

## VANTAGENS DA DOSAGEM DA HEMOGLOBINA GLICADA NO MONITORAMENTO DO PACIENTE DIABÉTICO. PORQUE HPLC?

O termo genérico “hemoglobina glicada” refere-se a um conjunto de substâncias formadas com base em reações entre a hemoglobina A (HbA) e alguns açúcares. O termo “hemoglobina glicosilada” tem sido erroneamente utilizado como sinônimo de hemoglobina glicada. O processo de “glicação” de proteínas envolve uma ligação não enzimática e permanente com açúcares redutores como a glicose, ao contrário do processo de “glicosilação”, que envolve uma ligação enzimática e instável <sup>(1)</sup>.

A HbA é a principal forma da hemoglobina, sendo que a HbA0 é o principal componente da HbA. Na prática, esta corresponde à chamada fração não glicada da HbA. Por outro lado, a HbA1 total corresponde a formas de HbA negativamente carregadas devido à adição de glicose e outros carboidratos <sup>(1)</sup>.

Existem vários subtipos de HbA1 cromatograficamente distintos, tais como HbA1a1, HbA1a2, HbA1b e HbA1c. Desses todos, a fração HbA1c, ou apenas A1C, é a que se refere à hemoglobina glicada propriamente dita, cujo terminal valina da cadeia beta está ligado à glicose por meio de uma ligação estável e irreversível <sup>(1)</sup>.

O Diabetes melito pode se acompanhar de complicações crônicas micro e macrovasculares que estão associadas a elevada morbidade e mortalidade e a medida da hemoglobina glicada é o parâmetro de referência para avaliar o grau do controle glicêmico em pacientes portadores dessa doença. A Associação Americana de Diabetes (ADA) recomenda que a hemoglobina glicada seja medida regularmente em todos os pacientes a intervalos de 4 a 6 meses. Considerando a alta prevalência do Diabetes melito e o impacto das complicações da doença na sociedade, a dosagem da hemoglobina glicada é um dos procedimentos mais importantes no laboratório clínico atual <sup>(2)</sup>.

As dosagens de hemoglobina glicada foram disponibilizadas no laboratório clínico no início da década de 80, no entanto foi apenas na década de 90 que o verdadeiro valor clínico dessa dosagem laboratorial ficou definitivamente estabelecido. No estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) <sup>(3)</sup>, o risco para o desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do Diabetes melito foi intimamente relacionado com o grau do controle glicêmico, medido pela hemoglobina glicada, fração HbA1c. Os resultados do DCCT determinaram a relação dos valores de HbA1c com a glicemia média e estabeleceram objetivos a serem atingidos em pacientes com Diabetes melito tipo 1 e 2 <sup>(2)</sup>.

Atualmente, níveis de hemoglobina glicada inferiores a 7,0% (6,5%) são recomendados no acompanhamento de pacientes diabéticos, enquanto pacientes normais possuem níveis de 1 a 4%. Na prática, os valores normais de referência nos principais métodos laboratoriais vão de 4% a 6% <sup>(1, 2)</sup>.

### DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Existem vários métodos diferentes para a dosagem de hemoglobina glicada disponíveis para uso no laboratório clínico. Esses testes se baseiam nas diferenças físicas, químicas ou imunológicas entre a fração glicada (HbA1 ou HbA1c) e a não-glicada HbA0 <sup>(1, 2)</sup>.

Em geral, os métodos podem ser classificados em dois grandes grupos:

### **Métodos Baseados em Ligações Específicas**

Esses métodos usam a diferença estrutural ou química entre hemoglobina glicada e HbA0 para separar as frações. Os principais exemplos são os métodos imunológicos que usam anticorpos direcionados ao N-terminal glicado da hemoglobina (sequências que variam de 3 a 8 aminoácidos) e são específicos para a fração HbA1c, sendo que os resultados são expressos com porcentagem de HbA1c <sup>(2)</sup>.

### **Métodos Baseados na Diferença de Carga Elétrica Entre GHb e HbA0**

A Cromatografia Líquida por troca iônica (HPLC) e a eletroforese usam este princípio. O princípio baseia-se no fato de que a ligação da glicose, ou de outro açúcar, ao amino grupo terminal da cadeia  $\alpha$  altera a carga total da hemoglobina, fazendo com que a fração glicada migre mais rápido em um campo elétrico ou em resinas de troca iônica, permitindo a separação das frações. Os métodos de HPLC por troca iônica permitem a automação e são métodos bastante robustos <sup>(2)</sup>.

### **Considerações**

A principal dificuldade no acompanhamento do paciente diabético através da dosagem de hemoglobina glicada é justamente a carência de padronização no uso desses métodos.

Além disso, a maioria dos laboratórios clínicos no Brasil utilizam métodos não certificados, não podendo ter seus resultados comparados aos resultados do DCCT.

Como exemplo é possível citar o uso de fórmulas de conversão, oriundas de estudos comparativos, para determinação da medida de hemoglobina glicada. Apesar de essa prática ser largamente adotada, sua validade é questionável. Em um estudo prévio, foi observado que as fórmulas de conversão, baseadas em métodos que não medem a fração HbA1c (como as minicolunas de troca iônica, métodos baseados em afinidade e eletroforese), tem uma variabilidade que pode resultar em diferenças absolutas maior que 1% a 2% do valor verdadeiro. Esta variação pode mascarar uma verdadeira, e clinicamente relevante, diferença em níveis de HbA1c. Métodos com baixa reprodutibilidade inferem um grande erro nos resultados convertidos. No entanto, quando métodos precisos como a HPLC por troca iônica são utilizados, o erro na conversão dos resultados é muito menor e aceitável para uso clínico <sup>(2, 4)</sup>.

Outra dificuldade é a dosagem de hemoglobina glicada em pacientes portadores de hemoglobina variante heterozigótica (AC, AS, AE, AD, Fetal, etc.). Nesses casos, os resultados de hemoglobina glicada resultam em valores falsamente elevados ou diminuídos, conforme a metodologia aplicada. A HPLC por troca iônica apresenta clara vantagem sobre os demais métodos por possibilitar a identificação da presença de hemoglobinas variantes, permitindo uma análise mais criteriosa do resultado. Por outro lado, os métodos que utilizam o princípio do imunoensaio não são capazes de detectar a presença das diferentes hemoglobinas variantes.

Além das vantagens elencadas acima, o método de HPLC por troca iônica foi utilizado pelo DCCT sendo atualmente recomendado como método de referência para a dosagem de hemoglobina glicada <sup>(2)</sup>.

A Central Sorológica de Vitória (CSV) realiza a dosagem de hemoglobina glicada por metodologia de HPLC por troca iônica diariamente.

## REFERÊNCIAS

1. Atualização sobre Hemoglobina Glicada (A1c) para Avaliação do Controle Glicêmico e para o Diagnóstico do Diabetes: Aspectos Clínicos e Laboratoriais. Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada – A1C. Posicionamento Oficial - 3ª Edição, 2009.
2. JOÍZA LINS CAMARGO JL, GROSS JL. Glico-Hemoglobina (HbA1c): Aspectos Clínicos e Analíticos. Arq Bras Endocrinol Metab. Agosto vol 48 nº 4, 2004.
3. 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. 329:977-86, 1993.
4. CAMARGO JL, ZELMANOVITZ T, PAGGI A, FRIEDMAN R, GROSS JL. Accuracy of conversion formulae for estimation of glycohemoglobin. Scand J Clin Lab Invest. 58:521-8, 1998.