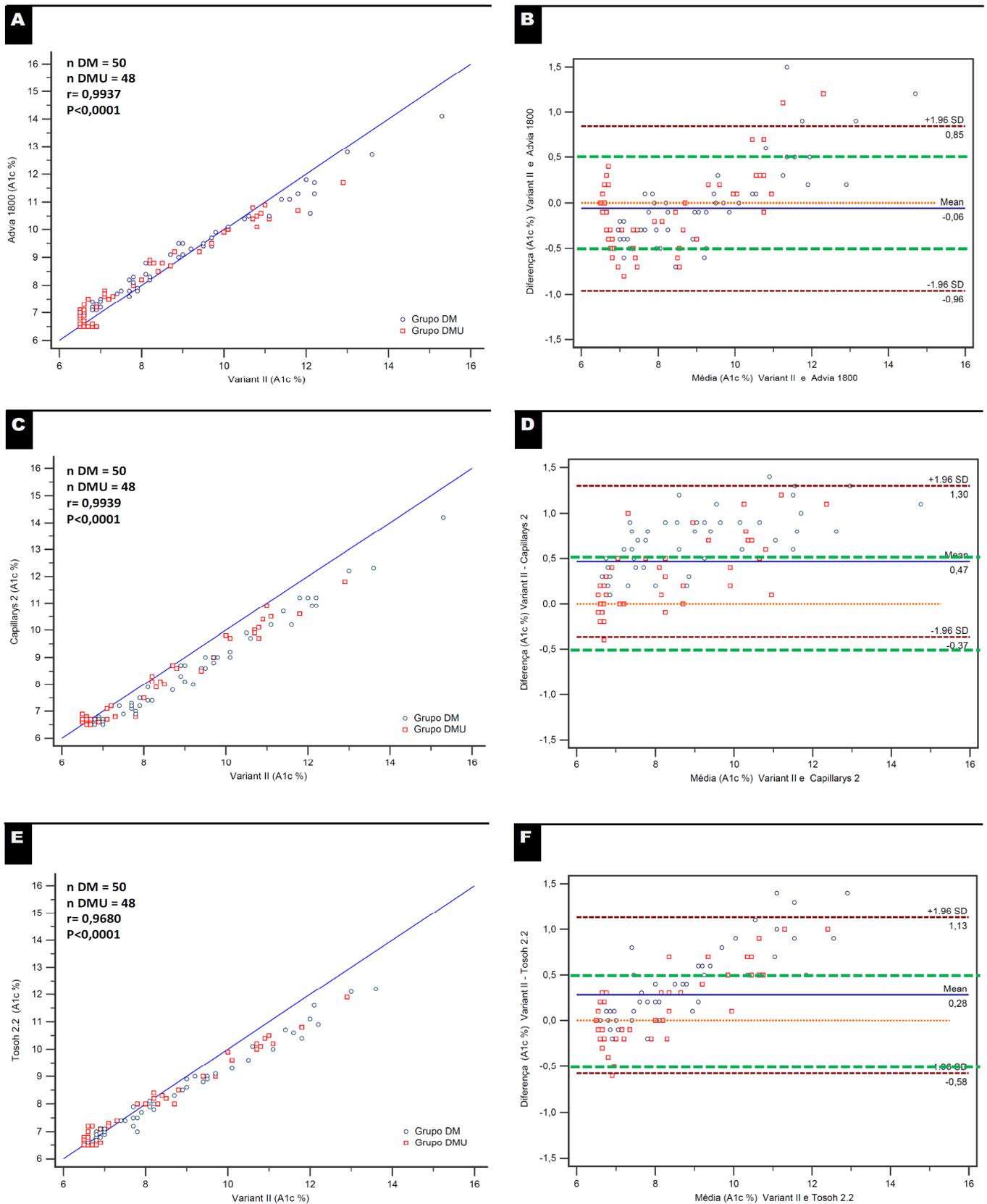


Figura 2. Correlação linear e análise de concordância entre métodos de Bland-Altman, resultados da diferença de hemoglobina A1c (%), utilizando amostras de sangue total entre o equipamento (referência nesse estudo) Variant II) e os equipamentos Advia (A, B), Capillarys 2 Flex Piercing (C, D), Tosoh A1c 2.2) (E, F). **Correlação linear:** Linha azul contínua representa a linha de igualdade linear. **Bland-Altman:** linha azul contínua representa a diferença média absoluta (Viés), as linhas vermelhas tracejadas representam os limites de concordância e as linhas verdes tracejadas representam o limite clinicamente significativo de $\pm 0,5\%$.

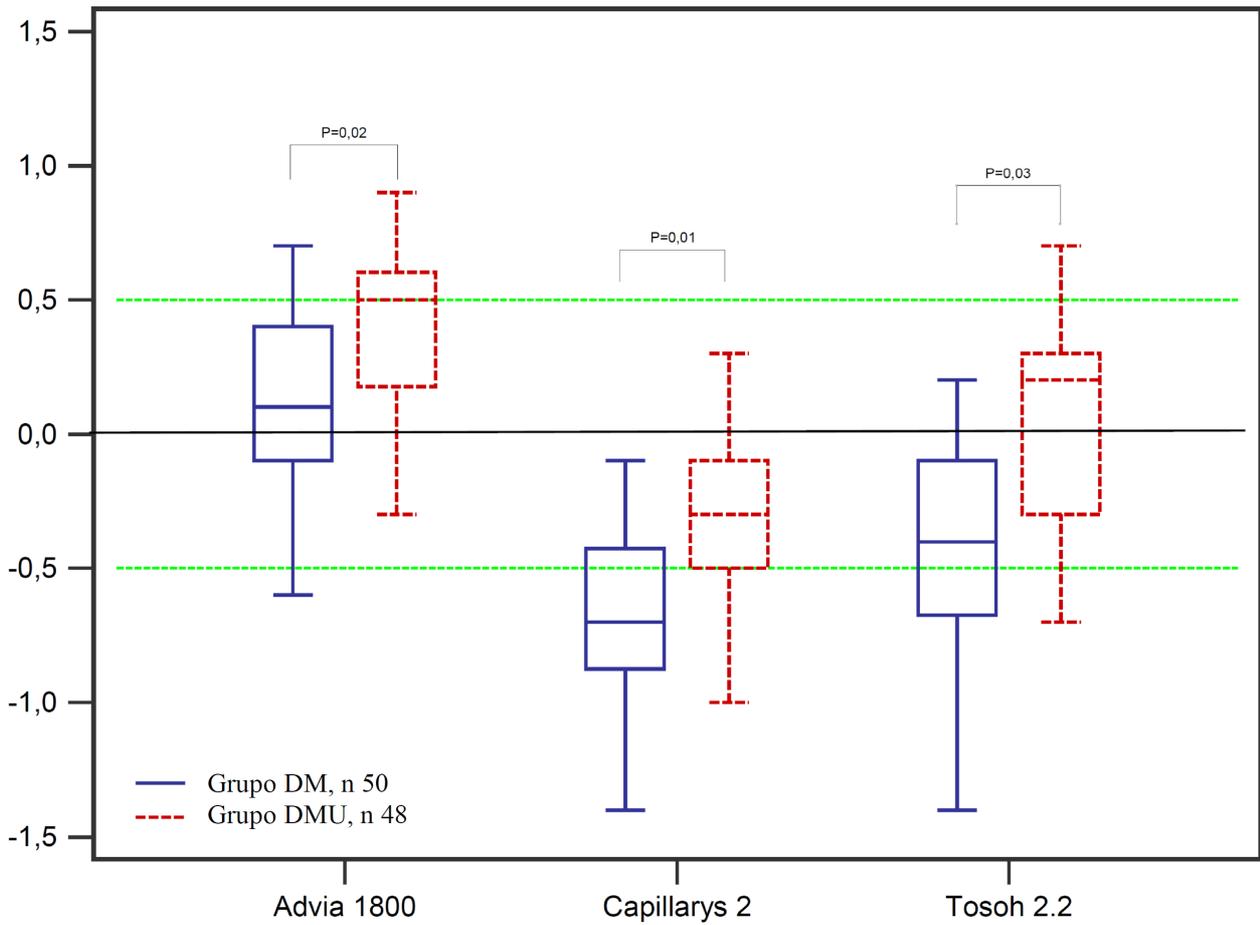


Figura 3. Boxplot comparando a distribuição das diferenças das dosagens de (A1c %) (mediana e intervalo interquartil) entre o equipamento Variant II na comparação com Advia 1800, Capillary 2 e Tosoh 2.2. Linha pontilhada indica o limite da diferença clinicamente aceitável entre os métodos.