

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

Albumina glicada: nova alternativa para o controle glicêmico no Diabetes Mellitus

Dissertação de Mestrado

Priscila Aparecida Correa Freitas

Porto Alegre, 19 de fevereiro de 2016.

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

Albumina glicada: nova alternativa para o controle glicêmico no Diabetes Mellitus

Priscila Aparecida Correa Freitas

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, 19 de fevereiro de 2016.

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

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------|----|
| Agradecimentos..... | 4 |
| Lista de abreviaturas..... | 5 |
| Resumo..... | 8 |
| Abstract | 9 |
| Capítulo 1: Artigo de revisão | 10 |
| Objetivo..... | 39 |
| Capítulo 2: Artigo original | 40 |
| Considerações finais..... | 72 |

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a colaboração e incentivo de algumas pessoas especiais.

Primeiramente, dedico essa dissertação àqueles responsáveis pela minha educação: ao meu pai Airton, que hoje está presente apenas como uma energia boa que me acompanha, foi meu maior exemplo de serenidade e amor, sempre acreditando nas minhas escolhas e me incentivando a prosseguir em tudo aquilo que eu acreditava; à minha mãe Jociane, a pessoa que me provou que todos os sonhos são atingíveis quando se tem dedicação e disciplina, sempre batalhando para poder estudar, crescer profissionalmente e cuidar da nossa família, concomitantemente.

Agradeço o apoio da minha irmã Joslaine neste período, pois foi sempre compreensiva com a minha ausência e colaborou muito para que eu tivesse um ambiente propício de concentração para finalizar este trabalho. Agradeço também ao meu namorado Guilherme, amigos próximos e meus irmãos Raphael e Fabrycio pelo incentivo.

Não posso deixar de agradecer a minha orientadora Joíza, pois sempre depositou muita confiança no meu trabalho e me incentivou em todas as minhas escolhas, além de nunca ter medido esforços para me ajudar no que fosse preciso. Agradeço imensamente a minha colega Lethícia por ter colaborado ativamente neste estudo, executando grande parte dos experimentos com muita qualidade. Às minhas colegas Ana Laura e Gabriela, assim como ao meu colega Alexandre, deixo registrado o meu muito obrigado por toda a colaboração.

Por fim, agradeço a todos os amigos, colegas e voluntários que, literalmente, doaram o seu sangue neste estudo. Todos vocês foram fundamentais para a concretização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – American Diabetes Association

AG – Albumina glicada

AGEs – Advanced glycated end products

ALT - Alanina aminotransferase

ARIC – Atherosclerosis Risk in Communities

AUC – Área sob a curva

A1C – Hemoglobina glicada ou Glycated hemoglobina

BMI – Body mass index

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute

Cut-off – ponto de corte

CV – Coefficient of variability

CV%inter – Coefficient of variability inter-assay

CV%intra – Coefficient of variability intra-assay

DCCT – The Diabetes Control and Complications Trial Research Group

DM – Diabetes mellitus

DM1 - Diabetes mellitus tipo 1

DM2- Diabetes mellitus tipo 2

DMG – Diabetes mellitus gestacional

DRC – Doença renal crônica

EDIC – Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

ERO – Espécies reativas de oxigênio

FG – Fasting glucose

FIPE/HCPA - Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

GA – Glycated albumin

GJ – Glicemia de jejum

G2h - Glicemia de duas horas pós sobrecarga de glicose

Hb – Hemoglobina

HbF – Hemoglobina fetal

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência ou high performance liquid chromatography

ICAM-1 – Intercellular adhesion molecule-1

IDF – International Diabetes Federation

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

kDa - kilodalton

NF- κ B - *nuclear factor*-Kb

NGSP – National Glycohemoglobin Standardization Program

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – Razão de chance

R – Coefficient of correlation

RAGEs – Receptores de AGEs

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

SD – Standard deviation

SJD – Sociedade Japonesa de Diabetes

TNF- α – Tumour necrosis factor- α

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ULBRA - Universidade Luterana do Brasil

VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule-1

RESUMO:

O Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica que implica em altas incidências de mortalidade e morbidade. A hiperglicemia crônica é responsável pelo surgimento de inúmeras complicações em longo prazo nestes pacientes. Atualmente, é recomendado por diretrizes internacionais que pacientes com DM sejam monitorados e manejados em seu tratamento a partir dos níveis de hemoglobina glicada (A1C). A A1C é formada por reações não enzimáticas de glicação na hemoglobina, refletindo a glicemia dos últimos 120 dias. A A1C possui forte associação com os desfechos clínicos no DM e apresenta uma excelente padronização de seus métodos analíticos. Contudo, diversas situações clínicas podem interferir falsamente em seus níveis e prejudicar a interpretação de seus resultados, como em anemias (carenciais ou hemolíticas), hemoglobinopatias, gravidez, doença renal crônica, etc. Por outro lado, a albumina glicada (AG) é uma frutossamina formada por glicações na albumina e reflete uma glicemia média de cerca de 2 a 3 semanas. A AG não é influenciada pela concentração de outras proteínas no plasma e também não sofre interferência pelas condições que afetam a A1C. Este marcador tem sido fortemente avaliado como uma ferramenta alternativa para a A1C, a partir da análise de seus níveis por um novo método enzimático descrito em 2002. Estudos tem demonstrado uma forte associação entre estes dois marcadores e grande semelhança em predizer as complicações do DM. Entretanto, a AG se mostra melhor para avaliar flutuações nos níveis de glicose e a resposta ao tratamento terapêutico. Neste trabalho, foi avaliado o desempenho analítico de dois kits enzimáticos de AG e realizado uma comparação entre os métodos, encontrando excelentes resultados. Ainda, foi determinado o intervalo de referência para os níveis de AG em brasileiros saudáveis. A forte correlação encontrada entre AG e A1C demonstra que a AG pode ser um teste útil para o controle glicêmico no DM, principalmente quando a A1C não é recomendada.

Palavras-chaves: Albumina glicada; Diabetes Mellitus; marcador glicêmico; frutossamina.

ABSTRACT:

Diabetes Mellitus is a metabolic disease with high incidence rates of mortality and morbidity. Chronic hyperglycemia is responsible for several long-term complications in these patients. Currently, international guidelines recommend that glycemic monitoring in DM should be performed by glycated hemoglobin (A1C) levels, to provide a correct clinical conduction. A1C is relative to non-enzymatic glycation reactions in hemoglobin and reflects the glucose levels from the last 120 days. It is well established the great association between A1C and clinical outcomes in DM, besides, its analytical methods present an excellent standardization. However, some conditions may influence and imply misinterpretation in A1C results, such as anemia, hemoglobinopathies, pregnancy, chronic renal disease, etc. On the other hand, glycated albumin (GA) is a fructosamine produced by glycation reactions in albumin and it reflects a mean glycemia at around 2 to 3 weeks. GA is not influenced by the concentrations of other plasma proteins, as well as by those conditions that interfere in A1C. GA has been strongly evaluated as an alternative marker to A1C, through its quantitative measurement by an enzymatic methodology described in 2002. Recent studies have demonstrated a high association between GA and A1C and a great similarity between these tests in predicting DM future complications. Nevertheless, GA has showed be better to assess the glucose fluctuations in blood and the response to treatment. This study evaluated the analytical performance of two GA enzymatic kits and also executed a methods comparison, and found excellent results. Also, we established the reference range for GA levels in healthy Brazilians. The high correlation found between GA and A1C indicates that GA could be a useful test for glycemic control in DM, especially when A1C is unreliable.

Key words: Glycated albumin; Diabetes Mellitus; glycemic marker; fructosamine.

Capítulo 1

Glycated Albumin: a potential laboratory marker in diabetes mellitus

Priscila Aparecida Correa Freitas ¹

Joíza Lins Camargo ^{2*}

¹ Biomédica e mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

² Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Farmacêutica – Bioquímica do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

* 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.edu.br

Artigo de Revisão a ser submetido à revista Diabetes & Metabolism

RESUMO:

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica e metabólica com altas taxas de incidência em nível mundial. A hemoglobina glicada (A1C) é o teste referência para o monitoramento glicêmico em longo prazo no DM e possui forte correlação com as complicações crônicas da doença. Contudo, o uso da A1C não é recomendado em algumas situações clínicas que interferem no metabolismo da hemoglobina, como em anemias hemolíticas, carenciais ou secundárias, hemoglobinopatias, gestação e uremia. A albumina glicada (AG) é um teste que reflete a glicemia de curto prazo e não sofre interferência das situações nas quais a A1C é falsamente alterada. A AG é a maior porção glicada da clássica dosagem de frutossamina, porém não sofre influência da concentração de proteínas séricas e é medida por metodologia enzimática padronizada, de fácil e rápida execução. Estas características laboratoriais têm destacado a AG em pesquisas na última década como marcador para o monitoramento, diagnóstico e até mesmo preditor das complicações do DM. O objetivo desta revisão é apresentar as características fisiológicas e bioquímicas da AG e discutir a sua utilidade clínica no DM.

Palavras-chave: Diabetes mellitus; albumina glicada; hemoglobina glicada

ABSTRACT:

Diabetes Mellitus (DM) is a chronic and metabolic disease that presents a high global incidence. Glycated hemoglobin (A1C) is the reference test for long-term glucose monitoring, and it exhibits association with diabetic chronic complications. However, A1C is not recommended in clinical situations which may interfere with the metabolism of hemoglobin, such as in hemolytic, secondary or iron deficiency anemia, hemoglobinopathies, pregnancy, and uremia. The glycated albumin (GA) is a test that reflects short-term glycemia and is not influenced by situations that falsely alter A1C levels. GA is the higher glycated portion of fructosamine. It is measured by a standardized enzymatic methodology, easy and fast to perform. These laboratory characteristics have ensured the highlight of GA in studies from the last decade, as a marker of monitoring and screening for DM, as well as a predictor of long-term outcomes of the disease. The aim of this review was to discuss the physiological and biochemistry characteristics of the GA, as well as its clinical utility in DM.

Key words: Diabetes mellitus; glycated albumin; glycated hemoglobin

INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica causada pela secreção diminuída ou ausente de insulina ou pela diminuição da sensibilidade dos tecidos a mesma (SBD, 2015). O DM configura-se hoje como uma epidemia mundial e um grande desafio para os sistemas de saúde de todo o mundo. Estimativas da *International Diabetes Federation* (IDF) indicam que um a cada onze adultos possuem DM, totalizando cerca de 415 milhões de pessoas, dos quais se estima que 193 milhões não possuem diagnóstico (IDF, 2015).

A hiperglicemia crônica é um fator comum em todos os subtipos do DM, sendo associada com danos em longo prazo que causam disfunção e insuficiência de diferentes órgãos, devido ao acometimento micro e macrovascular envolvido (ADA, 2015). As complicações crônicas da doença aumentam as taxas de morbidade e mortalidade e podem resultar em cegueiras, insuficiência renal e amputações de membros, implicando em gastos excessivos nos sistemas de saúde e redução da expectativa de vida destes pacientes (SBD, 2015).

Atualmente, os testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico de DM são a hemoglobina glicada (A1C), glicemia de jejum (GJ) e glicemia de duas horas pós-sobrecarga de glicose (G2h), estando os critérios diagnósticos estabelecidos pela *American Diabetes Association* (ADA) hoje aceitos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (SBD 2015; ADA 2015; WHO, 2013). A A1C é ainda o teste referência para o monitoramento glicêmico no DM, por refletir diretamente a glicemia média (Nathan, 2008) e estar fortemente correlacionada com as complicações em longo prazo da doença (DCCT 1993, UKPDS 1998). Contudo, o uso da A1C não é recomendado em algumas situações clínicas, como na gestação, anemias hemolíticas e carenciais, presença de hemoglobinas (Hb) variantes e uremia (Sacks DB 2011; Cavagnoli, 2015; NGSP, 2015), devido à possível interferência sobre

os resultados da A1C, dificultando a sua interpretação. Recentes estudos também têm demonstrado discordância entre os níveis de A1C em diferentes etnias para níveis iguais de glicemia (Selvin, 2011; Ziemer, 2010, Cavagnoli, 2014). Contudo, as razões destas disparidades ainda não estão bem elucidadas.

A albumina glicada (AG) é um teste laboratorial que tem ganhado destaque como um marcador para o monitoramento glicêmico no DM (Kohzuma, 2010; Koga, 2010). A AG faz parte das frutossaminas, porém possui a vantagem de não sofrer influência da concentração de outras proteínas séricas, uma vez que é específica às taxas de glicação da albumina (Kohzuma, 2002). Ainda, a AG reflete a glicemia de curto prazo, devido ao tempo de meia-vida da albumina, que é de aproximadamente 3 semanas, e não necessita de jejum para análise. Em comparação à A1C, a AG não é afetada pela presença de processos hemolíticos e de Hb anormais (Kim, 2010). Além disso, em condições como anemia, gravidez, hiperglicemia pós-prandial e DM sob o uso de insulina, a AG parece ser um melhor marcador glicêmico (Koga, 2010) e está especialmente indicada à pacientes com DM submetidos à hemodiálise (Inaba, 2007; Freedman, 2010; Sany, 2013). Recentes estudos com pacientes DM tipo 1 (DM1) (Nathan, 2014) e DM tipo 2 (Selvin, 2014) têm reportado uma associação da AG com as complicações em longo prazo da doença.

Embora a AG venha sendo fortemente explorada nos últimos anos, este teste ainda não é amplamente utilizado na rotina laboratorial, e poucos reagentes/kits estão disponíveis no mercado para sua determinação. Contudo, o grande número de investigações clínicas em pesquisas faz da AG um marcador promissor no DM. Neste contexto, a proposta desta revisão é apresentar as características fisiológicas e laboratoriais da AG e discutir a sua utilidade clínica no diagnóstico e manejo do DM.

1. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DA AG E IMPACTO BIOLÓGICO DA GLICAÇÃO

A albumina é uma proteína de alto peso molecular com 66.7 kDa, composta por uma única cadeia polipeptídica que contém 585 aminoácidos, 17 pontes dissulfeto e 3 domínios homólogos que estão conectados em uma estrutura helicoidal (Anguizola, 2013). A albumina é a principal proteína plasmática, com concentrações entre 30.0 a 50.0 g/L no sangue. Representa cerca de 60% do total das proteínas séricas e possui uma meia-vida de 14 a 20 dias (Danese, 2015; Anguizola, 2013). A estrutura desta proteína facilita as suas funções fisiológicas, principalmente na manutenção do pH e da pressão osmótica sanguínea. Ainda, a albumina atua como um potente antioxidante ligando-se a radicais livres e como o principal transportador de produtos metabólicos, íons, nutrientes, drogas, hormônios e ácidos graxos (Ueda, 2015).

Assim como as demais estruturas proteicas, a albumina também passa pelo processo fisiológico de glicação e mostra-se muito sensível ao mesmo (Arasteh, 2014). Por definição, a glicação é uma reação espontânea não enzimática na qual há adição de um carboidrato (glicose ou outros açúcares) a um resíduo amino-terminal de aminoácido livre (lisina ou arginina) presente em uma proteína, sendo também denominada reação de Maillard (Figura 1) (Anguizola, 2013; Danese 2015; Ueda, 2015). A primeira etapa da reação envolve a formação de um produto instável e reversível conhecido como base de Schiff, formado pela ligação de um grupo aldeído de um carboidrato acíclico com o grupo N-terminal de um aminoácido (Danese, 2015). Este produto intermediário pode sofrer uma mudança de conformação, conhecido como rearranjo de Amadori, formando uma cetoamina estável e irreversível (Cohen 2003). O principal produto de Amadori formado é a frutossil-lisina, podendo ser originado da modificação estrutural de 59 sítios de lisina presentes na albumina (Anguizola, 2013). Todavia, a lisina 525 tem sido identificada como o maior sítio de glicação da albumina, evidenciado tanto em experimentos *in vivo* quanto

A concentração de glicose e o tempo de exposição entre a proteína e o açúcar são os fatores determinantes para o número de glicações realizadas durante a vida da proteína, ou seja, a glicação depende do grau e da duração da hiperglicemia (Cohen, 2003). Comparando proteínas plasmáticas, como a albumina, com proteínas intracelulares, como a Hb, as primeiras podem ser mais suscetíveis às reações de Amadori por estarem diretamente expostas à glicose plasmática. Esta característica faria com que a albumina passasse pelo processo de glicação de forma mais rápida e precoce do que a Hb, justificando as diferenças de cerca de 9 a 10 vezes maiores nas taxas encontradas de produção de AG em relação às de A1C (Rondeau, 2011).

Entretanto, Ueda e Matsumoto (2015) realizaram um experimento *in vitro* para assegurar condições iguais de exposição à glicose, tanto para A1C quanto para AG. Primeiramente, foi separado o plasma e a fração de eritrócitos de amostras de voluntários saudáveis, removendo a glicose por ultracentrifugação do plasma e liberando o conteúdo de Hb por hemólise induzida na fração de eritrócitos. Após adicionarem concentrações conhecidas e iguais de glicose nas amostras preparadas, foi evidenciado que a produção de AG foi cerca de 4.5 vezes maior do que a de A1C. Estes achados mostram que, mesmo em condições idênticas de glicação *in vitro*, a AG é produzida mais rapidamente do que a A1C (Ueda, 2015).

Em estágios de glicação avançada, eventos adicionais oxidativos e irreversíveis ocorrem sobre as proteínas glicadas, produzindo compostos estáveis e heterogêneos conhecidos como *advanced glycated end products* (AGEs – Figura 1). Embora a formação de AGEs seja um processo normal, condições de hiperglicemia típicas em pacientes com DM aumentam suas taxas de produção (Khan, 2015). No estudo de Kisugi et al. (2007) utilizando amostras de uma paciente com DM obtidas durante um mês de sua hospitalização para tratamento dos sintomas de hiperglicemia, foi evidenciado que a formação de AGEs reduziu drasticamente com a diminuição concomitante dos níveis de AG (Kisugi, 2007).

Células de diferentes tecidos possuem receptores de AGEs (RAGEs), como por exemplo as células musculares, endoteliais, macrófagos e células da glia (Singh, 2014). RAGEs são expressos como moléculas de membrana, constituintes da superfamília das imunoglobulinas. Atuam como receptores de transdução de sinal, induzindo um estresse oxidativo e iniciando uma cascata inflamatória pela ativação do *nuclear fator-κB* (NF-κB) (Khan, 2015). NF-κB modula a transcrição gênica de moléculas pró-inflamatórias como a interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 8 (IL-8) e *tumour necrosis factor-α* (TNF-α), e também de moléculas de adesão como a *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) e *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1). Por consequência desta cascata, há uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que esta diretamente associada à patogênese no DM e suas complicações em longo prazo, incluindo retinopatia, catarata, neuropatia, cardiomiopatia e doença renal do diabetes (Singh, 2014; Arasteh 2014).

2. ANÁLISE LABORATORIAL DA AG

Historicamente, o teste frutosamina tem sido utilizado na prática clínica quando se necessita da avaliação em curto prazo da glicemia em pacientes com DM (Kohzuma, 2002; Raghav, 2014). Contudo, este teste apresenta uma baixa acurácia, pois sofre influência das concentrações das proteínas totais no plasma e também de outras moléculas presentes no sangue como bilirrubina, ácido úrico e substâncias de baixo peso molecular (Kohzuma, 2002). Ainda, o teste de frutosamina não é comumente utilizado em todos os laboratórios (Roohk, 2008; Anguizola, 2013) e não existem padronizações internacionais bem estabelecidas para o seu emprego.

Métodos para a avaliação específica de AG têm sido desenvolvidos desde a década de 80, utilizando amostras de soro ou plasma (Raghav, 2014). Os métodos mais antigos apresentavam numerosas desvantagens, devido à complexidade na realização das técnicas, ou pelos altos custos e/ou pela falta de precisão. Além disto, a não padronização dos métodos propostos colaboraram para a pouca utilização da AG nas pesquisas clínicas, direcionando toda a atenção para A1C (Paroni, 2007).

Os métodos disponíveis para determinar a AG incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade do boronato, imunoenaios (radioimunoensaio e *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* - ELISA), método colorimétrico com ácido tiobarbitúrico e método enzimático utilizando proteinase e cetoamina oxidase (Roohk 2008, Kohzuma 2011, Kohzuma, 2002, Raghav 2014), porém nenhuma destas técnicas estão atualmente disponíveis na rotina laboratorial (Furusyo, 2013).

Os intervalos de referência descritos para AG são dependentes do método utilizado. Uma vez que a albumina possui diferentes sítios de glicação, os níveis de AG podem variar de acordo com os sítios analisados pela metodologia empregada. Além disso, os valores obtidos também serão distintos se o método de análise considerar a medida da molécula de AG e não dos aminoácidos glicosados (Kohzuma, 2011). Por exemplo, as técnicas de imunensaio, métodos colorimétricos com ácido tiobarbitúrico e enzimáticos consideram os aminoácidos glicosados como referência para os níveis de AG. Já as técnicas de HPLC e demais cromatografias consideram a molécula de AG para definição de seus níveis. Apesar desta diferença, todas as técnicas de análise disponíveis concordam que a proporção de AG em pacientes com DM aumenta cerca de 2 a 5 vezes em comparação a pacientes normoglicêmicos (Anguizola, 2013).

Com o objetivo de superar as limitações das técnicas previamente existentes, recentemente, uma nova metodologia enzimática com tempo operacional reduzido e facilidade de execução tanto por análise manual ou automatizada, foi proposta para avaliação dos níveis de AG. Este método apresenta três etapas (Figura 2), utilizando proteinase específica para albumina e cetoamina oxidase, além do reagente verde de bromocresol para a dosagem da albumina total e posterior cálculo da %AG. Na validação realizada para a introdução do teste no mercado, o desempenho analítico foi excelente e não apresentou influência pela bilirrubina e glicose, somente uma leve interferência nos níveis de AG na presença de Hb e ácido ascórbico (Kohzuma, 2002). Outros estudos encontraram resultados similares ao de Kohzuma et al (2002), concluindo que a nova metodologia enzimática demonstra reprodutibilidade, acurácia (Kohzuma, 2011) e boa correlação com a A1C (Paroni, 2007; Rodriguez-Capote, 2015). Em adição, Montagnana et al (2013) avaliaram a variação biológica da AG medida por este método enzimático e relataram um coeficiente de variação intra-indivíduo menor para a AG em comparação a frutossamina e A1C (1.7%, 2.8% e 2.4%, respectivamente) (Montagnana, 2013).

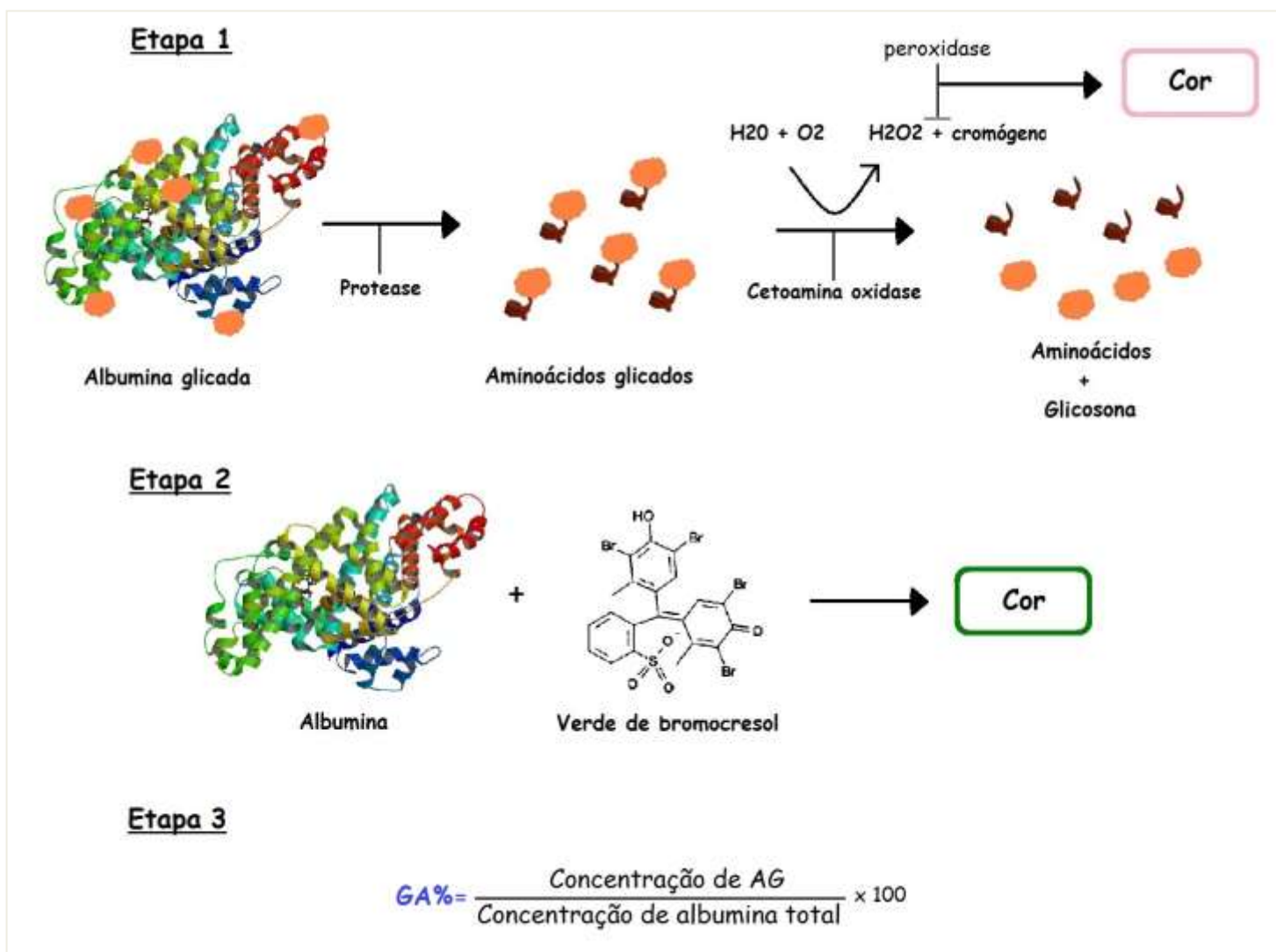


Figura 2 – Reação enzimática para determinação de AG. *Etapa 1*: Liberação de aminoácidos glicados da molécula de AG através de uma enzima proteinase específica para albumina, e posterior separação de aminoácidos e glicosona (um produto intermediário resultante da oxidação de um produto de Amadori) por uma enzima cetoamina oxidase. A reação gera um produto colorido que é proporcional à concentração de AG. *Etapa 2*: reação entre albumina e verde de bromocresol em meio ácido, gerando um complexo colorido que é proporcional à concentração de albumina total. *Etapa 3*: A %AG é posteriormente calculada considerando as duas reações.

Fonte: Adaptada do *RCSB Protein Data Bank* pelos autores.

A AG apresenta uma boa estabilidade quando congelada a temperaturas muito baixas. No estudo de Kohzuma et al (2011), amostras congeladas a -80°C mantiveram os níveis de AG estáveis por 4 anos. Watano et al (2013) encontraram os mesmos resultados para o armazenamento a -70°C , porém observaram que em amostras de soro de pacientes com DM mantidas a -20°C , os níveis de AG aumentaram consideravelmente após 6 meses (Watano, 2013). Nathan et al (2014) determinaram os níveis de AG em amostras de participantes do estudo *The Diabetes Control and Complications Trial Research Group* (DCCT) congeladas a -70°C há 23 anos, e concluíram que a estabilidade deste analito manteve-se adequada (Nathan, 2014).

Entretanto, apesar de todas as características citadas, AG ainda não é um teste regularmente disponível na prática laboratorial (Sacks, 2011), mas tem sido fortemente empregada nas pesquisas clínicas em DM na última década. O responsável pelo aumento no número de estudos acerca da AG foi a consolidação, embora sem um consenso internacional definido, da nova metodologia enzimática (Lucica® GA-L kit, *Asahi Kasei Pharma Corporation*, Japão) desenvolvida para a sua dosagem.

3. USO DA AG EM CONDIÇÕES QUE AFETAM A A1C

Na prática clínica, a A1C é utilizada como teste de referência para monitoramento glicêmico no DM, sendo, ainda, uma ferramenta diagnóstica incorporada desde 2010 (ADA, 2015). Todavia, existem algumas desvantagens pontuais e controvérsias que limitam o uso da A1C (Tabela 1), que estão relacionadas a certas situações clínicas ou aos métodos analíticos empregados para a sua análise (Sacks 2011, Cavagnoli, 2015). Estas condições podem gerar resultados falsamente elevados ou reduzidos nos níveis de A1C, sem estar verdadeiramente

correlacionado com a glicemia média (Raghav, 2014), implicando diretamente no manejo dos pacientes com DM.

Tabela 1 – Situações clínicas que exibem possíveis interferências nos níveis de A1C

Interferentes analíticos

Hemoglobinas variantes^{1*}

Uremia*

Interferentes fisiológicos

Gestação

Anemia por deficiência de ferro

Deficiência de ferro

Anemia hemolítica

Hemorragia

Neonatos²

Persistência hereditária de HbF²

*Nessa condição, alguns métodos certificados pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) podem ser empregados e obtidos níveis acurados de A1C.

¹HbS, HbC, HbE e HbD

²HbF é tanto um interferente analítico quanto um interferente fisiológico. Em níveis <30%, pode ser medido acuradamente por algumas metodologias certificadas pelo NGSP.

Fonte: Adaptado de Koga (2014).

3.1 AG E PRESENÇA DE ALTERAÇÕES NA HB

A AG pode ser utilizada em qualquer alteração hematológica que interfira no tempo de meia-vida das hemácias e/ou na estrutura ou características químicas da Hb (Raghav, 2014). Anemias hemolíticas e episódios de sangramento reduzem os valores de A1C, enquanto anemias ferroprivas ou deficiência de ferro, talassemias e hemoglobinopatias podem elevar estes resultados, estas últimas sendo responsáveis por interferências analíticas em alguns métodos (Silva, 2016; Cavagnolli, 2015; Koga, 2010). Durante o período fetal, o principal tipo de Hb presente nas hemácias é a Hb fetal (HbF), a qual vai gradualmente sendo substituída pela Hb A

após o nascimento. Uma vez que a A1C é um produto de glicação da HbA, neonatos tendem a possuir níveis falsamente diminuídos (Suzuki, 2011).

3.2 AG E GESTAÇÃO

Durante a gestação é recomendado que, tanto mulheres que já possuem DM1 ou DM2 quanto àquelas que desenvolvem diabetes mellitus gestacional (DMG), sejam acompanhadas pelo automonitoramento glicêmico e pelos níveis de A1C (ADA, 2015). Todavia, é bem estabelecido que durante os últimos meses de gestação há um aumento na demanda de ferro, o que diretamente reflete em mudanças nos níveis de A1C de mulheres grávidas em diferentes trimestres da gestação (Hashimoto, 2015). No estudo de Hashimoto et al (2010) conduzido em gestantes japonesas com DM, acompanhadas em quatro momentos da gravidez, foi evidenciado uma elevação significativa da A1C no final da gestação, mostrando uma relação inversa com a ferritina e a saturação da transferrina, ao passo que a AG manteve-se estável em todas as medições, por não sofrer interferência das mudanças fisiológicas características da gestação (Hashimoto, 2010).

3.3 AG E DOENÇA RENAL CRÔNICA (DRC)

Em pacientes com DM e doença renal crônica (DRC), a A1C pode não ser um marcador confiável do controle glicêmico, pois a DRC exibe muitas características que resultam em falsos resultados de A1C (Zhen, 2012). Pacientes com DRC geralmente apresentam deficiência de eritropoietina e, conseqüentemente, desenvolvem anemia. Deste modo, se faz necessária o uso de eritropoietina exógena para compensar a diminuição da síntese endógena pelo rim, assim como

de ferro, o que altera falsamente os níveis de A1C. Em adição, estes pacientes podem necessitar de frequentes transfusões de sangue e, quando em hemodiálise, apresentam uma diminuição de 20-50% do tempo de vida dos eritrócitos, contribuindo também para falsos valores de A1C (Vos, 2011). O aumento da uremia na DRC é responsável pela produção de uma Hb modificada, conhecida como Hb carbamilada, um fator interferente *in vitro* em algumas metodologias analíticas para dosagem de A1C (Cavagnolli, 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que a AG fornece um controle mais preciso da glicemia em pacientes com DRC em estágios avançados (Inaba, 2007; Freedman, 2010; Zhen, 2012; Sany, 2013). Contudo, na presença de proteinúria maciça na DRC, com diminuição da albumina sérica, os níveis de AG também podem ser falsamente alterados (Harada, 2014; Zhen, 2012), fazendo-se necessário uma avaliação crítica e adequação na escolha do melhor marcador glicêmico nessa condição.

Assim sendo, na presença de qualquer possível interferente da A1C, a AG pode ser uma alternativa adequada para o controle glicêmico do DM, uma vez que não é influenciada pela maioria destas condições (Koga, 2014).

4. AG NO DIAGNÓSTICO DE DM

Apesar do evidente valor informativo da A1C no monitoramento do DM, alguns autores têm questionado o ponto de corte utilizado para este teste no diagnóstico da doença. Isto porque os critérios atuais adotados mostram uma discrepância entre a proporção e perfil de pacientes identificados com DM pela A1C, em comparação aos testes baseados na glicemia (Carson, 2010; Cavagnolli, 2011). Em adição, aqueles pacientes que apresentam condições especiais que interfiram nos resultados de A1C, deveriam ser rastreados para DM com marcadores

alternativos. No Japão, com o surgimento do método Lucica GA-L[®] para análise de AG no soro, o novo marcador obteve aprovação clínica para uso. Desde então, alguns estudos de acurácia diagnóstica para DM têm sido publicados utilizando este método enzimático para análise de AG (Tabela 2).

Tabela 2 – Estudos de acurácia diagnóstica da AG e os respectivos pontos de corte encontrados para rastrear DM.

| Estudo | N | Região | Homens | IR AG (%) | DM cut-off | Sx E |
|----------------------|----------|---------------|---------------|------------------|-------------------|-------------|
| Tominaga et al. 2006 | 699 | Japão | 52% | 12.3 – 16.9 | - | - |
| Paroni et al. 2007 | 32 | Itália | 37% | 11.7 – 16.9 | - | - |
| Kohzuma et al. 2011 | 201 | EUA | 47% | 11.9 – 15.8 | - | - |
| Furusyo et al. 2011 | 1.575 | Japão | 30% | 12.2 – 16.5 | 15.5% | 83.3 x 83.3 |
| Hwang et al. 2014 | 852 | Coreia | 58% | - | 14.3% | 66.4 x 52.5 |
| Ikezaki et al. 2015 | 176 | Japão | 46% | - | 15.2% | 62.1 x 61.9 |
| Hsu et al. 2015 | 2.192 | Japão | 50% | - | 14.9% | 78.5 x 80.0 |

IR AG: intervalo de referência para AG; **S x E:** sensibilidade *versus* especificidade para os pontos de corte (*cut-off*) encontrados.

Fonte: Tabela criada pelos autores.

Em 2006, a Sociedade Japonesa de Diabetes (SJD) estabeleceu um intervalo de referência para AG de 12.3% a 16.9% (Tominaga, 2006). Anos mais tarde, Furusyo e colaboradores (2011) publicaram em estudo maior (n=1.575) um intervalo de referência de AG de 12.2% a 16.5%, corroborando com o reportado pela SJD. Ainda, este estudo encontrou que o ponto de corte de AG $\geq 15.5\%$ apresentou uma ótima sensibilidade e especificidade (83.3%) para identificar DM, utilizando a GJ e/ou A1C ($\geq 126\text{mg/dL}$ e $\geq 6,5\%$, respectivamente) como testes referência (Furusyo, 2011). Em 2015, o mesmo grupo avaliou 176 residentes do Japão diagnosticados com DM pelo teste oral de tolerância à glicose conforme critérios da OMS (WHO, 2013). A análise da curva ROC mostrou que a AG obteve diferenças significativas na área sob a curva (AUC) para diagnóstico de DM quando combinada com a GJ ou G2h, do que quando isolada (AUC: 0.863, 0.968 e 0.672, respectivamente) (Ikezaki, 2015).

Hwang et al (2014) estimaram diferentes pontos de corte de AG para o diagnóstico de DM e pré-DM em 852 indivíduos entre 20 e 83 anos na Coreia, utilizando os critérios da ADA para classificação da doença (ADA, 2015). O estudo encontrou um ponto de corte de 12.5% para identificar pré-DM e 14.3% para DM. Quando foram comparados os resultados de A1C e AG no diagnóstico de DM baseado nos testes de glicemia, foi percebida uma maior sensibilidade (66.4% AG *versus* 52.5% A1C), mas menor especificidade (88.3% AG *versus* 95.1% A1C) da AG para prever uma G2h $>200\text{mg/dL}$. Quando associado os valores de 14.3% de AG com o de 126mg/dL de GJ, foi obtida a maior sensibilidade (77.5%, IC: 72.17–82.0) para diagnóstico de DM (Hwang, 2014). Em comparação, Hsu e colaboradores (2015) descreveram um ponto de corte de AG $\geq 14.9\%$ para DM (sensibilidade: 78.5%; especificidade: 80.0%), avaliando 2192 indivíduos em Taiwan com média de idade de 60.1 anos. Ainda, quando comparado os valores de 5.7% e 6.5% de A1C dos participantes, a AG correspondente foi de 14.5% e 16.5%, respectivamente (Hsu, 2015).

Estudos menores obtiveram intervalos de AG entre 11.9 – 15.8% (em 201 residentes da Carolina do Norte, EUA) (Kohzuma, 2011), 10.2 – 16.1% (em 217 imigrantes africanos na América) (Sumner, 2015) e 10.5 – 17.5% (em 44 voluntários em estudo de validação no Canadá) (Rodriguez-Capote, 2015) em indivíduos saudáveis sem DM. Em jovens obesos com idade entre 10 a 18 anos, o valor de AG encontrado por Chan et al (2015) para diagnóstico de DM foi de $\geq 12\%$ quando utilizado a G2h como teste referência e $\geq 14\%$ quando a A1C (Chan, 2015).

5. AG NO MONITORAMENTO GLICÊMICO DE DM

Diferente do longo prazo para formação da A1C (cerca de 120 dias, tempo médio de vida dos eritrócitos), AG é formada em um período de aproximadamente 2 a 4 semanas (Figura 3) (Koga, 2014). Essa característica faz com que a AG seja mais fortemente correlacionada com as medidas contínuas de glicose, por ser mais sensível às rápidas alterações da glicemia, as quais não podem ser eficientemente identificadas somente com uma medida isolada de glicose plasmática (Kim, 2010; Danese, 2015).



Figura 3 – Representação das taxas de glicação da AG e A1C.

Fonte: Figura criada pelos autores.

Em comparação com a A1C, a AG é mais indicada para monitorar o início da terapia medicamentosa, tanto no DM1 quanto no DM2 (Yoshiuchi, 2008), ou até mesmo para controle do ajuste de dose e mudança de medicação (Hsu, 2015), pois os seus níveis diminuem mais rapidamente do que a A1C em um tratamento intensivo (Danese 2015). Paroni et al (2007) evidenciaram que a AG foi um melhor marcador para avaliar as respostas ao tratamento com insulina em pacientes DM2 com controle glicêmico inadequado e, ainda, que a AG mostrou uma maior correlação com a GJ do que a A1C ($r=0,75$ versus $r=0,54$, respectivamente) (Paroni, 2007). Em adição, no estudo de Yoon et al (2015) com pacientes avaliados no momento do diagnóstico de DM2 e acompanhados por mais de 4 anos, foi observado que a piora da função da célula beta-pancreática (avaliada pelos níveis de peptídeo-C estimulados por glicose) foi associada com o tempo de duração da doença e com o aumento da AG e da razão AG/A1C, mas não com a A1C isoladamente (Yoon, 2015a).

De um modo geral, enquanto os níveis de A1C são utilizados para retratar a glicemia média, a AG pode ser empregada para o mesmo fim e, ainda, para avaliar a variabilidade glicêmica e os níveis de glicose pós-prandial mais adequadamente (Suwa, 2010; Koga, 2014). A elevação da glicemia pós-prandial está associada com aumento do risco de doenças cardiovasculares e microangiopatia, sendo, portanto, importante a detecção desta hiperglicemia específica (Koga 2014). As razões pelas quais a AG se relaciona melhor com a glicemia pós-prandial ainda não estão elucidadas (Koga, 2010).

6. AG COMO PREDITOR DAS COMPLICAÇÕES EM LONGO PRAZO NO DM

A hiperglicemia crônica característica no DM é responsável por danos sistêmicos em portadores da doença e, conseqüentemente, aumenta consideravelmente o risco de

desenvolvimento de doenças micro e macrovasculares ao longo do tempo (SBD, 2015; ADA, 2015). A A1C é um marcador que tem sido fortemente explorado em pesquisas clínicas e inúmeras evidências concretizaram o seu uso como preditor para essas complicações (DCCT 1993, UKPDS 1998). Contudo, ainda é controverso se o principal fator determinante para os danos crônicos no DM é a glicemia média em si ou a variabilidade glicêmica (Nathan, 2014). Para isso, recentes estudos têm avaliado o potencial preditivo de testes que estão mais associados com a glicemia de curto prazo e que possam ser utilizados como marcadores alternativos à A1C, como a AG.

Selvin et al (2011) avaliaram, transversalmente, 1.600 indivíduos recrutados para o estudo *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) conduzido nos EUA. Os autores observaram que nos participantes com DM2, tanto a AG quanto a frutossamina foram significativamente associadas com as prevalências de albuminúria, DRC e retinopatia, mesmo após ajuste para covariáveis diversas (Selvin, 2011). Em estudo longitudinal, este mesmo grupo avaliou 12.306 participantes do ARIC, que foram acompanhados por mais de 20 anos e evidenciou que, tanto a AG quanto a frutossamina, se associaram de forma similar à A1C para predizer retinopatia e DRC no DM. Estes achados se confirmaram nos pacientes que foram diagnosticados com DM no período basal e naqueles que desenvolveram DM durante o seguimento. As razões de chances (OR) observadas para o surgimento de retinopatia em pacientes com DM quando os níveis de AG eram entre 15.7% e 23.0%, foram menores do que quando a AG era >23.0% (OR>8 e OR>15, respectivamente), mesmo em modelo estatístico ajustado para os níveis de A1C (Selvin, 2014).

Nathan et al. (2014) utilizou amostras de pacientes dos estudos DCCT e *Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications* (EDIC) para avaliar a correlação da AG com as complicações crônicas no DM1, em um tempo médio de seguimento de 6.5 anos (Nathan, 2014).

O estudo mostrou que a AG, assim como a A1C, foram fortemente associadas com o surgimento de retinopatia e nefropatia nos pacientes, não sendo evidenciada a mesma correlação com a glicemia média obtida por um perfil de sete pontos de medições de glicose. Em outro estudo com 154 pacientes DM1 acompanhados em média por 2.8 anos, a progressão para nefropatia foi associada somente com a AG e não com a A1C. O mesmo estudo não encontrou associação entre estes dois marcadores glicêmicos e os desfechos cardiovasculares (Yoon, 2015b).

7. LIMITAÇÕES DA AG

Embora a AG não seja influenciada pela anemia e demais condições citadas neste artigo, em situações que interfiram no metabolismo da albumina, a AG pode apresentar valores alterados (Tabela 3). Em teoria, a AG não é influenciada pelos níveis de albumina sérica, uma vez que seus valores são corrigidos para o total de albumina, porém baixos níveis da proteína se associam com o aumento das taxas de glicação. Por outro lado, o aumento do metabolismo da proteína reflete em menores níveis de AG (Bhonsle, 2012). Logo, em condições de hipertireoidismo, hipotireoidismo, cirrose hepática, síndrome nefrótica com proteinúria maciça, ou outras situações com níveis alterados de albumina no sangue, o uso da AG deve ser bem avaliado (Furusyo, 2013).

Tabela 3 – Situações clínicas que exibem possíveis interferências nos níveis de AG

Condições que aumentam o metabolismo da albumina

Hipertireoidismo
Síndrome de Cushing
Síndrome nefrótica
Uso de glicocorticoides
Hipercalciúria
Doença hepática não alcoólica com aumento de ALT*
Adiposidade visceral aumentada
Obesidade
Fumo

Condições que diminuem o metabolismo da albumina

Hipotireoidismo
Cirrose hepática
Emagrecimento

*enzima hepática ALT (alanina aminotransferase).

Fonte: Adaptado de Koga (2014).

Outras situações já descritas que podem influenciar os níveis de AG independentemente da glicemia, são a idade, obesidade e condição inflamatória, (observada pelo aumento da proteína C reativa), fumo, hipertrigliceridemia, entre outros (Koga, 2014; Koga, 2010; Furusyo, 2013). Existe pouca evidência sobre a interpretação da AG em diferentes grupos étnicos, porém o estudo de Selvin et al (2011) com 1.376 indivíduos sem DM e 343 com DM, mostrou que tanto a AG quanto a A1C estão significativamente elevadas em negros quando comparados aos brancos (Selvin, 2011). Sendo assim, os dados aqui apresentados mostram que também é preciso um cuidado na interpretação dos níveis de AG na presença de algumas situações clínicas. No entanto, pelo fato de este teste ser relativamente novo, poucos estudos sobre os interferentes da AG foram publicados.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A AG é um marcador da glicemia de curto prazo que tem sido avaliado como um teste alternativo à A1C em pacientes com DM. Em comparação a A1C, a AG se mostra mais confiável para avaliação da variabilidade glicêmica, é especialmente indicada para pacientes em hemodiálise e não sofre interferência na presença de anemias ou processos hemolíticos. Em comparação à dosagem de frutamina, a AG é mais vantajosa, pois não é influenciada pela concentração das proteínas séricas e possui uma metodologia enzimática de análise de fácil e rápida execução, com alta eficácia analítica e maior padronização. Como descrito anteriormente, em situações clínicas que alterem falsamente os níveis de A1C, a medida de AG pode atribuir um resultado confiável para o acompanhamento glicêmico no DM. No entanto, a fisiologia de formação das duas moléculas garante vantagens à AG frente a A1C no acesso do controle da glicemia, mesmo na ausência destes interferentes. Por fim, muitos estudos tem demonstrado que a AG tem uma boa acurácia diagnóstica e está fortemente associada às complicações microvasculares no DM. Entretanto, é necessário um consenso internacional sobre o uso deste teste, para garantir a sua inclusão na rotina clínica e laboratorial mundial, melhorando, assim, o rastreamento e manejo de pacientes com DM no futuro.

REFERÊNCIAS

- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2015;(supplement)38:S1-S94.
- Anguizola J et al. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta* 2013;425:64-76.
- Arasteh A, Farahi S, Habibi-Rezaei M, Moosavi-Movahedi AA. Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 2014;13:49.
- Barbany OS, Cerny RL, Clarke W, Hage DS. Quantitative analysis of glycation patterns in human serum albumin using 16O/18O-labeling and MALDI-TOF MS. *Clin Chim Acta* 2011;412:1606-15.
- Bhonsle HS et al. Low plasma albumin levels are associated with increased plasma protein glycation and HbA1c in diabetes. *J. Proteome Res* 2012;11:1391-1396.
- Carson AP, Reynolds K, Fonseca VA, Muntner P. Comparison of A1c and fasting glucose criteria to diagnose diabetes among US adults. *Diabetes Care* 2010;33:95-97.
- Cavagnolli G. A1C no diagnóstico do diabetes mellitus: fatores que afetam sua interpretação e sua relação com a doença renal. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Endocrinologia, Porto Alegre.
- Cavagnolli G, Comerlato J, Comerlato C, Renz PB, Gross JL, Camargo JL. HbA1c measurement for the diagnosis of diabetes: is it enough? *Diabetec Medicine* 2011; 28(1):31-5.
- Cavagnolli G, Pimentel AL, Freitas PA, Gross JL, Camargo JL. Factors affecting A1C in non-diabetic individuals: Review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2015;445:107-14.
- Chan CL, Pyle L, Kelsey M, Newnes L, Zeitler PS, Nadeau KJ. Screening for type 2 diabetes and prediabetes in obese youth: evaluating alternate markers of glycemia – 1,5-anhydroglucitol, fructosamine, and glycated albumin. *Pediatric Diabetes* 2015.
- Cohen MP. Intervention strategies to prevent pathogenetic effects of glycated albumin. *Arch Biochem Biophys* 2003;419(1):25-30.
- Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, Lippi G. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2015;9(2):169-76.
- Freedman BI et al. Comparison of glycated albumin and hemoglobin A1c concentrations in diabetic subjects on peritoneal and hemodialysis. *Perit Dial Int* 2010;30(1):72-9.

Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(12):5509-14.

Furusyo N et al. Utility of glycated albumin for the diagnosis of diabetes mellitus in a Japanese population study: results from the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *Diabetologia* 2011;54(12):3028-36.

Garlick RL, Mazer JS. The principal site of nonenzymatic glycosylation of human serum albumin in vivo. *J Biol Chem* 1983;258:6142–6.

Harada K, Sumida K, Yamaguchi Y, Akai Y. Relationship between the accuracy of glycemic markers and the chronic kidney disease stage in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Nephrol* 2014;82(2):107-14.

Hashimoto et al. A1C but Not Serum Glycated Albumin Is Elevated Because of Iron Deficiency in Late Pregnancy in Diabetic Women. *Diabetes Care* 2010;33(3):509-11.

Hashimoto K, Koga M. indicators of glycemic control in patients with gestational diabetes mellitus and pregnant women with diabetes mellitus. *World Journal of Diabetes* 2015;6(8):1045-56.

Hsu P et al. A comparison of glycated albumin and glycosylated hemoglobin for the screening of diabetes mellitus in Taiwan. *Atherosclerosis* 2015;242(1):327-33.

Hwang YC et al. Optimal glycated albumin cutoff value to diagnose diabetes in Korean adults: a retrospective study based on the oral glucose tolerance test. *Clin Chim Acta* 2014;437:1-5.

Ikezaki H et al. Glycated albumin as a diagnostic tool for diabetes in a general Japanese population. *Metabolism* 2015;64(6):698-705.

Inaba M et al. Glycated albumin is a better glycemic indicator than glycated hemoglobin values in hemodialysis patients with diabetes: effect of anemia and erythropoietin injection. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:896–903.

International Diabetes Federation (IDF). *IDF Diabetes Atlas seventh edition 2015*. Disponível em: www.diabetesatlas.org. Acesso em: 05 de janeiro de 2016.

Khan MS, Tabrez S, Rabbani N, Shah A. Oxidative Stress Mediated Cytotoxicity of Glycated Albumin: Comparative Analysis of Glycation by Glucose Metabolites. *J Fluoresc* 2015;25(6):1721-6.

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.

Kisugi R et al. Structural and glycation site changes of albumin in diabetic patient with very high glycated albumin. *Clin Chim Acta* 2007;382:59–64.

- Koga M, Kasayama S. Clinical impact of glycated albumin as another glycemic control marker. *Endocr J* 2010;57:751–62.
- Koga M. Glycated albumin; clinical usefulness. *Clin Chim Acta* 2014;433:96-104.
- Kohzuma T, Koga M. Lucica GA-L glycated albumin assay kit: a new diagnostic test for diabetes mellitus. *Mol Diagn Ther* 2010;14:49–51.
- Kohzuma T, Yamamoto T, Uematsu Y, Shihabi ZK, Freedman BI. Basic Performance of an Enzymatic Method for Glycated Albumin and Reference Range Determination. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2011;5(6):1455-1462.
- Kouzuma T, Usami T, Yamakoshi M, Takahashi M, Imamura S. An enzymatic method for the measurement of glycated albumin in biological samples. *Clin Chim Acta* 2002;324(1-2):61–71.
- Koga M, Murai J, Saito H, Kasayama S. Glycated Albumin and Glycated Hemoglobin Are Influenced Differently by Endogenous Insulin Secretion in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2010;33(2):270-272.
- Montagnana M, Paleari R, Danese E, Salvagno GL, Lippi G, Guidi GC, Mosca A. Evaluation of biological variation of glycated albumin (GA) and fructosamine in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2013;423:1-4.
- Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ. A1c-Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes Care* 2008;31:1473–1478.
- Nathan DM, McGee P, Steffes MW, Lachin JM. DCCT/EDIC Research Group. Relationship of glycated albumin to blood glucose and HbA1c values and to retinopathy, nephropathy, and cardiovascular outcomes in the DCCT/EDIC study. *Diabetes* 2014;63(1):282-90.
- National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). Factors that interfere with HbA1c test results. 2015. Disponível em: <http://www.ngsp.org/factors.asp>. Acesso em: 04 de dezembro de 2015
- Paroni R et al. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma. *Clinical Biochemistry* 2007;40:1398–1405.
- Raghav A, Ahmad J. Glycated serum albumin: a potential disease marker and an intermediate index of diabetes control. *Diabetes Metab Syndr* 2014;8(4):245-51.
- Rodriguez-Capote K, Tovell K, Holmes D, Dayton J, Higgins TN. Analytical Evaluation of the Diazyme Glycated Serum Protein Assay on the Siemens ADVIA 1800: Comparison of Results Against HbA1c for Diagnosis and Management of Diabetes. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2015;9(2):192-199.

Rondeau P, Bourdon E. The glycation of albumin: structural and functional impacts. *Biochimie* 2011;93:645-658.

Roohk HV, Zaidi AR. A review of glycated albumin as an intermediate glycation index for controlling diabetes. *Journal of diabetes science and technology* 2008;8:1114-21.

Sacks DB et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011;57(6):e1-e47.

Sacks DB, Fonseca V, Goldfine AB. Diabetes: Advances and Controversies. *Clinical Chemistry* 2011;57(2):147-49.

Sany D, Elshahawy Y, Anwar W. Glycated albumin versus glycated hemoglobin as glycaemic indicator in hemodialysis patients with diabetes mellitus: variables that influence. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2013;24(2):260-73.

Selvin E, Rawlings AM, Grams M, Klein R, Sharrett AR, Steffes M, Coresh J. Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complications: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2(4):279-88.

Selvin E, Steffes MW, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL. Racial differences in glycaemic markers: a cross-sectional analysis of community-based data. *Ann Intern Med* 2011;154:303–309.

Silva JF, Pimentel AL, Camargo JL. Effect of iron deficiency anaemia on HbA1c levels is dependent on the degree of anaemia. *Clin Biochem* 2016;49(1):117-20.

Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology: Official Journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology* 2014;18(1):1-14.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2014 – 2015. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica, 2015.

Sumner AE et al. A1C Combined With Glycated Albumin Improves Detection of Prediabetes in Africans: The Africans in America Study. *Diabetes Care* 2016;39(2):271-7.

Suwa T et al. Relationship between clinical markers of glycemia and glucose excursion evaluated by continuous glucose monitoring (CGM). *Endocr J* 2010;57:135–40.

Suzuki S et al. Glycated albumin but not HbA1c reflects glycaemic control in patients with neonatal diabetes mellitus. *Diabetologia* 2011;54:2247–2253.

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (DCCT). 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;329:977–986:405–412.

Tominaga M et al. Report of the committee on standardization of laboratory testing related to diabetes mellitus of Japan Diabetes Society: determination of reference intervals of hemoglobin A1c (IFCC) and glycoalbumin in the Japanese population. *J Japan Diab Soc* 2006;49:825–833.

U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. 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;352:837–53.

Ueda Y, Matsumoto H. Recent topics in chemical and clinical research on glycated albumin. *J Diabetes Sci Technol* 2015;9(2):177-82.

Vos FE, Schollum JB, Walker RJ. Glycated albumin is the preferred marker for assessing glycaemic control in advanced chronic kidney disease. *NDT Plus* 2011;4(6):368-375.

Watano T, Sasaki K, Omoto K, Kawano M. Stability of stored samples for assays of glycated albumin. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;101(1):e1-2.

World Health Organization (WHO). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. 2001. Disponível em: [hwww.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf](http://www.who.int/diabetes/publications/report-hba1c_2011.pdf). Acesso em: 04 de dezembro de 2015.

Yoon H et al. Glycated Albumin Levels in Patients with Type 2 Diabetes Increase Relative to HbA1c with Time. *BioMed Research International* 2015a;2015:1-8.

Yoon H et al. Glycated albumin and the risk of micro- and macrovascular complications in subjects with Type 1 Diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2015b;14:53.

Yoshiuchi K et al. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2008;55(3):503-7.

Zheng CM, Ma WY, Wu CC, Lu KC. Glycated albumin in diabetic patients with chronic kidney disease. *Clin Chim Acta* 2012;413(19-20):1555-61.

Ziemer DC et al. Glucose-Independent, Black-White differences in hemoglobin A1c levels. *Ann Intern Med* 2010;152(12):770-7.

OBJETIVO

Avaliar e comparar o desempenho de dois métodos enzimáticos disponíveis para dosagem de AG e estabelecer intervalo de referência para os níveis de AG em indivíduos saudáveis do Sul do Brasil.

Capítulo 2

Performance evaluation of two enzymatic methods for glycated albumin and reference range determination in normoglycemic individuals from Southern Brazil

Priscila Aparecida Correa Freitas ¹

Lethicia Ehlert Rozales ²

Joíza Lins Camargo ^{1,3*}

¹ Post-Graduate Program in Endocrinology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

² Biomedicine Student, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brazil

³ Endocrinology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author:

Joíza 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.edu.br

Artigo Original a ser submetido ao Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

List of Non-Standard Abbreviations:

A1C – Glycated hemoglobin

BMI – Body mass index

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute

CV – Coefficient of variability

CV%inter – Coefficient of variability inter-assay

CV%intra – Coefficient of variability intra-assay

DM – Diabetes mellitus

FG – Fasting glucose

GA – Glycated albumin

HCPA – Hospital de Clinicas de Porto Alegre

R – Coefficient of correlation

RBC – Red blood cell count

SD – Standard deviation

ABSTRACT:

Glycated albumin (GA) is a test that has acquired highlight in studies regarding Diabetes Mellitus (DM), as an alternative laboratory marker to glycated hemoglobin (A1C). GA reflects a short-term glucose monitoring, and it is not influenced by hemoglobin metabolism. Recently, a new enzymatic methodology for the specific measurement of GA in blood has been reported. We carried out an experimental study for the analytical evaluation of two GA enzymatic assays commercially available in Brazil ("Glycated albumin assay kit", Crystal Chem, Illinois, EUA and "GlycoGap", Diazyme, California, EUA). We performed a method comparison between the two kits with 85 samples from diabetic and non-diabetic patients, following *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) recommendations. Afterwards, the kit with less imprecision was evaluated in an interference experiment and the GA reference range was determinate. There were excellent correlation and agreement between methods ($R= 0.91$, $p<0.001$; bias= 1.2%). Diazyme[®] GA assay presented the best non-automated analytical precision (CV% total of 3.5% and 3.8% for Diazyme[®] and Crystal Chem[®] methods, respectively) and a total automated imprecision of 3.2%. There was no interference of hemoglobin up to 6.0 g/L in Diazyme[®] GA results, however bilirubin at 128.2 $\mu\text{mol/L}$ and triglycerides at 4.6 mmol/L showed a bias >10% in GA levels. The reference interval for GA in healthy Brazilians (n= 140) was 11.8% to 17.8%. GA showed an overall strong correlation with A1C ($R= 0.79$, $p<0.001$). In conclusion, our data shows a good analytical performance for the two GA enzymatic assays analysed, although it remains uncertain the real effect of interfering substances on this reaction. The association between A1C and GA demonstrates that this new marker may be useful in the assessment of glycemic control when A1C results are unreliable.

Key words: Glycated albumin; method comparison; reference range; Diabetes Mellitus

1. Introduction

Diabetes Mellitus (DM) is a worldwide healthcare issue associated with several clinical outcomes and extensive costs for the health system (IDF, 2015). The chronic hyperglycemia is a striking characteristic of diabetic patients, responsible for micro and macrovascular damage with the time. Glycated haemoglobin (A1C) is the current reference test for long-term glycaemic monitoring, and it is also a tool for diagnose DM, as well as to predict its complications (ADA, 2015; SBD, 2015). However, there are many conditions which may implicate in false and unsuitable A1C results, such as haemolytic, renal or iron deficiency anemia, hemoglobinopathies, pregnancy and uremia (Sacks, 2011; Cavagnoli, 2015; Silva, 2016). In all these situations the clinical interpretation of A1C results is very difficult and the use of alternative markers for monitoring DM is often necessary.

Fructosamine is a laboratory test which measures the amount of plasmatic glycosylated proteins. Consequently, it reflects a short-term glycaemic control due the brief half-life time of these proteins (Danese, 2015). However, fructosamine levels are easily influenced by low-molecular-weight compounds coexisting in the blood, and its values are dependent on the total protein concentration, which does not ensure a specific result (Raghav, 2014; Kohzuma, 2002). Once the albumin is the most prevalent serum protein, the specific quantification of glycosylated albumin (GA) may be more helpful to clinical interpretation. There are several analytical techniques for GA, but none of these single methods show essential characteristics, such as high accuracy, quickness and a low cost to be performed (Paroni, 2007; Furusyo, 2013). However, even fructosamine and GA are not affected by the conditions that interfere on A1C analysis, these tests have not acquired the same popularity than A1C (Paroni, 2007; Raghav, 2014).

In 2002, Kohzuma and colleagues described an enzymatic method for GA measurement, which uses an albumin-specific proteinase. This method expresses the GA results as a percentage

of the glycated fraction of total serum albumin, by a faster, easier and more cost-effective technique than the previous described (Kohzuma, 2002). This assay was first commercially registered as Lucica GA-L[®] by Asahi Kasei Pharma from Japan, and subsequently, it was marketed by other manufacturers. Thenceforward, some authors have evaluated the analytical performance of this new test (Paroni, 2007; Kohzuma, 2011), and also studied its clinical utility for DM (Nathan 2014; Selvin, 2014; Fredman, 2010; Koga, 2014). GA has showed a better correlation with glucose excursions and post-prandial hyperglycemia than A1C, which made it more indicated for assessing treatment efficacy (Paroni, 2007; Yoshiuchi, 2008; Hsu, 2015). Furthermore, GA seems to have a similar association with A1C in predicting microvascular complications in DM type 1 (Nathan, 2014; Yoon, 2015b) and type 2 (Selvin, 2011; Selvin, 2014). It seems also to be a useful marker for screening the disease (Hsu, 2015; Hwang, 2014; Ikezaki, 2015; Furusyo, 2011; Chan, 2015). However, GA test is not widely available in laboratories and is not recommend by international guidelines, except in Japan (Koga, 2014).

The aim of the present study was to perform a verification and comparison between two different kits of enzymatic assay for GA and access its correlation with A1C. Also, we established a reference range of GA values in a sample of normoglycemic Brazilians.

2. Materials and Methods

This is an experimental study of methods verification and comparison that followed the EP09-A3 protocol of Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) for method comparison (CLSI, 2013). The protocol of verification is summarized in Figure 1.

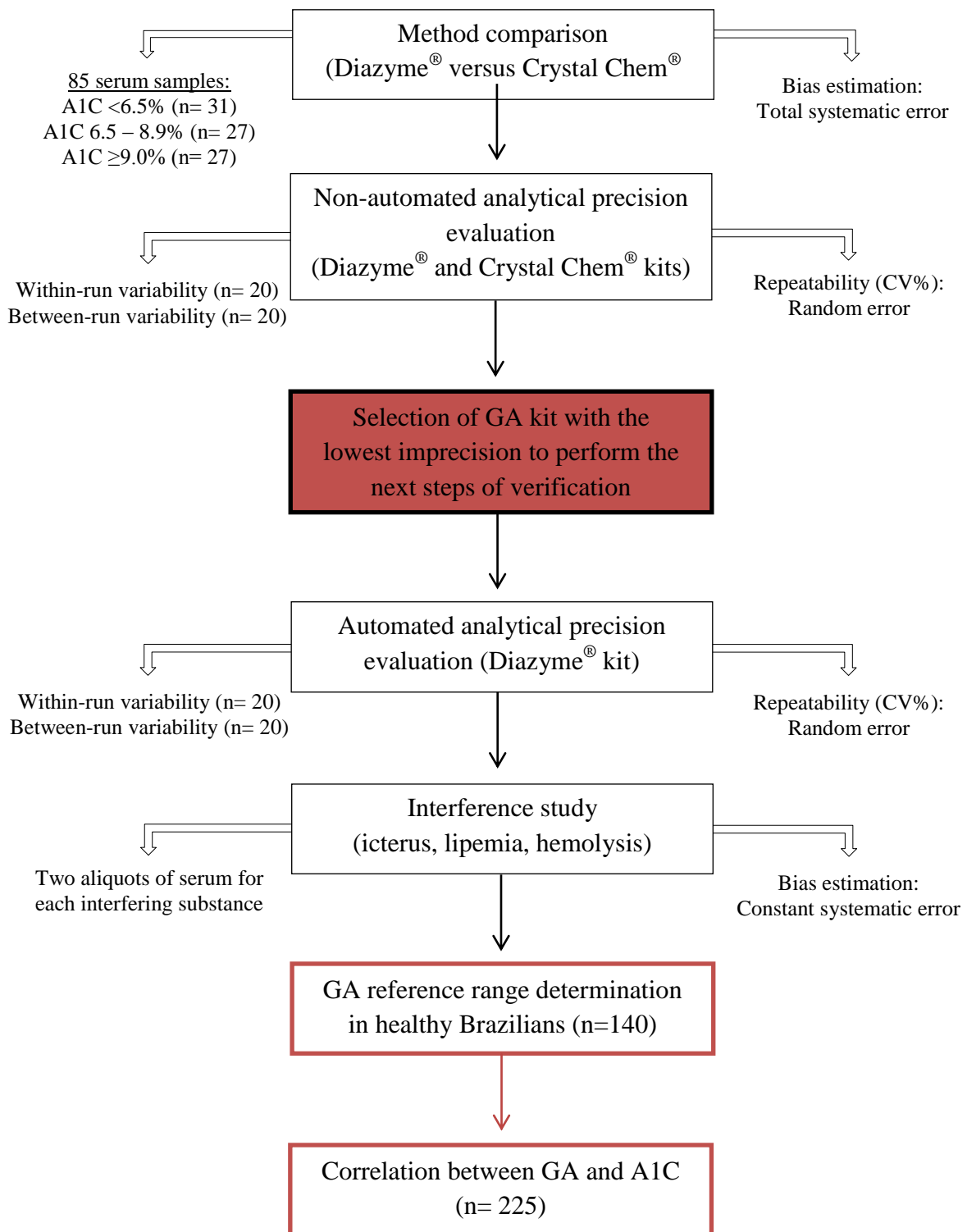


Figure 1 – Verification study protocol.

2.1 *Patients description*

To perform an analytical evaluation of the enzymatic kits, we selected blood samples from adult patients (≥ 18 years old) from Clinical Biochemistry department at a university hospital in Brazil. To ensure that GA concentrations would cover the entire analysis range of the methods, we selected patients with low A1C levels (A1C $< 6.5\%$; $n = 31$), mild pathological A1C levels (A1C from 6.5% to 8.9%; $n = 27$) and severe pathological A1C levels (A1C $\geq 9.0\%$; $n = 27$). Moreover, the patients selected should have blood samples without anticoagulant collected on the same day of the A1C, to allow GA measurement.

We excluded patients with conditions which could influence GA or A1C levels, such any type of anemia, patients undergoing erythropoietin treatment, pregnant women, and patients with chronic renal disease, hypothyroidism, hyperthyroidism or cirrhosis.

Random serum specimens from outpatients attending Clinical Biochemistry department for routine blood tests were selected to perform interference studies to evaluate the effect of hemolysis, lipemia and bilirubinemia on GA levels. Hemolysis was induced in a blood specimen preserved in K2EDTA (BD Vacutainer[®] EDTA K2 4 mL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), by addition of distilled water (proportion 1:4) and subsequently centrifugation for hemolysate plasma removal ($3000 \times g$, 10 min). Serum samples (BD SST[®] II Advance[®] 5 mL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) with icterus (total bilirubin $> 342 \mu\text{mol/L}$) and lipemia (triglycerides $> 11.29 \text{ mmol/L}$) were also reserved.

To establish the reference range for GA and to correlate GA levels with A1C values, we invited some volunteers for one single peripheral blood collection after overnight fasting. Two specimens of blood were obtained: one preserved in K2EDTA (BD Vacutainer[®] EDTA K2 4 mL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) and one without anticoagulant (BD SST[®] II

Advance[®] 5 mL, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Serum was achieved from the second sample collected, by centrifugation (3000×g, 10min) not longer than 30 minutes after venipuncture. Only adults individuals (≥18 years old) from both sex, who auto-declared without DM or prediabetes or any comorbid associated with interferences in A1C or GA levels, as listed above, were included. We also excluded those participants that were classified with DM or prediabetes by fasting glucose and/or A1C after the recruitment, according to American Diabetes Association criteria (ADA, 2015), and those with abnormal serum albumin concentration (<30.5 g/L and >50.5 g/L).

All samples were frozen over -80°C and only thawed once on the day of the analyses, by a 4°C temperature for thawing.

2.2 Method comparison

We compared two kits for GA by the enzymatic assay available for Brazil: “Glycated albumin assay kit” (Crystal Chem, Illinois, EUA) and “GlycoGap (Diazyme, California, EUA). The kit Lucica GA-L[®] from Asahi Kasei Pharma, was not included in our study because it is not commercially available in Brazil. However, the two kits studied here have proposed the same enzymatic reaction than Lucica GA-L[®], using an albumin-specific proteinase.

GA was measured in 85 serum samples by the two methods, in a period of five days, using the same reagent lots, by manual procedure (Anthos Zenyth 200 Microplate Reader, Biochrom, England). We evaluated the analytical imprecision of the assays, using two lyophilized control materials by each manufacturer, with high (pathological) and low (normal) levels of GA. Within (n= 20) and between-run (n= 20) repeatability was estimated by calculating the coefficient of variability intra-assay (CV%intra) and inter-assay (CV%inter) for the two enzymatic kits, respectively. CV% total was calculated as: $\sqrt{(CV\%intra + CV\%inter)}$.

GA kit with less imprecision was used in the next step of the verification and incorporated in our research laboratory. Also, we established the within and between-run repeatability using an automatic Cobas501 biochemistry analyzer, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany.

2.3 Interference study

To verify the influence of hemoglobin, bilirubin and triglycerides on GA results, we performed a study based on EP7-A2 protocol of CLSI (CLSI, 2005). We spiked crescent concentrations of interfering substances (described in 2.1) separately, on aliquots prepared of two specimens containing low and high values of GA, and normal levels of hemoglobin, bilirubin and/or triglycerides. GA was measured in each sample, before and after addition of interfering substances. Total bilirubin, conjugated bilirubin, and triglycerides were analyzed by automated colorimetric assays (Cobas C501, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), and free hemoglobin was measured by a blood gas analyzer (ABL800 flex, Radiometer, Copenhagen, Denmark), in all aliquots. We calculated the bias of interference by the difference between expected and observed GA levels, in the specimens used for each interfering substance. Average bias were considered analytical significant when exceeding $\pm 10\%$ of expected value, regarding the basal level.

2.4 Reference range determination

GA levels were measured in 144 volunteers by an automatic biochemistry analyzer (Cobas C501, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany), using the enzymatic kit GlycoGap[®] (Diazyme, California, EUA). The reference range was shown as mean \pm 2 standard deviations (SD). We excluded outliers after its identification by Grubs' test (Grubs, 1969).

2.5 Association between GA and A1C

Pearson's coefficient of correlation (R) was estimated from results of A1C measured by high performance liquid chromatography (HPLC) method (VARIANT II™ System, Bio-Rad, California, EUA) and GA, in all samples of this study (N = 225), for both A1C <6.5% and A1C ≥6.5%.

2.6 Ethical considerations

The authors have signed a term for use of biological samples and their associated information, before perform the method verification. Also, each volunteer of the reference range study signed the informed consent previously of their participation.

2.7 Statistical analysis

Values were expressed as mean ± SD, median (interquartile interval), frequencies (%) or CV%, when appropriated. Pearson coefficient (or coefficient of correlation) and Bland-Altman plot were performed to assess the correlation and concordance of methods, respectively. Shapiro-Wilk test was applied to verify the normality of samples. Wilcoxon, paired and independently T-tests, One-way ANOVA and Kruskal-Wallis were used to compare medians and means between GA methods or GA and A1C. All statistical analyses were performed using the software Statistical Package for Social Sciences® (SPSS, version 18.0) and results were considered as statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

Methods comparison

Laboratory and demographic characteristics of the patients included in this methods verification and comparison study are depicted in Table 1. All individuals showed normal levels of creatinine and urea, as well as in full blood cell count parameters. Fasting glucose (FG), A1C,

GA and creatinine values were significantly different ($p < 0.001$) into categories of A1C, as expected.

Table 1 – Demographic and laboratory characteristics of patients included in the methods comparison study.

| | All | A1C <6.5% | A1C 6.5–8.9% | A1C ≥9% | p |
|----------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|--------|
| N | 85 | 31 | 27 | 27 | |
| Age (years old) | 61.2 ± 12.5 | 56.4 ± 21.8 | 63.2 ± 12.3 | 59.3 ± 11.5 | 0.288 |
| Man (%) | 32 (37.6) | 10 (32.3) | 8 (29.6) | 14 (51.9) | 0.179 |
| FG (mg/dL) | 160.5 (113.5 – 224.5) | 101.5 (95.2 – 108.7) | 147.0 (114.0 – 179.5) | 212.5 (125.7 – 256.0) | *0.001 |
| A1C (%) | 9.1 ± 2.3 | 5.8 ± 0.3 | 7.8 ± 0.6 | 10.3 ± 1.4 | *0.001 |
| Albumin (g/dL) | 4.4 ± 0.4 | 4.6 ± 0.5 | 4.5 ± 0.5 | 4.4 ± 0.4 | 0.318 |
| RBC (10 ⁶ /μL) | 4.5 ± 0.4 | 4.5 ± 0.4 | 4.5 ± 0.4 | 4.7 ± 0.4 | 0.081 |
| Hemoglobin (g/L) | 13.6 ± 1.2 | 13.4 ± 1.0 | 13.4 ± 1.1 | 13.9 ± 1.3 | 0.143 |
| Hematocrit (%) | 39.9 ± 3.3 | 39.7 ± 2.7 | 39.8 ± 3.4 | 41.5 ± 3.2 | 0.098 |
| Urea (mg/dL) | 38.2 ± 10.5 | 35.8 ± 10.2 | 42.3 ± 11.5 | 32.7 ± 13.9 | 0.067 |
| Creatinine (mg/dL) | 0.81 ± 0.21 | 0.70 ± 0.18 | 0.73 ± 0.21 | 0.84 ± 0.15 | *0.037 |
| Crystal Chem [®] GA (%) | 19.3 (16.9 - 24.9) | 14.9 (12.9 - 17.8) | 17.9 (16.0 - 21.2) | 21.1 (18.9 - 25.8) | *0.001 |
| Diazyme [®] GA (%) | 23.7 (17.6 - 27.0) | 15.7 (13.2 - 17.6) | 18.9 (16.9 - 24.9) | 22.2 (19.9 – 30.4) | *0.001 |

FG: fasting glucose; **RBC:** red blood cell count. Patients are divided into categories of A1C, considering the criteria applied to selection for methods verification. Data presenting as mean ± SD or median (interquartile interval).

*p-value shows a statistically significant difference between all A1C categories (One-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests).

Figure 2 shows the correlation between GA measured by Crystal Chem[®] and Diazyme[®] kits. These methods presented an excellent and significant correlation ($R= 0.91$; $p<0.001$). Figure 3 shows the Bland-Altman plot, to assess the concordance between the two assays. The methods presented a good overall agreement between their results ($1.2 \pm 2.5\%$; mean of differences \pm 2SD of differences). However, it is possible to note a larger dispersion of results with higher GA levels, indicating a lower concordance between of the assays dependent on GA levels. Three results were outside the limits of concordance for the methods (6.2 to -3.8), with an absolute bias of 6.9, 7.3 and 10.3%. All discordant results presented severe pathological A1C levels ($>9.0\%$) and, consequently, higher GA. When GA values by the two enzymatic assays of these outliers were compared, it was observed that Crystal Chem[®] kit exhibited the lowest results.

Considering all results altogether, there was a statistically significant difference between GA by the two methodologies ($p= 0.001$). Therefore, we compared the GA values obtained by the two assays in the different categories of A1C (A1C $<6.5\%$; A1C $6.5\% - 8.9\%$ and $\geq 9\%$) separately. There was no difference for GA values between methods when A1C values were lower than 6.5% ($p= 0.214$). In contrast, when A1C levels were higher than 6.5% , GA results from both methods were statistically different ($p= 0.003$ and $p= 0.007$, for A1C between $6.5\% - 8.9\%$ and for A1C $\geq 9\%$, respectively; data not shown). The results obtained by Crystal Chem[®] kit were lower than those obtained by Diazyme[®] kit throughout all measurements.

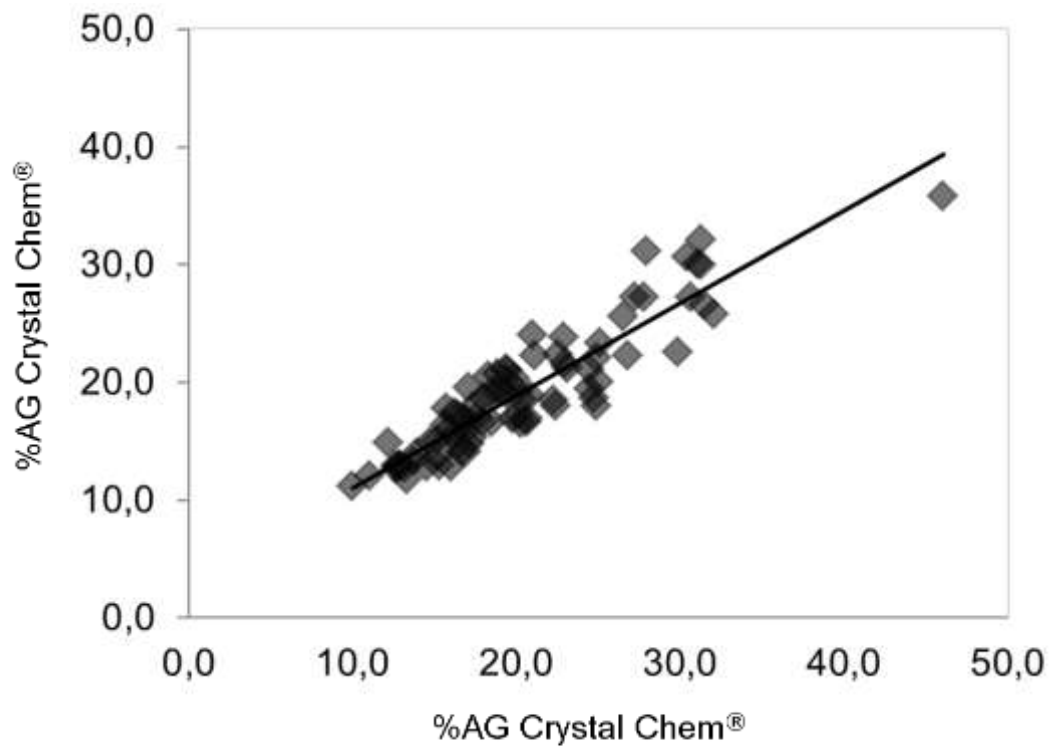


Figure 2 – Correlation between GA by Crystal Chem® and Diazyme® methods (N= 85) in non-diabetic and diabetic patients (R= 0.91; p<0.001).

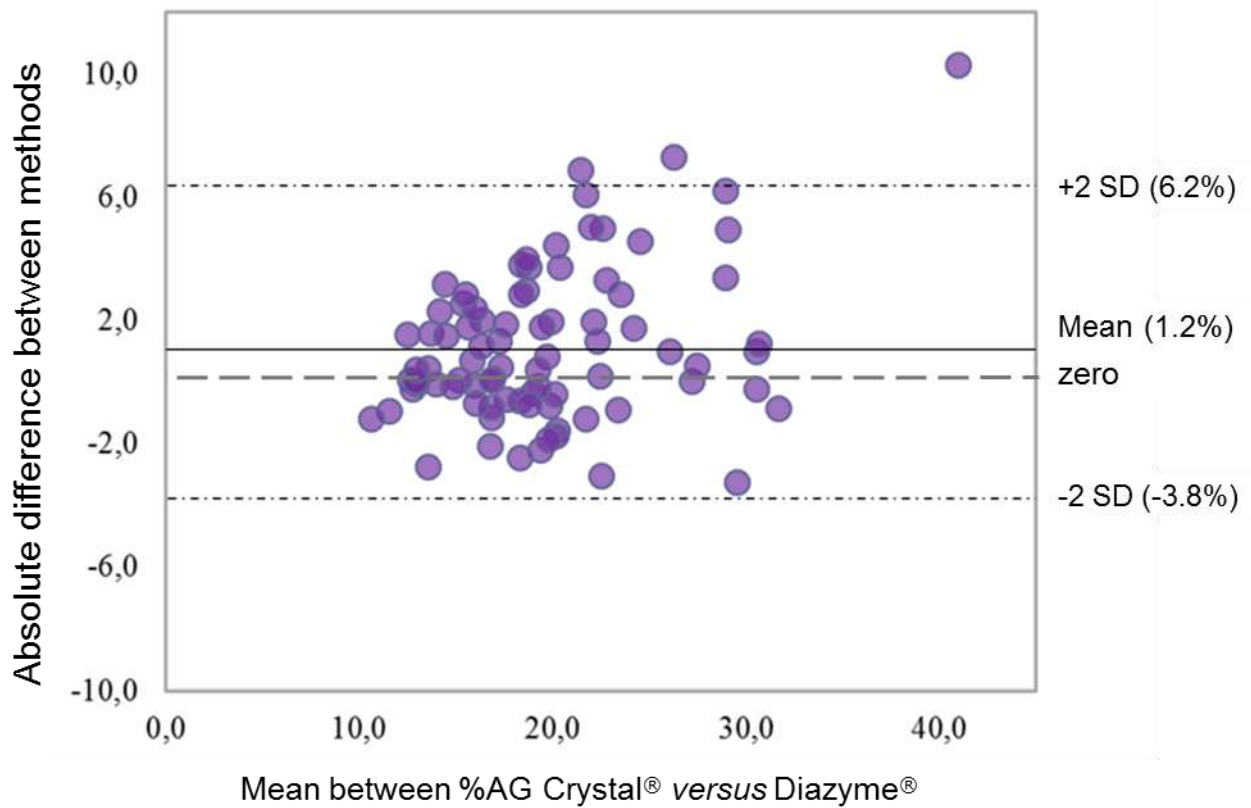


Figure 3 – Bland-Altman plot for concordance analysis between GA by Crystal Chem[®] and Diazyme[®] methods. Central line illustrates the mean of absolute difference between methods (bias = 1.2%) and dashed lines show 95% limit of agreement (mean of differences \pm 2 SD; 6.2% to -3.8%).

CV%intra, CV%inter and CV% total for Diazyme[®] and Crystal Chem[®] kits were 3.5%, 8.7% and 3.5% and 4.8%, 10.0% and 3.8%, respectively. Accordingly, we accomplished the next steps of this study using Diazyme[®] GA assay, once this kit exhibited the lower analytical imprecision, observed by its CV% values. Repeatability of Diazyme[®] was then assessed using Cobas501 automatic analyzer. CV%intra, CV%inter and CV% total for the two quality control levels were 3.4%, 3.0% and 2.5% (data not illustrated).

Interference study

Figure 4 presented the interference bias of hemolysis, lipemia and icterus in GA levels measured by Diazyme[®] kit. Bilirubin showed a bias <10% up to 68.4 $\mu\text{mol/L}$, and reached a negative interference (-21%) at 128.2 $\mu\text{mol/L}$. Free hemoglobin did not exceed bias limits of $\pm 10\%$ in AG results up to concentrations of 6.0 g/L. Triglycerides implicated a positive interference of +14% at 4.6 mmol/L and showed a bias of +23% at 7.5 mmol/L; the highest and final concentration tested.

Reference range study

Table 2 presents the laboratory results and demographic characteristics of volunteers who participated in the reference range. One hundred forty-four apparently healthy individuals were included, but 4 of them were excluded: 2 due the presence of prediabetes by A1C ($\geq 5.7\%$) results and 2 due to be identified as outliers in GA levels by Grubs' test. Consequently, we analyzed 140 individuals without DM, prediabetes nor other condition which could interfere with GA results. The number of participants included is in accordance to EP28-A3C protocol of CLSI for verifying reference intervals (CLSI, 2010).

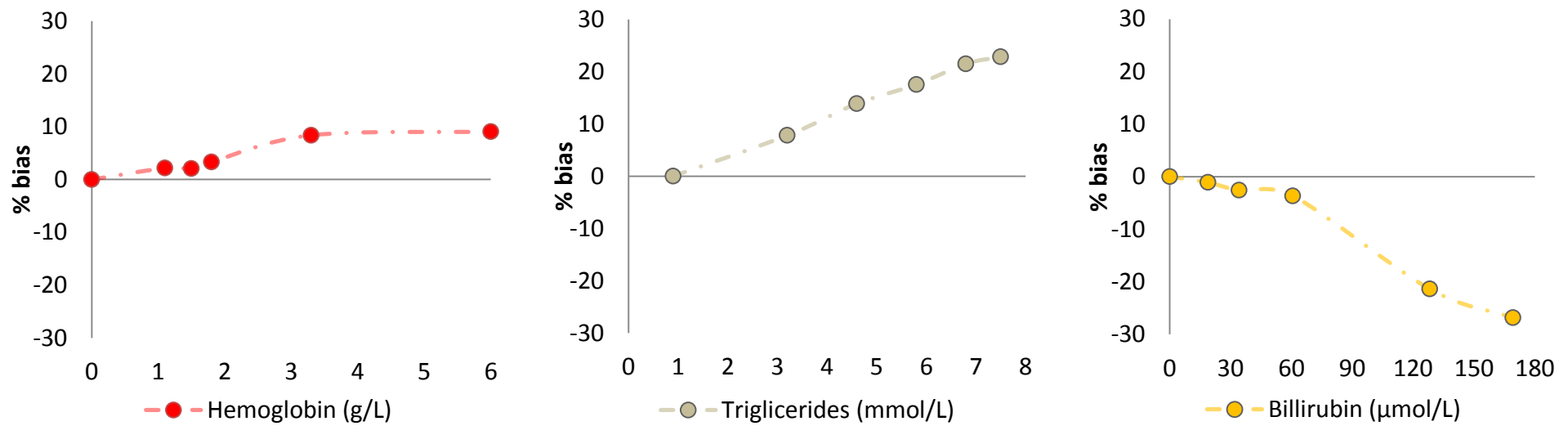


Figure 4 – Interference bias of bilirubin, hemoglobin and triglycerides in GA results (Diazyme[®]). The dashed lines highlight the bias limits of $\pm 10\%$.

Table 2 – General features of healthy volunteers included in the reference range study.

| N | 140 |
|---------------------|--------------------|
| Age (years) | 33.0 (26.0 – 48.7) |
| Man (%) | 40 |
| White ethnicity (%) | 90.7 |
| FG (mg/dL) | 88.9 ± 8.4 |
| A1C (%) | 5.3 (5.1 – 5.5) |
| Albumin (g/dL). | 4.4 ± 0.3 |
| BMI | 23.7 (22.1 – 25.8) |

FG: fasting glucose; **BMI:** body mass index (weight in kilogram/ height in centimeters²).
Data are presented as mean ± SD or median (interquartile interval).

Table 3 shows the results of GA measured by Diazyme[®] enzymatic assay in apparently healthy adults. GA levels ranged from 11.8% to 17.8% (Figure 5). There were no differences for GA results according to gender and age. Because mostly of volunteers were white, comparison of GA values among ethnicities were not performed.

GA and A1C Association

Correlation between A1C and GA values (Figure 6) was weak but statistically significant in normoglycemic healthy volunteers ($R= 0.25$, $p= 0.003$, $n= 140$). When GA results of 31 diabetic patients with A1C <6.5% were included, a total of 171 individuals were analyzed in a new correlation. However, correlation between GA e A1C <6.5% remained weak ($R= 0.30$, $p<0.001$). In contrast, there was a moderate association between AG and A1C $\geq 6.5\%$ in diabetic patients ($n= 54$) ($R= 0.62$, $p<0.001$). When diabetic patients were stratified by adequate and poor metabolic control, it was observed a better correlation between GA and A1C in the poor control group (A1C $\geq 9\%$; $R= 0.64$) than in the adequate control group (A1C of 6.5 – 8.9%; $R= 0.46$).

Finally, when all samples from diabetic and non-diabetic individuals were considered (n= 225), there was a strong correlation between A1C and GA (R= 0.79, p<0.001).

Table 3 – GA levels for normoglycemic Brazilians categorized by gender and age groups.

| | All | Males | Females | p | Age 1 | Age 2 | Age 3 | Age 4 | p |
|-------------------------|-------------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| N | 140 | 56 (40%) | 84 (60%) | | 47 (33%) | 37 (27%) | 20 (14%) | 36 (26%) | |
| Mean | 14.8 | 14.5 | 14.9 | 0.574 | 15.1 | 15.4 | 15.2 | 15.1 | 0.303 |
| SD | 1.5 | 1.6 | 1.4 | | 1.3 | 1.7 | 1.5 | 1.6 | |
| IC 95% | 14.5 - 15.0 | 14.1 - 14.9 | 14.6 - 15.3 | | 14.7 - 15.5 | 14.3 - 15.4 | 13.8 - 15.2 | 13.9 - 15.1 | |
| Median | 14.9 | 14.6 | 15.0 | | 15.1 | 15.0 | 14.8 | 14.4 | |
| 25thp | 13.8 | 13.3 | 13.9 | | 14.2 | 13.8 | 13.6 | 13.1 | |
| 75thp | 15.9 | 15.6 | 16.0 | | 16.0 | 16.1 | 15.3 | 15.6 | |
| Amplitude | 7.4 | 7.4 | 7.0 | | 5.0 | 7.0 | 6.5 | 6.5 | |

Age 1: 18 to 27 years; **Age 2:** 28 to 37 years; **Age 3:** 38 to 47 years; **Age 4:** 48 to 74 years; **SD:** standard deviation; **IC:** 95% confidence interval for mean; **25thp:** 25th percentile (first quartile); **75thp:** 75th percentile (third quartile); **Amplitude:** maximum GA value – minimum GA value. Values are expressed as %GA.

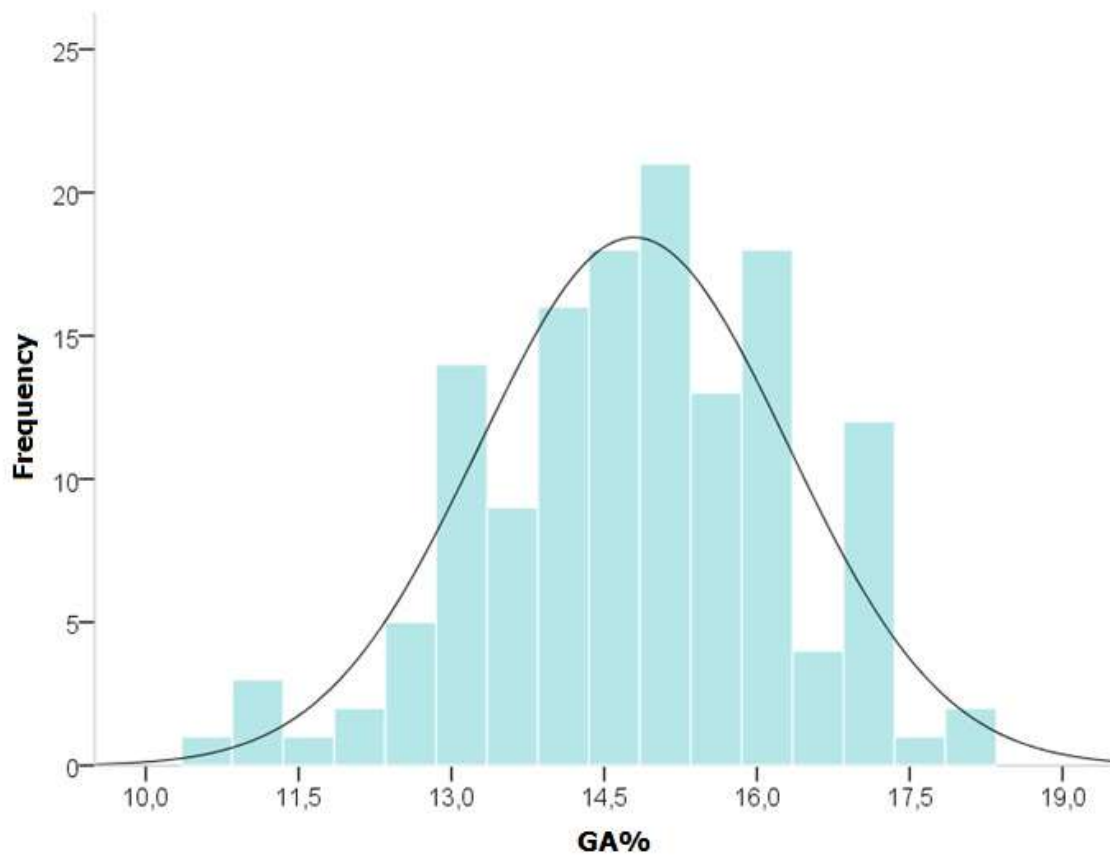


Figure 5 – Histogram for GA results (Diazyme[®] kit) in a sample of non-diabetic and healthy Brazilians (n= 140).

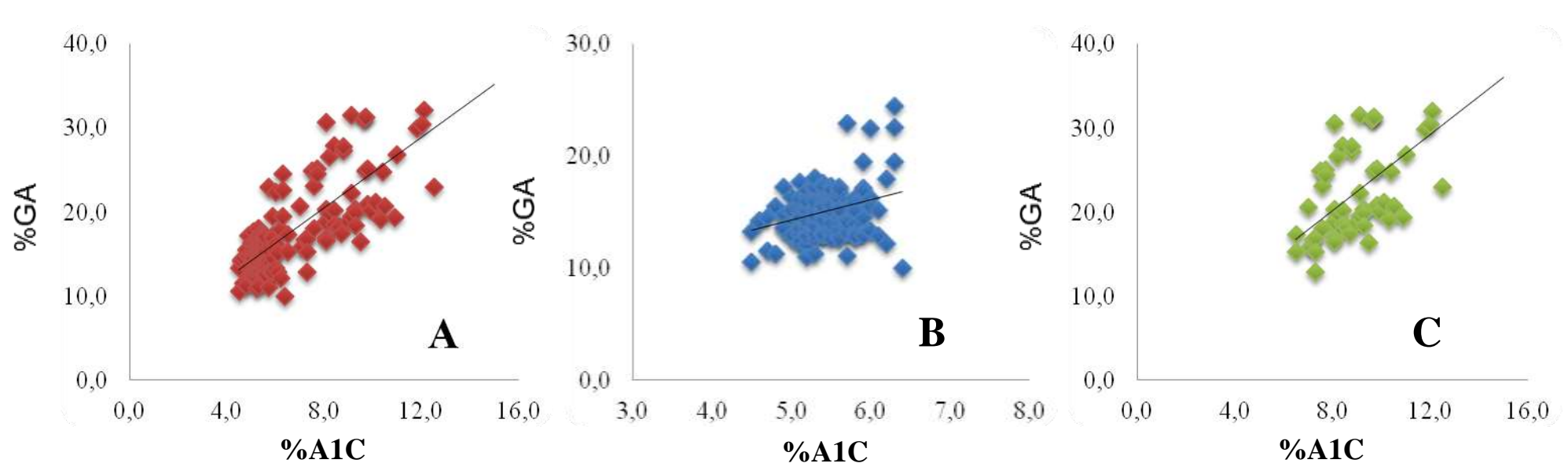


Figure 6 - Correlations between GA and A1C: A – All patients (n= 225, R= 0.79, p<0.001); B – Non-diabetic patients (n= 140, R = 0.32, p<0.001); C – Diabetic patients (n= 54, R= 0.64, p<0.001).

DISCUSSION

In this study we analyzed the analytical performance of two enzymatic kits for GA measurement available for Brazil. We selected the Diazyme[®] kit for the next steps of the verification study, due to presenting lower CV% total. Influence of hemolysis, lipemia, and icterus on GA results, as well as the reference range was evaluated.

Diazyme[®] and Crystal Chem[®] GA kits showed a strong correlation ($R= 0.91$) and good agreement (absolute bias of 1.2%). GA values in Bland-Altman analysis behaved within the agreement interval of 6.2 to -3.8 for the assays, only three results with higher GA levels remained outside de 95% limits of agreement. We investigated these extreme values individually, and we noted that all of them presented A1C >9%. The values for GA obtained by Crystal Chem[®] kit for these discordant results were lower than those obtained by Diazyme[®] kit and unlikely for patients with poor glycemic control. The single outlier that exhibited a bias >10% also showed A1C level of 15% and GA values by Diazyme[®] and Crystal Chem[®] were 46.1% and 35.8%, respectively (data not shown).

Regarding these slightly discordances found in our study when GA is high, we investigated these variances by means comparison. Wilcoxon test showed significant differences between GA from the two methods and paired T-test confirmed that GA values start to diverge from each other when the corresponding A1C was $\geq 6.5\%$. Nevertheless, comparison of means is not typically an analysis designated to laboratory methods comparison, once this approach not reproduces the accuracy of the assays (Altman & Bland, 1983).

Originally, the enzymatic methodology with high-specificity for GA was designed by Asahi Kasei company from Japan (Kohzuma, 2002) and its original kit, named as Lucica[®] GA-L (Kohzuma, 2010), has been employed in several studies regarding DM, such analytical and

diagnostic accuracy (Tominaga, 2006; Paroni, 2007; Kohzuma, 2011; Furusyo, 2011; Hsu, 2015; Hwang, 2015; Sumner, 2015; Ikezaki, 2015; Chan, 2015) and clinical research (Selvin, 2011; Nathan, 2014, Selvin, 2014; Yoon, 2015a; Yoon, 2015b). Diazyme[®] and Crystal Chem[®] companies also have developed enzymatic kits for GA measurement but were launched into the market after Lucica[®] GA-L. In literature, there are few studies employing Diazyme[®] GA assay, two of them have evaluated its analytical performance and reported excellent results (Abidin, 2013; Rodriguez-Capote, 2015). Abidin et al. have also demonstrated an excellent association between Diazyme[®] and Lucica[®] GA-L assays ($R= 0.975$). On the other hand, none publication that used Crystal Chem[®] for GA measurement was found, therefore it was not possible to compare our data with any other in the literature, except with the description of the manufacturer inserted in the kit pack.

In the current study, we found a better, though not optimal, analytical precision for Diazyme[®] compared to Crystal Chem[®] in a non-automated analysis (CV% total of 3.5% and 3.8%, respectively). The manufacturer of Crystal Chem[®] GA kit describes a large CV for its assay (imprecision <10%), and it does not provide any information if it is considering or not an automated analysis. The datasheet of Diazyme[®] reports only an automated imprecision at around 1%, which is not comparable with our data here presented.

However, due the superior analytical repeatability of the Diazyme[®], and also for its cheaper cost and easier availability compared to Crystal Chem[®], we have chosen this kit to proceed in the following steps of the verification and for implementation in our laboratory. Accordingly, we assessed the automated precision of Diazyme[®] using a large biochemistry analyzer, and we found that CV% total decreases from 3.5% to 2.5%, concerning the manual analysis. Despite this, we have not reached the precision indicated by the manufacturer at around 1% (Abdin, 2013).

Abidin et al. (2013) were the first to investigate the analytical characteristics of Diazyme[®] GA kit on a Hitachi 917 automatic clinical analyzer and reported a total imprecision about 0.9% (Abidin, 2013). Rodriguez-Capote et al. (2015) evaluated the same kit on an ADVIA 1800 Siemens analyzer and showed that CV% total was around 1.7%, a little higher than that reported by Abidin study and lower than ours results (Rodriguez-Capote, 2015). Our data are more comparable with that from Paroni et al. (2007) study, which described within and between-run CVs around 4.0% for GA measured by Lucica[®] GA-L (Paroni, 2007). However, the ideal target value for the imprecision of GA has not been established, thus is not possible to make a real comparison.

The ideal laboratory test is the one that shows excellent analytical performance, low cost, short time of assay and easiness of execution. Another important characteristic is not be influenced by interfering substances in the blood, resultants from preanalytical errors or pathological conditions. Hemolysis releases compounds of the red cells, which increase extracellular concentrations. Also, free haemoglobin, a colourful substance visible around 0.1 to 0.3 g/L, may influence on clinical chemistry tests for photometrical interference (Kirschbaumweg, 2002). Lipemia and icterus may implicate both in physical and chemical interferences (Guder, 2000) and their increased levels induce turbidity and changes in plasma colour, respectively. These mechanisms most commonly influence on spectrophotometric methods, depending of the reaction wavelength (Nikolac, 2014; Guder, 2000).

In this study, we have not detected any influence of hemolysis on Diazyme[®] GA results (bias <10%), even at 6.0 g/L of free haemoglobin. Manufacturer provides information about haemoglobin influence only up to 2.0 g/L, but with no evidence of interference below of this. Our results are also in agreement with those of Rodriguez-Capote et al. (2015) that have only found a bias +14.5% in Diazyme[®] GA at 14.3 g/L of haemoglobin (Rodriguez-Capote, 2015).

However, 14.3 g/L are very high levels of this free substance, which might be less unlikely to find in hemolyzed plasma. Therefore, it seems that hemolysis does not have clinical relevance in GA results.

Diazyme[®]'s datasheet reports no interference (bias <10%) of this assay when bilirubin and triglycerides levels are up to 128.2 $\mu\text{mol/L}$ and 22.6 mmol/L, respectively. Surprisingly, in this study, we observed a negative bias -21% at 128.2 $\mu\text{mol/L}$ of bilirubin and at 169.3 $\mu\text{mol/L}$ the bias increased to -27%. Equally, we found a significant positive influence of triglycerides on GA even at levels of 4.6 mmol/L (bias +14%), reaching a bias +23% at 7.5 mmol/L. Our findings are in agreement with those of Rodriguez-Capote et al. (2015), which have also noted a negative bias on Diazyme[®] GA results starting at 136.8 $\mu\text{mol/L}$ of bilirubin (bias -16.5%). They have observed a significant, but negative, influence of lipemia on GA at 3.0 mmol/L, 7.0 mmol/L and 23.9 mmol/L of triglycerides (bias -13%, -47% and -179%, respectively) (Rodriguez-Capote, 2015). Paroni et al. study (2007), which used Lucica[®] GA-L enzymatic assay for GA analysis, detected a similar influence of triglycerides on GA levels like our study, with bias +26% at 3.9 mmol/L and even higher for more elevated triglycerides concentrations. However, they have not found interference of bilirubin up to 342 $\mu\text{mol/L}$ but evidenced a significant negative bias for free hemoglobin starting at 1.75 g/L (Paroni, 2007).

The results of our interference study and the few results reported in the literature are still insufficient to describe the true effect of the interfering substances on the new enzymatic assay for GA. The most relevant interference is that from lipemia. Once DM is a metabolic disease commonly associated with obesity and altered lipid profile (ADA, 2015; SBD, 2015), a laboratory test influenced by triglycerides concentrations about 3.4 mmol/L might be a problem. Although this interference may be eliminated by plasma ultracentrifugation (Rodriguez-Capote, 2015), this technology is not usually available in routine clinical labs. Also, it is not often

possible to notice turbidity visually at those concentrations. Thus, further investigations are necessary for better understand the analytical and clinical relevance of these substances on GA results.

The reference range for GA obtained in our study ranged from 11.8% to 17.8%. Only two studies assessed these ranges using Diazyme[®] GA kit and reported intervals from 10.4% to 15.7% (Abidin, 2013) and 10.5% to 17.9% (Rodriguez-Capote, 2015), the last is most similar with our data. In addition, several studies have also reported intervals for Lucica GA-L[®] in normoglycemic individuals, with the lowest results from 11.7% to 12.3%, and the highest from 15.8% to 16.9% (Tominaga, 2006; Selvin, 2011; Kohzuma, 2011; Furusyo, 2011; Hwang, 2014; Ikezaki, 2015; Hsu, 2015). However, many of these studies have considered a confidence interval of 90% and established the reference ranges for different ethnic populations, which corroborates for the slight disparity found among intervals. Some investigations have already demonstrated divergent GA results between Blacks and Whites (Selvin, 2011; Kohzuma, 2011), but no comparison have been published with other ethnic groups. Here, we have not evaluated GA levels by ethnicities, due the very high prevalence of Whites in our study. On the other hand, we have not found differences in GA between gender (Hsu, 2015) and age, which are in agreement with other reports (Furusyo, 2011; Kohzuma, 2011).

In this study, we described a strong correlation between A1C and GA measured by Diazyme[®] (R= 0.79). This correlation was weaker in non-diabetic persons (A1C <6.5%; R= 0.30) and stronger in diabetic patients (A1C ≥6.5%, R= 0.62), especially in the presence of poor glycemic control (A1C >9.0%; R =0.64). These data suggest that these two tests have only a good association at higher levels, probably because GA detects short-term glucose variability, unlike A1C, in persons without DM. Selvin et al. (2015) have also reported a stronger correlation between A1C and GA in individuals with DM (R=0.90) than in those without DM (R=0.62).

However, the large sample size (N=11.104) of Selvin et al. study must be accountable for their higher Pearson's coefficient, regarding ours (Selvin, 2015). Besides, the correlation that we reported between A1C and GA (R= 0.79) is in agreement with those reported by studies using Lucica[®] GA-L (Furusyo, 2011; Hsu, 2015; Selvin, 2015).

This study has several strengths. First, as far as we know, it is the first to provide analytical characteristics of Crystal Chem[®] GA assay and also the first to establish reference ranges for GA in Brazilians individuals. Secondly, we have followed international recommendations to perform the study. Finally, we also have carefully selected the individuals for inclusion in all the steps, excluding those with conditions that could interfere with our results. Some limitations were also observed: we have neither performed a glucose tolerance testing for excluding prediabetes in our volunteers, nor measured fructosamine to assess its association with GA, and we were not able to assess the values of GA in different ethnic groups.

In conclusion, Crystal Chem[®] and Diazyme[®] GA kits presented an excellent correlation with a small bias and slight disagreement at higher GA results. Diazyme[®] assay was the one that exhibited the lowest analytical imprecision, but it remains uncertain the exact effect of interfering substances on its enzymatic reaction. The reference range of GA for healthy Brazilians is around 11.8% to 17.8%, similar with those by Lucica[®] GA-L enzymatic assay. Also, the high association between A1C and GA demonstrates that this new method may be useful in the assessment of glycemic control when A1C results are unreliable due to certain clinical conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by "Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre" (FIPE/HCPA) and accomplished at HCPA. We thank the "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul" (FAPERGS) for the scholarship given to the university student involved in this project.

DISCLOSURE

The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

REFERENCES

Abidin D, Liu L, Dou C, Dattaa A and Yuan C. An improved enzymatic assay for glycated serum protein. *Anal Methods* 2013;5:2461-2469.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2015;(supplement)38:S1-S94.

Bland DG, Altman JM. *Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies*.

Cavagnolli G, Pimentel AL, Freitas PA, Gross JL, Camargo JL. Factors affecting A1C in non-diabetic individuals: Review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2015;445:107-14.

Chan CL, Pyle L, Kelsey M, Newnes L, Zeitler PS, Nadeau KJ. Screening for type 2 diabetes and prediabetes in obese youth: evaluating alternate markers of glycemia – 1,5-anhydroglucitol, fructosamine, and glycated albumin. *Pediatric Diabetes* 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline 2nd edn*. Wayne, PA: CLSI, 2005.

CLSI - EP09-A3: *Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Third Edition – 2013*

CLSI - EP28-A3C: *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition – 2010*

Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, Lippi G. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *J Diabetes Sci Technol* 2015;9(2):169-76.

Frank E. Grubbs (1969) Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples, *Technometrics*, 11:1, 1-21

Freedman BI et al. Comparison of glycated albumin and hemoglobin A1c concentrations in diabetic subjects on peritoneal and hemodialysis. *Perit Dial Int* 2010;30(1):72-9.

Furusyo N et al. Utility of glycated albumin for the diagnosis of diabetes mellitus in a Japanese population study: results from the Kyushu and Okinawa Population Study (KOPS). *Diabetologia* 2011;54(12):3028-36.

Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830(12):5509-14.

Guder WG et al. The haemolytic, icteric and lipemic sample. Recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J Lab Med* 2000;24(8):357-364.

Hsu P et al. A comparison of glycated albumin and glycosylated hemoglobin for the screening of diabetes mellitus in Taiwan. *Atherosclerosis* 2015;242(1):327-33.

Hwang YC et al. Optimal glycated albumin cutoff value to diagnose diabetes in Korean adults: a retrospective study based on the oral glucose tolerance test. *Clin Chim Acta* 2014;437:1-5.

Ikezaki H et al. Glycated albumin as a diagnostic tool for diabetes in a general Japanese population. *Metabolism* 2015;64(6):698-705.

International Diabetes Federation (IDF). *IDF Diabetes Atlas seventh edition 2015*. Disponível em: www.diabetesatlas.org. Acesso em: 28 de janeiro de 2016.

Kirschbaumweg T. Haemolysis as influence & interference factor. *The Journal of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2002;13(4):1-4.

Koga M. Glycated albumin; clinical usefulness. *Clin Chim Acta* 2014;433:96-104.

Kohzuma T, Koga M. Lucica GA-L glycated albumin assay kit: a new diagnostic test for diabetes mellitus. *Mol Diagn Ther* 2010;14:49-51.

Kohzuma T, Yamamoto T, Uematsu Y, Shihabi ZK, Freedman BI. Basic Performance of an Enzymatic Method for Glycated Albumin and Reference Range Determination. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2011;5(6):1455-1462.

Kouzuma T, Usami T, Yamakoshi M, Takahashi M, Imamura S. An enzymatic method for the measurement of glycated albumin in biological samples. *Clin Chim Acta* 2002;324(1-2):61-71.

Nathan DM, McGee P, Steffes MW, Lachin JM. DCCT/EDIC Research Group. Relationship of glycated albumin to blood glucose and HbA1c values and to retinopathy, nephropathy, and cardiovascular outcomes in the DCCT/EDIC study. *Diabetes* 2014;63(1):282-90.

Nikolac, N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochemia Medica* 2014;24(1):57–67.

Paroni R et al. Performance characteristics and clinical utility of an enzymatic method for the measurement of glycated albumin in plasma. *Clinical Biochemistry* 2007;40:1398–1405.

Raghav A, Ahmad J. Glycated serum albumin: a potential disease marker and an intermediate index of diabetes control. *Diabetes Metab Syndr* 2014;8(4):245-51.

Rodriguez-Capote K, Tovell K, Holmes D, Dayton J, Higgins TN. Analytical Evaluation of the Diazyme Glycated Serum Protein Assay on the Siemens ADVIA 1800: Comparison of Results Against HbA1c for Diagnosis and Management of Diabetes. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2015;9(2):192-199.

Sacks DB et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem* 2011;57(6):e1-e47.

Selvin E, Rawlings AM, Grams M, Klein R, Sharrett AR, Steffes M, Coresh J. Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complications: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2(4):279-88.

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):303–9.

Silva JF, Pimentel AL, Camargo JL. Effect of iron deficiency anaemia on HbA1c levels is dependent on the degree of anaemia. *Clin Biochem* 2016;49(1):117-20.

Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2014 – 2015. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica, 2015.

Sumner AE et al. A1C Combined With Glycated Albumin Improves Detection of Prediabetes in Africans: The Africans in America Study. *Diabetes Care* 2016;39(2):271-7.

The Statistician 1983;32:307-317.

Tominaga M et al. Report of the committee on standardization of laboratory testing related to diabetes mellitus of Japan Diabetes Society: determination of reference intervals of hemoglobin A1c (IFCC) and glycoalbumin in the Japanese population. *J Japan Diab Soc* 2006;49:825–833.

Yoon H et al. Glycated albumin and the risk of micro- and macrovascular complications in subjects with Type 1 Diabetes. *Cardiovascular Diabetology* 2015b;14:53.

Yoon H et al. Glycated Albumin Levels in Patients with Type 2 Diabetes Increase Relative to HbA1c with Time. *BioMed Research International* 2015a;2015:1-8.

Yoshiuchi K et al. Glycated albumin is a better indicator for glucose excursion than glycated hemoglobin in type 1 and type 2 diabetes. *Endocr J* 2008;55(3):503-7.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A albumina glicada (AG) é um teste promissor no DM. Muitos estudos têm demonstrado a sua efetividade no acompanhamento do tratamento hipoglicemiante e insulínico, no monitoramento de flutuações glicêmicas e hiperglicemia pós-prandial, no prognóstico e, ainda, no diagnóstico de DM.

Pelo fato de a AG ter ganhado um método de análise com alta acurácia e fácil execução somente em 2002, este teste ainda não possui a mesma popularidade da A1C no DM. Entretanto, devido ao grande número de pesquisas acerca da AG, a padronização e expansão do teste aos laboratórios mundiais parece ser somente uma questão de tempo, assim como a sua citação em diretrizes internacionais.