

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**PROTEÍNAS GLICADAS COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DE  
DIABETES**

JULIANA FERREIRA ABDALLA ALLE

Porto Alegre, julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**PROTEÍNAS GLICADAS COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DE  
DIABETES**

Trabalho apresentado como requisito parcial  
para aprovação na Disciplina de Trabalho de  
Conclusão do Curso de Farmácia da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

JULIANA FERREIRA ABDALLA ALLE

Orientadora: Profa.Dra. Carmen Regla Vargas

Porto Alegre, julho de 2017

Este artigo foi elaborado segundo as normas da Revista Clinical and Biomedical Research (CBR) (Anexo 1) na qualidade de “Revisão da Literatura”. O artigo será submetido para publicação nesta Revista após as correções e sugestões da banca revisora.

**PROTEÍNAS GLICADAS COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO E MONITORIZAÇÃO DE  
DIABETES**

**GLYCATED PROTEINS AS DIAGNOSTIC BIOMARKERS AND DIABETES MONITORING**

Juliana Ferreira Abdalla Alle <sup>a</sup>, Carmen Regla Vargas <sup>a,b,c,d\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Avenida Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

**Título curto:** Proteínas Glicadas no Diabetes

**\*Autor Correspondente:** Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS.

Telefone: +55 51 33598011

Telefax: +55 51 33598010

**Endereço de e-mail:** crvargas@hcpa.edu.br (Carmen R. Vargas)

## **RESUMO**

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica de alta prevalência mundial, no qual um estado hiperglicêmico crônico provoca a glicação de proteínas e, como consequência, complicações diabéticas. Visto isto, o objetivo desse estudo é revisar o uso de proteínas glicadas tais como, hemoglobina (HbA1c) e albumina glicadas (AG), como biomarcadores de diagnóstico e monitorização de diabetes, considerando suas limitações. Foram feitas pesquisas sistematizadas nas quais a HbA1c e a AG fossem preditoras do diagnóstico, bem como biomarcador do monitoramento do diabetes. Utilizou-se como banco de dados o Pubmed e livros-texto. Encontrou-se um total de 53 artigos e 29 deles, que constam entre os anos de 2010 e 2017, foram selecionados para uso na revisão. Atualmente a HbA1c é considerada padrão ouro no índice de controle glicêmico de longo prazo, e um nível de HbA1c de 6,5% pode ser utilizado no diagnóstico de DM por meio de método certificado e calibrado pelo “Diabetes Control and complications trials” (DCCT). No entanto, algumas limitações quanto ao uso da HbA1c devem ser consideradas e, nesse contexto, a AG e a relação AG/HbA1c vem sendo alvo de estudo por muitos pesquisadores como alternativa de marcador de controle glicêmico em muitas complicações diabéticas.

### **Palavras-chave**

Proteínas Glicadas, Hemoglobina glicada, Albumina glicada, Diagnóstico, Diabetes, Monitorização, Biomarcadores

## **ABSTRACT**

Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease of high global prevalence, in which a chronic hyperglycemic state causes a protein glycation and, as a consequence, diabetic complications. The objective of this study is to review the use of glycated proteins such as glycated hemoglobin (HbA1c) and glycated albumin (GA) as biomarkers for diagnosis and monitoring of diabetes, considering their limitations. Systematized research was conducted in which HbA1c and GA were predictors of diagnosis as well as biomarkers of diabetes monitoring. Pubmed and textbooks were used as a database. It was found a total of 53 articles and 29 of them, which are between the years 2010 and 2017, were selected for use in the review. Currently, HbA1c is considered a gold standard in the long-term glycemic control index, and a 6.5% HbA1c level can be used in the diagnosis of DM by a method certified and calibrated by the Diabetes Control and complications trials (DCCT). However, some limitations in the use of HbA1c should be considered and, in this context, the GA and the GA / HbA1c ratio are being the object of study by many researchers as an alternative marker of glycemic control in many diabetic complications.

### **Keywords**

Glycated Proteins, Glycated Hemoglobin, Glycated Albumin, Diagnosis, Diabetes, Monitoring, Biomarkers

## DIABETES MELLITUS

O diabetes mellitus (DM) é uma doença crônica caracterizada pela hiperglicemia, que é resultado de distúrbios metabólicos como, defeitos na secreção de insulina, ação da insulina, ou de ambas as condições. É uma doença de alta prevalência mundial; 387 milhões de indivíduos com diagnóstico de DM no mundo, sendo 13 milhões de casos no Brasil, segundo o boletim da International Diabetes Federation, de 2014<sup>1,2</sup>. A estimativa é de que, até 2035, o DM afete aproximadamente 592 milhões de pessoas no mundo<sup>3,4</sup>.

A classificação atual do DM está baseada na etiologia da doença, sendo, dessa forma, agrupada em quatro categorias: DM tipo 1, DM tipo 2, outros tipos específicos e Diabete Gestacional. As formas mais prevalentes da doença são o DM tipo 1 e o DM tipo 2. O DM tipo 1 é devido, na maior parte dos casos, à destruição autoimune das células beta das ilhotas pancreáticas, causando a deficiência de secreção pancreática de insulina, sendo, então, insulino-dependente. Já, o DM tipo 2, é “insulino resistente”, pois é resultante da combinação da diminuição de ação da insulina nos tecidos- alvo com a diminuição da secreção pancreática de insulina. Este último é o tipo de DM mais comum, acomete cerca de 90-95% dos indivíduos, apresenta um quadro clínico silencioso e, por vezes, pode vir a ser diagnosticado já pelos sintomas das complicações crônicas, como cegueira e uremia, e está associado a fatores que incluem a obesidade, idade e histórico familiar<sup>1,5</sup>.

Sintomas clássicos do DM incluem poliúria, polidipsia, polifagia, perda de peso e visão turva, podendo os pacientes, também apresentar evidências de complicações crônicas como retinopatia, neuropatia, sintomas cardiovasculares e hipertensão, causadas pela hiperglicemia prolongada. Tendo em vista essas complicações, fica clara a necessidade da detecção precoce da doença. Sendo assim, são usados como critérios clássicos para diagnóstico do DM os valores de glicose plasmática de jejum (8h) (FPG), o teste oral de tolerância à glicose (TOTG): [glicose em jejum e 2h após ingerir 75g de glicose]<sup>1,6</sup> e a glicemia ao acaso em pacientes sintomáticos. Recentemente a “American Diabetes Association” (ADA) recomendou a hemoglobina glicada (HbA1c) por meio de método certificado e calibrado pelo “Diabetes Control and Complications Trials” (DCCT) como critério diagnóstico para o DM<sup>7-9</sup>.

Sendo o DM uma doença de alta prevalência na população com complicações relacionadas ao processo de glicação das proteínas provocado pela hiperglicemia crônica, o diagnóstico e tratamento precoce se tornam essenciais para redução dessas complicações e melhor cuidado com pacientes diabéticos<sup>5,10</sup>. O uso da hemoglobina e albumina glicadas como opções no diagnóstico de DM vem sendo questionado<sup>9,11</sup>. Assim, no presente trabalho será revisado o uso de proteínas glicadas como biomarcadores de diagnóstico e monitorização de diabetes, enfatizando a funcionalidade das proteínas glicadas no DM.

Para realizar este estudo foram feitas pesquisas sistematizadas com a intenção de selecionar artigos relevantes no qual as proteínas glicadas tais como a hemoglobina glicada (HbA1c) e a albumina glicada (AG) fossem preditoras do diagnóstico do diabetes. As informações obtidas neste trabalho foram resultado da extensa pesquisa no banco de dados do Pubmed e livros-texto. As palavras-chave utilizadas foram Proteínas Glicadas, Hemoglobina glicada, Albumina glicada, Diagnóstico, Biomarcadores, Diabetes, Monitorização. Foram encontrados um total de 53 artigos e 29 deles, que estão entre os anos de 2010 e 2017, foram selecionados para o uso na revisão. Esses artigos apresentam diversas abordagens sobre o uso das proteínas glicadas no monitoramento e diagnóstico do diabetes mellitus.

## GLICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A glicação é um processo não enzimático que envolve a adição de resíduos de carboidratos, como gliceraldeídos, glicose-6-fosfato, galactose, frutose, ribose, monose e ácido siálico, aos resíduos de aminoácidos em proteínas, tais como colágeno cristalino, ferritina, apolipoproteína, hemoglobina e albumina. Esse processo ocorre em maior quantidade nos indivíduos diabéticos e está fortemente envolvido no desenvolvimento e progressão de complicações diabéticas crônicas<sup>5,8,12</sup> (Figura 1). A glicação não enzimática combina uma série de reações que incluem condensações, rearranjos de grupos funcionais e modificações oxidativas. Sua eficiência reacional vai depender da conformação estrutural do carboidrato<sup>8</sup>.

A fase inicial do processo de glicação começa com a formação de uma reversível e instável base de Schiff, o qual é formado através do ataque de uma glicose ou derivados a uma amina livre de uma proteína, levando a formação de um resíduo frutossamina estável (cetoamina), através da remoção de uma molécula de água. O rearranjo desse produto final leva a formação de um irreversível composto de Amadori. Essa glicação inicial também é chamada de reação de Maillard<sup>13</sup> (Figura 2).

Subsequente a essa fase inicial, modificações avançadas agem sobre os produtos de Amadori formados, tais como rearranjos, oxidação, polimerização e clivagens que dão origem a conjugados irreversíveis chamados produtos finais de

glicação avançada (AGEs). Alguns exemplos de AGEs são carboxi-metil-lisina, pirralina, pentosidina, arginina-lisina-imidazola e imidazolona<sup>12,13</sup> (Figura 2).

Proteínas ligadas à AGEs resultam em agregados insolúveis que podem influenciar na degeneração das proteínas e em outros distúrbios metabólicos durante a diabetes. O estudo das proteínas que contêm tanto produtos de estágio inicial de glicação ou, então, AGEs tornou-se interessante pelos efeitos da glicação na função das proteínas e, conseqüentemente, danos nos tecidos durante a diabetes. Os AGEs são considerados marcadores de várias doenças, tais como arteriosclerose, falência renal, Doença de Alzheimer e diabetes. Porém, deve-se considerar que esses produtos também podem aumentar durante o envelhecimento normal<sup>5,8,12</sup>.

Destacando que na condição hiperglicêmica há um favorecimento no processo de glicação em selecionar especialmente proteínas circulantes como albumina sérica, lipoproteínas e hemoglobina<sup>8</sup>, é de grande interesse nessa revisão a avaliação das proteínas albumina e hemoglobina glicadas, como biomarcadores de diagnóstico e monitoramento de diabetes.

## **ALBUMINA GLICADA**

A albumina é uma das proteínas mais abundantes do plasma humano produzido pelo fígado. Essa proteína é bastante sensível à glicação que é um processo não enzimático onde envolve o ataque de um carboidrato ou glicose ao aminoácido livre da albumina. A AG possui um tempo de meia-vida de 12-21 dias<sup>5,8,12</sup>, menor do que o tempo de meia-vida dos eritrócitos. Dessa forma, a AG pode funcionar como um biomarcador no controle glicêmico no período de 2-3 semanas. Em indivíduos saudáveis, os níveis de AG variam entre 1- 10% e tem um aumento de 2-3 vezes em pacientes diabéticos<sup>5,8,11</sup>.

### **Medição da albumina glicada e suas limitações**

A AG é medida diretamente por técnicas como cromatografia, espectrometria, imunoenensaio e métodos enzimáticos. Para a caracterização da AG em soro humano também pode ser explorada a cromatografia de afinidade por boro, seguida pela detecção espectrométrica de massas em tandem. Essa técnica é baseada na interação entre resíduos de açúcar e um agente de ligação como o ácido fenilborônico. Este processo permite a retenção e a separação, de AG e de albumina não glicada, sendo, então, as espécies retidas posteriormente detectadas e quantificadas, por espectrometria de massas ou, ainda, imunoenensaio. Os resultados nesses ensaios para medida de AG são expressos através da razão entre a quantidade de AG e a quantidade de albumina total presente<sup>3,5</sup>.

Algumas doenças como, proteinúria, síndrome nefrótica, cirrose hepática e hipotireoidismo podem interferir na medição da AG. Ainda, a AG é inversamente influenciada pela obesidade, pois tende a diminuir em obesos com alta porcentagem de massa gorda no corpo, e aumenta com a idade. O aumento do metabolismo de albumina está associado com a diminuição do nível de AG<sup>5,11</sup>.

### **Uso clínico da albumina glicada**

A AG tem sido usada como indicador de controle glicêmico. Por ter um tempo de meia-vida de 12- 21 dias, ela reflete o nível de glicose plasmática durante um período mais curto, e reflete com mais precisão os níveis glicêmicos pós prandiais, podendo fornecer com maior sensibilidade o estado de glicemia<sup>5,10,14</sup>. A AG tem três grandes vantagens no monitoramento do controle da glicose, pois ela não sofre influência pela vida útil dos eritrócitos ou dos variantes da hemoglobina, é particularmente útil como indicador de controle glicêmico em desordens hematológicas e pode ser usada em situações em que a glicemia melhora ou piora rapidamente<sup>11</sup>.

## **HEMOGLOBINA GLICADA**

A modificação da hemoglobina a partir de uma glicose ligada à valina N-terminal da sua cadeia beta dá origem à HbA1c. Ou seja, a HbA1c define a hemoglobina conjugada à glicose, processo que ocorre de forma lenta, não enzimática e é diretamente proporcional à glicose, devido à alta permeabilidade das hemácias às moléculas de glicose. A fração A1c é o componente mais importante dessa reação, pois é nessa fração que resíduos de glicose irão se ligar ao grupo amino terminal contendo a valina, de uma ou ambas as cadeias betas da hemoglobina e, assim, dando origem a hemoglobina glicada A1c (HbA1c), que representa o controle glicêmico de modo mais fidedigno<sup>9,15,16</sup>.

Por permanecer dentro das hemácias, a concentração de HbA1c dependerá, basicamente, da taxa glicêmica média e da meia-vida dos eritrócitos. Como a quantidade de glicose ligada à hemoglobina é diretamente proporcional à

concentração média de glicose no sangue, e devido ao tempo de meia-vida de 120 dias dos eritrócitos, a medida da quantidade de glicose ligada à hemoglobina pode fornecer o controle glicêmico médio dos 120 dias que antecedem a coleta de sangue, incluindo picos pós- prandiais<sup>9</sup>.

### **Medição da hemoglobina glicada e suas limitações**

Atualmente existem vários métodos viáveis para a dosagem da HbA1c, sendo eles baseados em quatro princípios: cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de troca iônica, imunoenaios, ensaios enzimáticos e HPLC por afinidade. Esses métodos são padronizados e existe harmonização dos resultados entre os laboratórios. O HPLC de troca iônica é o método mais adequado para dosagem de A1c<sup>16,17</sup>.

A dosagem da HbA1c possui interferentes (tabela 1), sendo as principais<sup>9,18</sup>:

- A presença das variantes genéticas da hemoglobina – as hemoglobinas S ou C, por exemplo, na condição heterozigótica, pode resultar em valores falsamente elevados ou diminuídos, dependendo do tipo de método de ensaio utilizado;
- Em doenças que alteram o tempo de sobrevivência das hemácias, como anemia hemolítica e hemorragia, podem resultar em valores falsamente baixos, já que a hemoglobina permanece dentro das hemácias;
- A presença de grandes quantidades de vitaminas C e E são fatores que induzem resultados falsamente diminuídos por inibirem o processo de glicação da hemoglobina;
- Anemias por carência de ferro, vitamina B12 ou folato, aumentam a sobrevivência das hemácias, dessa forma, é observada falsa elevação dos valores de HbA1c;
- Hemoglobinas quimicamente modificadas por elevada ingestão de salicilatos;
- Hipertrigliceridemia, hiperbilirrubinemia, alcoolismo crônico e uso de opiáceos;
- A pré-A1c ou a base de Schiff, fração lábil da A1c.

### **Uso clínico da hemoglobina glicada**

A HbA1c já é aceita como biomarcador de longo prazo no controle glicêmico num período de 2-3 meses, devido a vida útil de 90-120 dias das células vermelhas. Ao mensurar a HbA1c, avalia-se a média das glicemias do paciente nos últimos 120 dias, o que não acontece de forma homogênea, devido aos eventos mais recentes que contribuem de maneira mais significativa para o resultado final<sup>5,16</sup>.

A função da HbA1c foi ampliada no ano de 2009, quando a ADA (“American Diabetes Association”) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziram a HbA1c para o diagnóstico da diabetes mellitus. A medida da HbA1c foi reconhecida como um dos critérios para o diagnóstico de diabetes mellitus, quando  $\geq 6,5\%$  e pré-diabetes, entre 5,7 e 6,4%, porém não é utilizada como critério de diagnóstico em pacientes diabéticos gestantes<sup>11,16</sup>.

### **CRITÉRIOS DIAGNÓSTICO DO DIABETES**

Os atuais critérios de diagnóstico da diabetes mellitus estão baseados em quatro testes tais como FPG, TOTG, glicose plasmática casual e HbA1c<sup>1</sup>. Na ausência de sintomas evidentes de diabetes, incluindo crise hiperglicêmica, um segundo teste é requerido para a confirmação do diagnóstico. É recomendado que se repita o mesmo teste usando uma nova amostra de sangue, sendo o diagnóstico feito com o resultado do teste repetido para confirmação<sup>1,19</sup>.

Os critérios para diagnóstico de diabetes consistem em:

- a) FPG  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L);
- b) TOTG: glicose em jejum e 2h após ingerir 75g de glicose,  $\geq 200$  mg/dL
- c) Glicemia ao acaso em pacientes sintomáticos  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L);
- d) HbA1c  $\geq 6,5\%$  (48 mmol/mol) por meio de método certificado e calibrado pelo DCCT (HPLC de troca iônica).



## PROTEÍNAS GLICADAS NA INVESTIGAÇÃO DIAGNÓSTICA E MONITORAMENTO DO DIABETES

Os pacientes diabéticos comparados aos não diabéticos apresentam um aumento no processo de glicação de proteínas. Dessa forma, os biomarcadores são necessários para que se tenha acurácia e precisão no diagnóstico e monitoramento do controle glicêmico. Em 2009, as diretrizes da ADA e OMS propuseram como critério de diagnóstico de diabetes a medição de HbA1c, tendo como ponto de corte diagnóstico  $\geq 6,5\%$  ( $48\text{mmol/mol}$ )<sup>20,21,22</sup>. O teste pode ser realizado em laboratórios que utilizam método certificado pela “National glycohemoglobin standardization program” (NGSP) e padronizado por ensaio DCCT e a confirmação diagnóstica deve ser realizada através de uma segunda dosagem. Cabe salientar que a dosagem de HbA1c deve ser acompanhada do cálculo da glicemia média estimada<sup>7,18,19</sup>.

A HbA1c tem sido estabelecida como padrão-ouro no índice de controle glicêmico de longo prazo e um nível de HbA1c de 6,5% é considerado um bom controle no DM<sup>10,23</sup>. O nível de HbA1c no sangue está relacionado com o tempo de sobrevivência dos eritrócitos, e qualquer alteração no tempo de meia-vida dessas células vermelhas levará a um resultado falso na medição da HbA1c. Um aumento da concentração de HbA1c ocorre em situações como deficiência de ferro e vitamina B12, diminuição da eritropoiese, alcoolismo, falência crônica renal, diminuição do pH do eritrócito, aumento do tempo de meia-vida dos eritrócitos (esplenectomia), hiperbilirubinemia, altas doses de aspirina, uso crônico de opiáceo e deficiência de ácido fólico. Já a diminuição da concentração de HbA1c acontece em casos onde há uso de eritropoietina, ferro ou vitamina B12, reticulocitose, doença hepática crônica, ingestão de aspirina, vitamina C ou E, casos de hemoglobinopatias, aumento do pH dos eritrócitos, diminuição do tempo de meia vida dos eritrócitos (falência renal crônica), esplenomegalia, artrite reumatoide, ingestão de antiretrovirais, ribavirina, dapsona e em casos de hipertrigliceridemia<sup>6,24</sup> (tabela 1).

As vantagens que levam a utilização da HbA1c como teste de escolha para o diagnóstico de DM em relação aos métodos baseados na medida da glicemia são as seguintes: não necessita jejum do paciente, a variação biológica individual da glicose é superior à da HbA1c, o teste de HbA1c é bem padronizado com resultados equivalentes obtidos por laboratórios usando métodos certificados pelo NGSP, o teste de glicose é suscetível a mudanças de curto prazo da dieta e na presença de estresse<sup>4,24</sup>. Outro aspecto importante que deve ser destacado é que existe uma relação entre HbA1c e risco cardiovascular, tanto em pacientes com DM, como em pacientes com glicemia normal. Há um aumento do risco cardiovascular, antes de ocorrer um aumento dos níveis da FPG, o que indica que HbA1c reflete mais as complicações microvasculares. Além disso, alguns estudos indicam que indivíduos classificados com DM apenas pelo teste HbA1c são mais velhos, tem maior circunferência na cintura, apresentam níveis de LDL do colesterol mais elevados e possuem histórico familiar positiva para hipertensão e doença cardiovascular, tendo, assim, um perfil cardiovascular desfavorável. Visto isso, pode-se dizer que os diferentes testes diagnósticos tais como, FPG, TOTG e HbA1c, identificam diferentes indivíduos com risco de diabetes. Dessa forma, a utilização de algoritmos empregando os testes FPG, TOTG e/ou A1c parece ser mais adequada para garantir a correta classificação dos indivíduos com DM<sup>25</sup>.

Recentemente, o valor de AG como biomarcador de controle glicêmico tem sido validado em muitos estudos e com isso, a GA vem sendo usada como alternativa de controle glicêmico<sup>8,13</sup>. No entanto, é importante salientar que os valores ideais para AG ainda não foram definitivamente estabelecidos<sup>16</sup>. A AG já é vista como um biomarcador de médio/curto prazo, pois fornece um controle glicêmico sobre um período de 2-3 semanas<sup>5,26,27</sup>. Um aumento da concentração de AG encontra-se em casos de pacientes com prolongado tempo de meia-vida da albumina, tais como casos de cirrose hepática e hipotireoidismo. Deve-se também considerar o aumento de AG com a idade. Em contrapartida, há situações em que a concentração de AG encontra-se diminuída, como é o caso de pacientes com hipertireoidismo ou síndrome nefrótica. A AG também está diminuída em crianças e obesos<sup>11,20</sup>. Outros fatores que alteram a dosagem de AG consistem em condições inflamatórias, cigarro e hipertrigliceridemia<sup>28</sup>.

Existem algumas vantagens da avaliação da AG sobre a HbA1c<sup>8</sup>. A concentração de AG é melhor correlacionada na presença de doenças cardiovasculares, cirrose hepática, anemia por deficiência de ferro, anemia hemolítica, variantes da hemoglobina, doença crônica renal, gravidez, monitoramento da hiperglicemia pós-prandial e flutuações glicêmicas<sup>20,23,27</sup>. Visto essas limitações de HbA1c, alguns estudos sugerem AG como alternativa de biomarcador de controle glicêmico em muitas complicações diabéticas que incluem nefropatia, retinopatia, doença de Alzheimer's, pacientes em hemodiálise, diabetes gestacional, pacientes com anemia ou hemoglobinopatias<sup>12</sup>. Além disso, estudos relatam que AG é mais indicado do que a HbA1c na monitorização de pacientes que iniciam terapia com hipoglicemiantes. Há autores que relatam AG como melhor marcador para avaliar pacientes com DM tipo 2 com controle glicêmico inadequado<sup>28</sup>.

## **Relação entre albumina glicada e hemoglobina glicada**

Apesar dos três índices glicêmicos: FPG, glicose pós-prandial e HbA1c fornecerem informações úteis, esses índices sozinhos, em vários casos, são inadequados. Há estudos que evidenciam uma alta e positiva correlação entre a HbA1c e a AG<sup>10,13</sup>. Em um estudo com 456 pacientes recentemente diagnosticados com DM tipo 2, verificou-se correlação significativa (  $P < 0.001$ ) na população total ( $r=0.832$ ), em homens ( $r=0.849$ ), e em mulheres ( $r= 0,803$ ). A correlação permaneceu significativa ,também, relacionando idade, sexo e índice de massa corpórea ( $r=0.824$  na população total,  $P < 0.001$ ). Na população total, a regressão linear simples para a relação entre AG e HbA1c foi  $AG=2.843 \times HbA1c = 0.203$  ( $R^2 = 0.692$ ,  $P < 0.001$ ). A equação indica que um aumento de 1% no nível médio de HbA1c corresponde a um aumento de 2.84% na média de AG. O significado clínico de AG/HbA1c foi explorado em alguns estudos, e observou-se que o aumento da glicose no sangue em 30min está associado a uma relação elevada de AG/HbA1c, o que sugere que essa relação pode ser usada como indicador da flutuação pós- prandial da glicose, podendo, então, servir como um indicador útil na avaliação da melhoria do controle glicêmico quando administrado um fármaco direcionado para a glicose pós-prandial. Na prática clínica, a relação AG / HbA1c é considerada como um indicador para identificar pacientes com hiperglicemia pós-prandial ou grande flutuação glicêmica<sup>23,29</sup>. Dessa forma, deve-se considerar que a combinação da detecção de HbA1c e de AG pode melhorar a eficácia do diagnóstico e o nível do potencial terapêutico<sup>12</sup>.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O uso de proteínas glicadas como biomarcadores de diagnóstico e monitoramento de diabetes mellitus vem sendo estudada. Esse fato se deve principalmente às complicações desenvolvidas no paciente diabético, que são, fundamentalmente, desencadeadas pelo processo de glicação de proteínas, principalmente a hemoglobina e a albumina. Tendo feito uma sistematizada revisão da literatura dentro dessa proposta, verificou-se que atualmente a HbA1c é estabelecida como padrão-ouro no índice de controle glicêmico de longo prazo e um nível de HbA1c de 6,5% pode ser utilizado no diagnóstico de DM por meio de método certificado e calibrado pelo DCCT. No entanto, muitas limitações no uso da HbA1c em algumas patologias, vem dando espaço para o uso da AG como alternativa de marcador de controle glicêmico em muitas complicações diabéticas bem como em pacientes diabéticos em hemodiálise, diabetes gestacional, pacientes com anemia ou hemoglobinopatias e também em neonatos com diabetes. Porém, em algumas dessas patologias, não é indicado o uso sozinho da AG como biomarcador. Nesse contexto, alguns estudos já evidenciaram um resultado positivo da relação AG / HbA1c como um indicador para identificar pacientes com hiperglicemia pós-prandial ou grande flutuação glicêmica. Assim, a utilização da HbA1c e AG bem como sua relação auxiliará no diagnóstico e controle terapêutico no DM.

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

1. Silveiro S, Satler F. Rotinas em endocrinologia. Porto Alegre: Artmed; 2015.p. 2- 6
2. Magalhães G, Mundim A, Oliveira C, Mourão C. Atualização dos critérios diagnósticos para Diabetes Mellitus utilizando a A1C. *HU Revista, Juiz de Fora*. 2012; 37(3): 361-367
3. Wang N, Guo C, Han P, Li T. Glycated albumin indicates peripheral diabetic neuropathy. *Acta Diabetol-Springer-Verlag Italia*. 2016; 53(6): 973–979
4. Xu N, Wu H, Li D, Wanga J. Diagnostic accuracy of glycated hemoglobin compared with oral glucose tolerance test for diagnosing diabetes mellitus in Chinese adults: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 106: 11-18
5. Anguizola J, Matsuda R, Barnaby O, Hoy K, Chunling W, DeBolt E, et al. Review: Glycation of human serum albumin. *Clin Chim Acta*. 2013; 425: 64–76
6. Florkowski C. HbA<sub>1c</sub> as a Diagnostic Test for Diabetes Mellitus -Reviewing the Evidence. *Clin Biochem Rev*. 2013; 34: 75-82
7. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2016; 39 (cap 2): 13-22.
8. Raghav A, Ahmad J. Glycated serum albumin: A potential disease marker and an intermediate index of diabetes control. *Diabetes Metab Syndr: Clinical Research & Reviews*. 2014; 8: 245–251
9. Costa F, Barros T, Muniz R, Ferraz R. Identificação de Diabetes Mellitus 2 em Cardiopatas com Provável Resistência Insulínica através da Hemoglobina Glicada. *Rev Bras Cardiol*. 2014; 27(4): 260-266.
10. Park S, Lee W, Chung H, Hong K. Diagnostic Utility of Serum Glycated Albumin for Diabetes Mellitus and Its Correlation With Hyperlipidemia. *Ann Lab Med*. 2016; 36(4): 306-312
11. Lee J. Alternative biomarkers for assessing glycemic control in diabetes: fructosamine, glycated albumin, and 1,5-anhydroglucitol. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2015; 20: 74-78.
12. Arasteh A, Farahi S, Habibi M, Movahedi A. Glycated albumin: an overview of the In Vitro models of an In Vivo potential disease marker. *J Diabetes Metab Disord*. 2014 Apr 7; 13: 1-49. <http://www.jdmdonline.com/content/13/1/49>.
13. Kim K, Lee B. The Roles of Glycated Albumin as Intermediate Glycation Index and Pathogenic Protein. *Diabetes Metab J*. 2012; 36: 98-107
14. Koga M, Murai J, Morita S, Saito H, Kasayama S. Comparison of annual variability in HbA1c and glycated albumin in patients with type 1 vs. type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. 2013; 27: 211–213
15. Nakanga W, Crampin A, Nyirenda M. Personal View: Should haemoglobin A1C be used for diagnosis of diabetes mellitus in Malawi? *Malawi Med J*. 2016; 28 (1): 28-30
16. Métodos para Avaliação do Controle Glicêmico. *Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes*. 2015-2016; <http://www.diabetes.org.br/>.
17. Cavagnolli G, Pimentel A, Freitas P, Gross J, Camargo J. Factors affecting A1C in non-diabetic individuals: Review and meta-analysis. *Clin Chim Acta*. 2015; 445: 107–114

18. Sumita N. As interferências e as limitações metodológicas na dosagem da hemoglobina glicada (A1C). *J Bras Patol Med Lab.* 2012; 48 (5): 312-313
19. Diagnóstico do pré-diabetes- Diagnóstico e prevenção do diabetes. *Algoritmo Sociedade Brasileira de Diabetes.* 2014; cap 7: <http://www.diabetes.org.br/ebook/>.
20. Furusyo N, Hayashi J. Glycated albumin and diabetes mellitus. *Acta Biochim Biophys.* 2013; 1830: 5509–5514
21. Murai J, Soga S, Saito H, Koga M. Usefulness of glycated albumin for early detection of deterioration of glycemic control state after discharge from educational admission. *Endocr J.* 2013; 60(4): 409-413
22. Ikezaki H, Furusyo N, Ihara T, Hayashi T, Ura K, Hiramane S, et al. Glycated albumin as a diagnostic tool for diabetes in a general Japanese population. *Metab Clin Exp.* 2015; 64: 698 – 705
23. Moa Y, Maa X, Li H, Ran X, Yang W, Li Q, et al. Relationship between glycated albumin and glycated hemoglobin according to glucose tolerance status: A multicenter study. *Diabetes Res Clin Pract.* 2016; 115: 17-23
24. Higgins T. HbA1c for screening and diagnosis of diabetes mellitus – *Endocrine.* 2013; 43: 266–273
25. Cavagnolli G, Gross J, Camargo J. HbA1c, Glicemia de Jejum e Teste Oral de Tolerância à Glicose no Diagnóstico de Diabetes: Que teste usar?. *Rev HCPA.* 2010;30(4): 315-320
26. Wu W, Ma W, Wei J, Yu T, Lin M, Shih S, et al. Serum Glycated Albumin to Guide the Diagnosis of Diabetes Mellitus. *PLOS ONE.* 2016; DOI:10.1371/journal.pone.014678
27. Hwang Y, Jung C, Ahn H, Jeon W, Jin S, Woo J, 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
28. Freitas P, Ehlert L, Camargo J. Glycated albumin: a potential biomarker in diabetes. *Art Endocrinol Metab.* 2017; 61(3): 296-304
29. Kinoshita T, Shimoda M, Sanada J, Fushimi Y, Hirata Y, Irie S, et al. Association of GA/HbA1c ratio and cognitive impairment in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Diabetes and Complications.* 2016; 30(8): 1452-1455.

Tabelas

<b>Fator</b>	<b>HbA1c aumentado</b>	<b>HbA1c diminuído</b>	<b>Mudança variável em HbA1c</b>
<b>Eritropoiese</b>	Deficiência de ferro; Deficiência de B12; Eritropoiese diminuída	Uso de eritropoietina, ferro, B12; Reticulocitose; Doença hepática crônica	
<b>Hemoglobina alterada</b>			Hemoglobina fetal; Hemoglobinopatias; Metamoglobina; Determinantes genéticos
<b>Glicação</b>	Alcoolismo; Falência renal crônica; pH diminuído do eritrócito	Ingestão de aspirina, vitamina E ou vitamina C; Hemoglobinopatias; pH aumentado do eritrócito	
<b>Destruição do eritrócito</b>	Tempo de meia-vida do eritrócito aumentado; Esplenectomia	Tempo de meia-vida do eritrócito diminuído; Falência renal crônica; Hemoglobinopatias; Esplenomegalias; Artrite reumatóide; Uso de antirretrovirais; Uso de Ribavirina; Uso de Dapsona	
<b>Analitos biológicos</b>	Hiperbilirrubinemia; Hemoglobina carbamilada	Hipertrigliceridemia	Hemoglobinopatias
<b>Drogas</b>	Alcoolismo; Grandes doses de Aspirina; Uso crônico de opiáceo		

**Tabela 1.** Efeito de diferentes variáveis nas medições de HbA1c [Adaptado referência 24]

Figuras

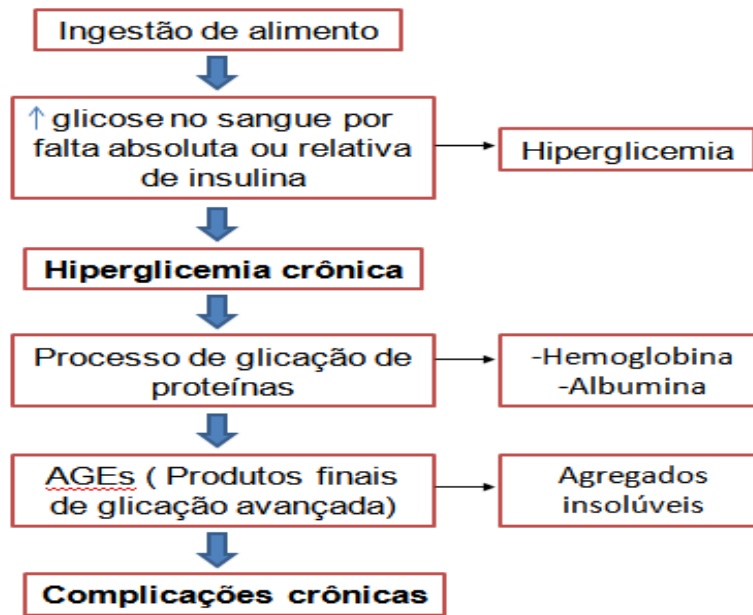
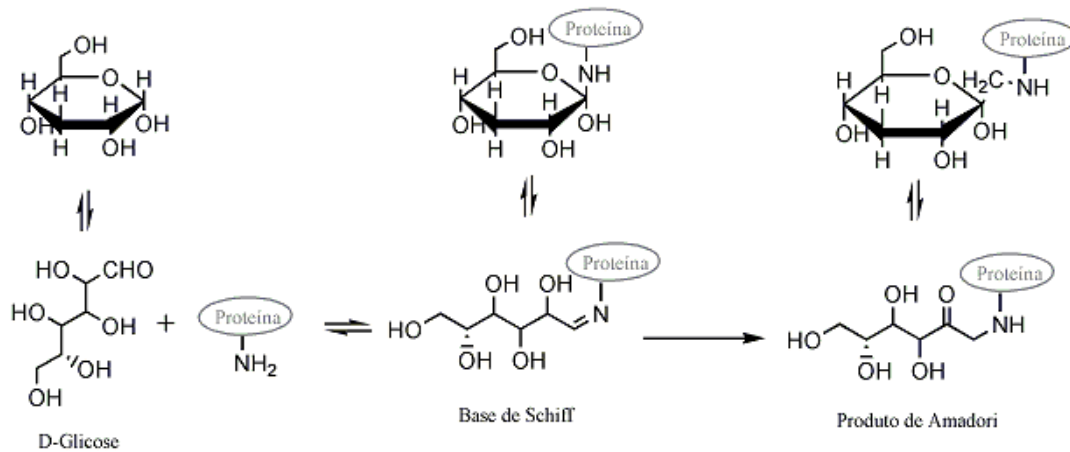


Figura 1. Relação entre proteínas glicadas e complicações crônicas

a) Fase inicial de glicação



b) Estágio avançado de glicação

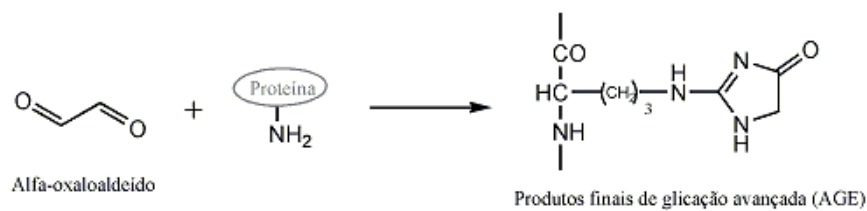


Figura 2. Processo de Glicação [Adaptado referência 5]

## **Anexos**

### **Anexo 1**

#### ***Instructions for authors***

##### **AND POLICY**

Clinical and Biomedical Research (CBR), formerly “Revista HCPA”, is a scientific publication from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and the School of Medicine of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). It is a free access scientific periodic that aims to publish papers from all relevant areas in the Health Sciences, including clinic and basic research. The selection criteria for publication include: originality, relevance of the theme, methodological quality, and adequacy to the journals’ editorial norms.

CBR supports the policies for the registration of clinical trials of the World Health

Organization (WHO) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] and the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [<http://www.icmje.org/>]. Therefore, CBR will only accept clinical research articles that have received an identification number from the Brazilian Clinical Trials Registry (*Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos - ReBEC*) [<http://www.ensaiosclinicos.gov.br>] or other official database dedicated to the registry of clinical trials.

All published articles are reviewed by peers in a double-blind fashion. Once the article is accepted for publication, its copyrights are automatically transferred to the journal. The content of manuscripts submitted for publication to CBR implies that it has not been published previously and that it has not been submitted to another journal. To be published elsewhere, even in part, articles published in CBR require written approval of the editors. The concepts and declarations contained in the papers are the authors’ full responsibility. The articles may be written in Portuguese, English, or Spanish. The submissions in English are strongly encouraged by the editors.

The manuscript should fit into one of the different categories of articles published by the journal, as follows:

##### **FORM AND PREPARATION OF ARTICLES**

###### **The following categories of contributions will be considered for publication**

###### **Editorial**

Critical and thorough review, prepared at the invitation of the editors, and submitted by an author with renowned knowledge on the subject. Editorials can have up to 1,000 words. This section may include the Journal’s editorial of presentation, signed by the editor, besides special editorials that comprise requested collaborations about current themes or about articles published on the Journal.

###### **Review Articles**

Articles that aim to synthesize and critically evaluate the present knowledge on a particular theme. They should contain no more than 6,000 words. These articles should present an unstructured abstract, with no more than 200 words (except for systematic reviews – see abstract structure in ‘Original Articles’) and a comprehensive list, but preferably with no more than 80 references.

Tables should be included in the same manuscript file (after references) and the figures should be submitted as additional documents in individual files.

###### **Special Articles**

Manuscripts exclusively requested by the editors, on a subject of scientific relevance, to authors with recognized expertise in the area, and that do not meet the criteria for Editorials.

###### **Original Articles**

Articles with unpublished research results, including full-length studies that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. Its formal structure should present the following topics: Introduction, Methods, Results and Discussion. The conclusions should be in the last paragraph of the Discussion, not requiring a specific section. Clinical implications and limitations of the study should be mentioned. For original articles, a structured abstract should be presented (Introduction, Methods, Results, and Conclusions) in Portuguese and English, in cases where the article is not written entirely in English. The Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 250 words.

Articles submitted in this category should not exceed 3,000 words. Tables should be included together in the same manuscript file (after references) and figures should be submitted as an additional document in individual files.

###### **Case Reports (Submissions in this section are restricted until October 2017)**

Articles based on peculiar cases and brief comments on the importance of the case in relation to the existing knowledge in the field. They should contain up to 1,000 words, with a total of no more than two tables or figures and 15 references, once presenting a literature review is not the purpose of the reports.

Their structure should present the following topics: Introduction, explaining the relevance of the case; Presentation of the case (Case Report), and Discussion. Case reports should describe novel or unusual findings, or offer new insights into a given problem. The content should be limited to facts relevant to the case. The confidentiality regarding patient identification is critical, so authors should not report any precise dates, initials, or any other information irrelevant to the case, but that may possibly identify the patient.

Case reports should have an unstructured abstract with no more than 150 words. Tables should be included in the same manuscript file (after references) and figures should be sent as additional documents in individual files.

### **Case Reports: Images in Medicine**

Section devoted to the publication of informative images, which are unusual and/or of broad interest in clinical situations. It should contain no more than 500 words and a total of 5 references. Two to three images (at a resolution of at least 300 dpi).

### **Letters**

Opinions and comments on an article published in the Journal, on subjects of scientific relevance, and/or preliminary clinical observations. The text should be concise, with no more than 500 words. Only one table and one figure are allowed, and a maximum of five references. They should not have an abstract.

### **Brief Communication**

Brief Communications are original but preliminary or more specific research results that contain all relevant information so that the reader may evaluate its results and conclusions, as well as replicate the research. The structure is similar to original articles; however, the Abstracts (Portuguese, Spanish, or English) should not exceed 150 words and the text should not exceed 1,200 words. A maximum of two Tables/Figures are accepted.

### **Supplements**

In addition to regular issues, CBR publishes the supplement of the HCPA Science Week.

### **CONFLICTS OF INTEREST**

Conflicts of interest arise when the author has financial or personal relationships that could inappropriately influence their professional judgment. These relationships may create favorable or unfavorable tendencies towards a paper and impair the objectivity of the analysis. Authors must disclose possible conflicts of interest.

This extends to editorials and review articles, and should be done at the time of submission of the manuscript.

It is at the editor's discretion to decide whether this information should be published or not and whether to use it for editorial decisions. A common form of conflict of interest is the funding of research by third parties who may be companies, government agencies, or others. This obligation to the funding entity may lead the researcher to obtain tendentious results, inappropriately influencing (bias) their work. Authors should describe the interference of the funding entity at any stage of the research, as well as the form of funding, and the type of relationship established between the sponsor and the author. The authors may choose to inform the peer reviewers' names for which their article should not be sent, justifying themselves.

### **PRIVACY AND CONFIDENTIALITY**

Information and pictures of patients that allow their identification should only be published with formal written authorization of the patient, and only when necessary for the purpose of the study. For formal authorization, the patient must know the content of the article and be aware that this article may be made available on the Internet. If in doubt about the possibility of identifying a patient, such as in the case of photos with stripes over the eyes, a formal authorization should be obtained. In the case of distortion of data to prevent identification, authors and editors should ensure that such distortions do not compromise the results of the study.

### **EXPERIENCES WITH HUMANS AND ANIMALS**

All content related to research with humans and animals must have previous approval by the Research Ethics Committee or the Animal Ethics Committee, respectively. The works should be in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki (current or updated), the CNS Resolution n. 196/96 and its complementary regulations, as well as the Law n. 11.794/2008 for studies in animals. It is important to indicate the number of the project's registration in the respective Committee or Ethics Committee, as well as in the National Committee for Research Ethics, if applicable.

### **PREPARATION OF THE ARTICLE**

The registration on the system and subsequent access or login are mandatory to submit and verify the status of submissions.



**Identification:** must include: a) Title of the article, which should be clear and concise. Do not use abbreviations. There should be a version of the reduced title to appear in the header as well as a title in the English language; b) authors' full names; c) institution and the sector or unit of the institution to which each author is affiliated (personal titles and positions held should not be mentioned); d) name of the institution where the study was performed; e) indication of the corresponding author, accompanied by the electronic address; and f) if it has been presented at a scientific meeting, the name of the event, the place, and the date of completion should be indicated.

**ALL NAMES OF ALL AUTHORS INCLUDED IN THE MANUSCRIPT SHOULD BE REGISTERED IN THE SYSTEM**

**Abstract and Keywords:** The articles should have an abstract in Portuguese and English. Check the structure and the number of words described for each specific type of article (see above). The structured abstracts, required only for original articles, should present the name of the subdivisions that make up the formal structure of the article at the beginning of each paragraph (Introduction, Methods, Results and Conclusions). The keywords - expressions that represent the subject of the paper - should be in number from 3 to 10, provided by the author, based on the DeCS (Health Sciences Descriptors) published by Bireme, which is a translation from the MeSH (Medical Subject Headings) from the National Library of Medicine, available in the following electronic address: <http://decs.bvs.br>. The keywords should be presented in Portuguese and English.

**Manuscript:** it must conform to the structure required for each category of article. Text citations and references cited in the legends of tables and figures should be numbered consecutively in the order they appear in the text, with Arabic numerals. References should be cited in the text as in the example: Reference 1.

**Tables:** they should be numbered consecutively, with Arabic numerals, in the order they were cited in the text, and headed by a suitable title. They should be cited in the text, but duplicated information should be avoided. The tables, with titles and footnotes, should be self-explanatory. The abbreviations should be specified as footnotes without numerical indication. The remaining footnotes should be numbered in Arabic numerals and written in superscript.

**Figures and charts:** Illustrations (photographs, charts, drawings, etc.) should be sent in separate articles, in JPG format (at a high resolution – at least, 300 dpi). They should be numbered consecutively with Arabic numerals, in the order they are cited in the text and should be clear enough for reproduction and in the same language as the text. Photocopies will not be accepted. If there are figures extracted from other previously published studies, the authors should provide a written permission for their reproduction. This authorization shall accompany the manuscripts submitted for publication. The figures must have a title and subtitle (if necessary), which should both precede the figure itself.

**Abbreviations:** abbreviations must be explained at first mention. On the rest of the article, it is not necessary to repeat the full name.

**Name of medications:** the generic name should be used.

**In case of citing appliances/equipment:** all appliances/equipment cited should include model, manufacturer's name, state, and country of manufacture.

**Acknowledgements:** should include the collaboration of people, groups, or institutions that have contributed to the study, but whose contributions do not justify their inclusion as authors; this item should also include the acknowledgements for financial support, technical assistance, etc. This item should come before the references.

**Conflicts of interest:** If there is any conflict of interest (see above), it should be declared. In case there is not, place in this section: "The authors declare no conflicts of interest" or "None to declare."

**References:** should be numbered consecutively, in the order in which they are mentioned in the text, and identified with Arabic numerals. The presentation must be based on a format called "Vancouver Style", as the examples below, and the titles of journals should be abbreviated according to the style presented by the List of Journal Indexed in Index Medicus, from the National Library of Medicine, available at: <ftp://nlmpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. The authors should ensure that the cited references in the text appear in the reference list with exact dates and authors' names correctly spelt. The accuracy of references is the authors' responsibility. Personal communications, unpublished or unfinished articles could be cited when absolutely necessary, but should not be included in the reference list and only cited in the text. The submission of the unpublished works mentioned in the manuscript may be requested at the discretion of the editors.

**Examples of citing references:****Journal articles (from one to six authors)**

Almeida OP. Autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? Rev Bras Psiquiatr. 1998;20:113-6.

**Journal articles (more than six authors)**

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calcium carbonate as a phosphate binder in patients with chronic renal failure undergoing dialysis. N Engl J Med. 1986;315:157-61.

**Articles without the author's name**

Cancer in South Africa [editorial]. S Afr Med J. 1994;84:15.

**Books**

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

**Chapters from a book**

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

**Books in which editors (organizers) are authors**

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

**Theses**

Kaplan SJ. Post-hospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

**Papers presented at conferences**

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

**Electronic Journal Articles**

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5];1(1):[24 screens]. Available from: URL:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Other types of reference should follow the document

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts

Submitted to Biomedical Journals: Sample References

([http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html))

**Technical requirements**

Microsoft Word document (.doc or .rtf), singled space, font size 10, 2-cm margins in each side, title page, abstract and descriptors, text, acknowledgements, references, tables and legends, and the figures should be sent in jpg or tiff at a resolution of at least 300 dpi.

2017 Jun 27